

БИОИНФОРМАТИКА И МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

УДК 577.112.5

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ ПОИСК НОВЫХ МЕХАНИЗМОВ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ БИНАЗЫ

А.А. Несмелов, М.И. Маркелова, А.И. Колпаков, О.Н. Ильинская

Аннотация

Рибонуклеазы, в том числе экзорибонуклеаза *Bacillus intermedius* (биназа), рассматриваются в качестве потенциальных противоопухолевых агентов ввиду своей избирательной цитотоксичности по отношению к раковым клеткам. Механизм их цитотоксического действия до конца не установлен. Некоторые экспериментальные данные противоречат общепринятой концепции, в соответствии с которой в основе действия РНКаз на опухолевые клетки лежит деградация некоторых типов клеточной РНК. Настоящая работа посвящена поиску в аминокислотной последовательности биназы участков, сходных с консервативными участками протеинкиназ различной специфичности. Обнаружение у биназы второй, протеинкиназной активности (аналогично бифункциональности триптофанил-тРНКазы человека и некоторых дегидрогеназ) могло бы объяснить её комплексное действие на опухолевые клетки. В молекуле биназы нами обнаружены последовательности, аналогичные консервативным участкам, связывающим и ориентирующим молекулы АТФ в серин/треониновых протеинкиназах. Однако взаимное расположение данных участков в третичной структуре биназы не аналогично таковому в молекулах протеинкиназ.

Ключевые слова: бактериальные РНКазы, биназа, протеинкиназа, биоинформатика.

Введение

Рибонуклеаза (РНКаза) *Bacillus intermedius* (биназа) является потенциальным противоопухолевым препаратом ввиду её избирательной цитотоксичности по отношению к раковым клеткам [1]. Она способна индуцировать апоптоз клеток лейкоза Kasumi [2], карциномы лёгких человека [3], глиомы мышей [4]. Аналогичные данные получены и для ряда других РНКаз, например РНКазы ооцитов *Rana pipiens*, Онконазы (продукта компании Tamir Biotechnology, Inc.) [5]. Ферменты данного класса могут использоваться в противоопухолевой терапии также для повышения чувствительности злокачественных клеток к иным цитотоксическим агентам [5].

Считается, что цитотоксическое действие РНКаз основано на деградации ряда клеточных РНК (прежде всего тРНК [6]), что воспринимается клеткой как сигнал к апоптозу. Кроме того, для препарата «Онконаза» установлена регуляция клеточных процессов за счёт модуляции экспрессии микроРНК [7].

Однако, несмотря на многолетние исследования, механизм цитотоксического действия РНКаз не выяснен до конца. Некоторые экспериментально полученные данные противоречат вышеизложенной концепции цитотоксического действия РНКаз. Так, аминокислотные замены в молекуле Онконазы, снижающие на 56% РНКазную активность препарата, практически не влияют на его цитотоксичность [8]. Конъюгат РНКазы А с гиалуронидазой и полиэтиленгликолем, не обладающий РНКазной активностью, сохраняет цитотоксичность исходного фермента [9].

В настоящей работе на уровне анализа аминокислотной последовательности белка рассматривается альтернативная гипотеза действия биназы, предполагающая наличие у данного фермента, наряду с РНКазной, протеинкиназной активности. Бифункциональность белков ранее показана, например, для триптофанил-тРНКазы человека, которая в виде фрагмента T2-TrpRS осуществляет регуляторные функции в процессе образования сосудов [10]. Более того, для дегидрогеназ известны примеры наличия одновременно двух энзиматических активностей [11]. Обнаружение протеинкиназной активности биназы могло бы объяснить экспериментально наблюдаемые случаи отсутствия зависимости между рибонуклеолитической активностью РНКаз и их цитотоксичностью.

Действие протеинкиназ является одним из основных способов регуляции активности отдельных белков и клетки в целом [12]. Злокачественные преобразования клеток тесно связаны с нарушением регуляции активности и/или мутациями протеинкиназ [13]. Молекула биназы не содержит сложных структур, обеспечивающих специфичность протеинкиназ и участвующих в регуляции их активности. Её протеинкиназная активность при заведомом отсутствии специфичности и возможности регуляции могла бы приводить к нарушению функционирования сигнальных систем клетки и запуску проапоптических путей. Поскольку биназа является секретлируемым белком, это освобождает собственно клетку бактерии-продуцента от подобных негативных эффектов.

В связи с вышеизложенным задачей исследования был поиск в аминокислотной последовательности биназы участков, близких по последовательности к консервативным участкам протеинкиназ различных классов, и анализ их взаимного расположения в третичной структуре биназы.

1. Материалы и методы

1.1. Объект исследования. Биназа, экзорибонуклеаза *Bacillus intermedius*. Аминокислотная последовательность биназы состоит из 109 аминокислотных остатков. Предшественник белка представлен в базе данных Uniprot под № P00649, при анализе использована кодирующая часть белка (аминокислоты с 54 по 162 включительно) [14].

1.2. Анализ аминокислотной последовательности биназы. Анализ последовательности с целью поиска консервативных участков, характерных для протеинкиназ различной специфичности, проводили с помощью сетевого ресурса ProSite [15]. Данные о наличии и последовательности консервативных участков протеинкиназ были получены из литературы [16, 17]. Использованные в анализе консервативные участки для серин/треониновых и тирозиновых

протеинкиназ – G-петля (GxGxxG), $\beta 3$ (x(A/M/I/V)xK), hrD и DfG [16], для гистидиновых протеинкиназ – H-, N-, D/F- и G-боксы [17].

Кроме того, проводили сравнительный анализ полных аминокислотных последовательностей биназы и некоторых гистидиновых протеинкиназ: сенсорных гистидиновых протеинкиназ devS, dosT, CreC, MtrB, YucG, DevR, degS, а также белков PhoR – сенсорных белков, обладающих гистидин-киназной активностью и принадлежащих фосфатному регулону разных микроорганизмов. Анализ проводили с помощью сетевого ресурса SIM [18]. Поиск белков PhoR и их аминокислотной последовательности проводился в базе Uniprot [14]. Выравнивание последовательностей белков для публикации осуществляли с помощью сетевого ресурса ClustalW2 [19].

Данные по расположению некоторых аминокислотных остатков в третичной структуре биназы были получены с помощью модели, построенной из использованной в настоящей работе аминокислотной последовательности биназы с помощью сетевого ресурса SWISS-MODEL [20]. В качестве образца для укладки полипептидной цепи была использована модель структуры биназы, ранее полученная К.М. Поляковым с соавторами на основании данных рентгеноструктурного анализа [21], идентификатор использованной модели (PDB id) – 1gou. С моделью работали в программе RasMol 2.6.

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Результаты поиска консервативных участков. В аминокислотной последовательности биназы были обнаружены участки GKSIIGG и LIYK, сходные с консервативными для протеинкиназ серин/треониновой специфичности G-петлей и $\beta 3$ -мотивом (табл. 1).

Табл. 1

Результаты сравнения аминокислотной последовательности биназы и консервативных участков протеинкиназ серин/треониновой специфичности

Консервативные участки киназ	Функция участка	Аминокислотная последовательность (по [16])	Сходный по последовательности участок биназы
G-петля	Позиционирование молекулы АТФ для эффективного катализа	GxGxxG	G ₄₇ kSigG ₅₂
$\beta 3$ -мотив	Связывание АТФ	x(A/V/I/M)xK	II ₉₅ yK ₉₇
hrD	Катализ	hrD	нет
DfG	Связывает катион Mg ²⁺	DfG	нет

Таким образом, в аминокислотной последовательности биназы представлены характерная для протеинкиназ G-петля с заменой одного из ключевых остатков глицина и участок, последовательность которого идентична $\beta 3$ -участку протеинкиназ. Замена одного из остатков глицина (G) в последовательности G-петли не исключает возможности её функционирования. Формально замена аминокислотных остатков в консервативных участках той или иной протеинкиназы является основанием для отнесения её к разряду энзиматически неактивных псевдокиназ [16]. Однако известны и активные протеинкиназы, у которых в последовательности G-петли один остаток глицина также заменён, например, в актив-

ной протеинкиназе WNK1 G-петля представлена последовательностью GrGsfK вместо канонической GxGxxG [22], а в протеинкиназе CASK – неканонической последовательностью GkGpfS [23]. Существуют энзиматически неактивные псевдокиназы, у которых, несмотря на замены в аминокислотной последовательности G-петли, сохраняется способность связывать АТФ, например, псевдокиназа STRAD (STLK5) с последовательностью G-петли GkGfeD. Более того, известна псевдокиназа HSER (GC–C) с полностью замещенной G-петлём (RRDTIQ), для которой экспериментально показано отсутствие протеинкиназной активности, но продемонстрирована способность связывать АТФ [24].

Участки, сходные с консервативными участками протеинкиназ тирозиновой и гистидиновой специфичности, в молекуле биназы отсутствуют.

2.2. Сравнение полных аминокислотных последовательностей биназы, различных PhoR-белков и некоторых других гистидиновых протеинкиназ. Выявлено, что аминокислотная последовательность биназы содержит участок LPDxxxxxxxxxxxxW, сходный с аналогичным участком в последовательности большинства прокариотических PhoR-белков и некоторых других гистидиновых протеинкиназ – YucG, DevR, DevS, относящихся к фосфатному регулону (табл. 2a). Данный участок не пересекается с консервативными участками (H-, N-, D-, F- и G-боксами) большинства перечисленных протеинкиназ и находится ближе к N-концу молекулы. В случае гистидиновой протеинкиназы YucG участок LPD пересекается с N-боксом – NLPd, а в случае DevS находится в непосредственной близости от D/F-бокса – DnGrGlpd. Однако данные боксы для своего функционирования нуждаются в 5-м и 3-м консервативных аминокислотных остатках соответственно, и выявленные в молекуле биназы аналоги заведомо нефункциональны.

Табл. 2a

Результаты сравнения полных аминокислотных последовательностей биназы, белков PhoR и иных гистидиновых протеинкиназ

Биназа	TFDGVADYLI RYKRLPDNYITKSQASALGWVAS
PhoR <i>Ech. coli</i> (st. K12)	-----LPDAVVL TTEEGGIFW---
PhoR <i>Klebs. pneumoniae</i>	-----LPDAVVL TTEEGAIFW---
PhoR <i>Shig. dysenteriae</i>	-----LPDAVVL TTEEGSIFW---
PhoR <i>Haem. influenzae</i>	-----IKYLPDAI IICQHNGNISWCNS
PhoR <i>Salm. typhi</i>	-----LPDAVVL TTEEGGIFW---
PhoR <i>Yers. pestis</i>	-----LPDAVVIT TVDGNIFW---
PhoR <i>Alteromon. macleodii</i>	-----LPDAAVV VDAKACI IW---
PhoR <i>Bord. pertussis</i>	TRETMQSM LAAAQALPDGVVTLNEDFQIDW---
PhoR <i>Pseudoalteromonas</i> <i>sp.</i> (st. SM9913)	-----VPDAVVVL QNDLSIVW---
PhoR <i>Actinobacillus</i> <i>pleuropneumoniae</i>	-----LPDGIII CNHAGTILW---
PhoR <i>Erwinia sp.</i> (Ejp617)	-----LPDALVLT TDEGTIFW---
PhoR <i>Glaciecola</i> <i>nitratireducens</i>	-----LPDAVVV VDKAKIVW---
Sensor histidine kinase	
YucG <i>Bacillus subtilis</i>	-----NLPDR-----
DevR (DosR) protein	
<i>Mycobact. tuberculosis</i>	-----VRLPDG-----
DevS protein	
<i>Mycobact. tuberculosis</i>	-----DNGRGLPDE-----

Табл. 2б

Результаты сравнения полных аминокислотных последовательностей биназы, белков PhoR и иных гистидиновых протеинкиназ

Биназа	SGARNADRLVYSSDWLIYKTTDHYATFTRIR
PhoR <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	----NADFLNQSKQQIIFNITP-----
PhoR <i>Ech. coli</i> (st. K12)	KVSGNEDQLRSAISNLVYNAVNHTPEGTHIT
PhoR <i>Shigella dysenteriae</i>	KVSGNEDQLRSAISNLVYNAVNHTPEGTHIT
PhoR <i>Yersinia pestis</i>	----NEDQLRSAVSNLVYNAVNHTPEGTKIE
PhoR <i>Klebsiella pneumoniae</i>	----NEEQLRSAISNLVYNAVNHTPPGTEIR
PhoR <i>Salmonella typhi</i>	SVLGNEEQLRSAISNLVYNAVNHTPAGTHIT
PhoR <i>Erwinia sp.</i> (Ejp617)	----NDEQLRSAMSNLVYNAVNHTPDGTRIV
PhoR <i>Pseudoalteromonas sp.</i> (st. SM9913)	SFAFSSDRLISISPLVTSNTASHK-----
PhoR <i>Alteromonas macleodii</i>	---RRIDNLLRHPEFIQYFHAGNY-----

Табл. 3

Результаты сравнения полных аминокислотных последовательностей биназы и белка DosT

Биназа	PGKSIGGDVFSNREGRLP
Hypoxia sensor histidine kinase response regulator DosT	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	SGTSIGG-VFHDRTPRRF

Табл. 4

Результаты сравнения полных аминокислотных последовательностей биназы и белка MtrB

Биназа	KSQASALGWV
Sensor histidine kinase MtrB	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	LSRAVAVAWR

Аминокислотная последовательность биназы также содержит участок NxDxLxxxxxxLxYxxxxHxxxxTxI, схожий с аналогичным участком в последовательности большинства прокариотических PhoR-белков (табл. 2б). Данный участок пересекается с N-боксом PhoR, но также не включает в себя всех необходимых для функционирования N-боксов аминокислотных остатков.

В последовательности биназы имеются также другие участки, схожие с участками белков DosT и MtrB, но не пересекающиеся с их консервативными последовательностями (табл. 3, 4). DosT – сенсорная протеинкиназа гистидиновой специфичности, активирующаяся в клетках *Mycobacterium tuberculosis* в ответ на снижение концентрации кислорода в среде. MtrB – сенсорная протеинкиназа гистидиновой специфичности, является компонентом регуляторной системы MtrA/MtrB.

2.3. Оценка пространственного взаиморасположения аминокислотных остатков биназы, образующих аналоги G-петли и β3-мотива. Анализ взаимного расположения участков биназы, аналогичных G-петле и β3-мотиву серин/треониновых протеинкиназ, показывает, что их взаимное расположение неблагоприятно для их совместного функционирования: данные участки расположены в различных участках молекулы биназы, разделены аминокислотными цепями и не образуют единого функционального участка, как это имеет место у протеинкиназ серин/треониновой специфичности (рис. 1).

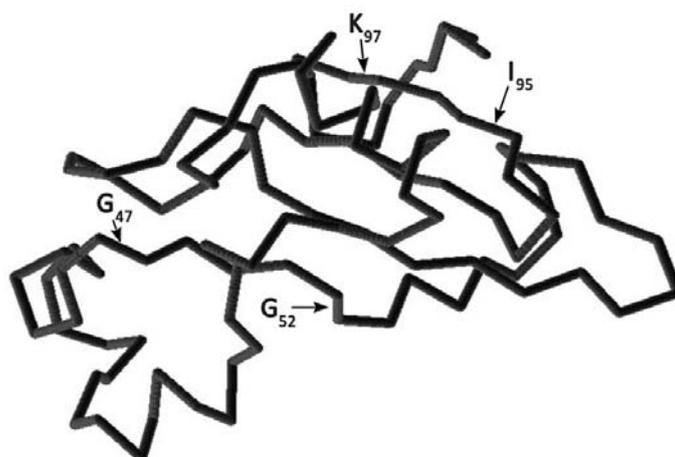


Рис. 1. Взаимное расположение аминокислотных остатков G_{47} , G_{52} , I_{95} , K_{97} в молекуле биназы

Мотив, аналогичный G-петле, не образует собственно петли. Кроме того, ключевые аминокислотные остатки в исследованных участках молекулы биназы направлены в различные стороны (иллюстрация не приведена). Таким образом, установлено, что взаиморасположение аминокислотных остатков, которые обеспечивают аналогию некоторых участков молекулы биназы с ключевыми участками серин/треониновых протеинкиназ (G_{52} , G_{47} , I_{95} , K_{97}), не сходно с таковым у киназ. Следовательно, функционирование данных участков молекулы биназы аналогично тому, как это протекает у протеинкиназ, невозможно.

Заключение

В аминокислотной последовательности биназы выявлены элементы, аналогичные консервативным элементам серин/треониновых протеинкиназ, а именно G-петле и $\beta 3$ -мотиву, которые участвуют в связывании и ориентации молекулы АТФ. Однако данные элементы не сопряжены в пространстве, их взаимное расположение и конфигурация не аналогичны таковому в молекулах протеинкиназ, что исключает возможность их функционирования. Что касается гистидиновых протеинкиназ, в том числе белков PhoR, то выявленные в молекуле биназы аналогичные участки не принадлежат к консервативным участкам данных протеинкиназ и заведомо не функциональны.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 12-04-01226а) и ФЦП (соглашение к ГК №8048).

Литература

1. *Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N.* Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents // *BioEssays*. – 2008. – V. 30, No 8. – P. 781–790. – doi: 10.1002/bies.20789.
2. *Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Spirin P.V., Fedorova T.V., Kretova O.V., Tchurikov N.A., Prassolov V.S., Ilinskaya O.N., Makarov A.A.* Sensitivity of acute myeloid leukemia

- Kasumi-1 cells to binase toxic action depends on the expression of KIT and AML1-ETO oncogenes // *Cell Cycle*. – 2011. – V. 10, No 23. – P. 4090–4097. – doi: 10.4161/cc.10.23.18210.
3. Кабрера-Фуентес Э.А., Зеленихин П.В., Колпаков А.И., Ильинская О.Н. РНКазы с противоопухолевым действием (биназы) вызывает изменение клеточной проницаемости // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. – 2012. – Т. VII, № 3. – С. 72–76.
 4. Кабрера-Фуентес Э.А., Зеленихин П.В., Колпаков А.И., Прайсснер К.Т., Ильинская О.Н. Сравнительная цитотоксичность биназы по отношению к опухолевым и нормальным клеткам // *Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки*. – 2010. – Т. 152, кн. 3. – С. 143–148.
 5. Ardelt W., Ardelt B., Darzynkiewicz Z. Ribonucleases as potential modalities in anticancer therapy // *Eur. J. Pharmacol.* – 2009. – V. 625, No 1–3. – P. 181–189. – doi: 10.1016/j.ejphar.2009.06.067.
 6. Lee J.E., Raines R.T. Ribonucleases as novel chemotherapeutics: the ranpirinase example // *BioDrugs*. – 2008. – V. 22, No 1. – P. 53–58. – doi: 10.2165/00063030-200822010-00006.
 7. Goparaju C.M., Blasberg J.D., Volinia S., Palatini J., Ivanov S., Donington J.S., Croce C., Carbone M., Yang H., Pass H.I. Onconase mediated NF κ B downregulation in malignant pleural mesothelioma // *Oncogene*. – 2011. – V. 30, No 24. – P. 2767–2777. – doi: 10.1038/onc.2010.643.
 8. Torrent G., Benito A., Castro J., Ribó M., Vilanova M. Contribution of the C30/C75 disulfide bond to the biological properties of onconase // *Biol. Chem.* – 2008. – V. 389, No 8. – P. 1127–1136. – doi: 10.1515/BC.2008.114.
 9. Matoušek J., Poučková P., Hloušková D., Zadinová M., Souček J., Škvor J. Effect of hyaluronidase and PEG chain conjugation on the biologic and antitumor activity of RNase A // *J. Control. Release*. – 2004. – V. 94, No 2–3. – P. 401–410. – doi: 10.1016/j.jconrel.2003.10.025.
 10. Zhou Q., Kapoor M., Guo M., Belani R., Xu X., Kiosses W.B., Hanan M., Park C., Armour E., Do M.-H., Nangle L.A., Schimmel P., Yang X.-L. Orthogonal use of a human tRNA synthetase active site to achieve multi-functionality // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2011. – V. 17, No 1. – P. 57–61. – doi: 10.1038/nsmb.1706.
 11. Evguenieva-Hackenberg E., Schiltz E., Klug G. Dehydrogenases from all three domains of life cleave RNA // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277, No 48. – P. 46145–46150. – doi: 10.1074/jbc.M208717200.
 12. Nelson D.L., Cox M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. – N. Y.: W.H. Freeman & Comp., 2008. – 1158 p.
 13. Tsatsanis C., Spandidos D.A. The role of oncogenic kinases in human cancer (Review) // *Int. J. Mol. Med.* – 2000. – V. 5, No 6. – P. 583–590.
 14. Uniprot Resource of protein sequence and functional information. – 2013. – URL: <http://www.uniprot.org>, свободный.
 15. Prosite Database of protein domains, families and functional sites. – 2013. – URL: <http://prosite.expasy.org>, свободный.
 16. Scheeff E.D., Eswaran J., Bunkoczi G., Knapp S., Manning G. Structure of the pseudokinase VRK3 reveals a degraded catalytic site, a highly conserved kinase fold, and a putative regulatory binding site // *Structure*. – 2009. – V. 17, No 1. – P. 128–138. – doi: 10.1016/j.str.2008.10.018.
 17. Wolanin P.M., Thomason P.A., Stock J.B. Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom // *Genome Biol.* – 2002. – V. 3, No 10. – P. 1–8. – doi: 10.1186/gb-2002-3-10-reviews3013.

18. SIM Alignment Tool for protein sequences. – 2013. – URL: <http://web.expasy.org/sim>, свободный.
19. ClustalW2 Multiple Sequence Alignment. – 2013. – URL: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>, свободный.
20. SWISS-MODEL protein structure homology-modeling server. – 2013. – URL: <http://www.swissmodel.expasy.org>, свободный.
21. Polyakov K.M., Lebedev A.A., Okorokov A.L., Panov K.I., Schulga A.A., Pavlovsky A.G., Karpeisky M.Y., Dodson G.G. The structure of substrate-free microbial ribonuclease binase and of its complexes with 3'GMP and sulfate ions // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2002. – V. 58, Pt. 5. – P. 744–750. – doi: 10.1107/S0907444902003207.
22. Min X., Lee B.-H., Cobb M.H., Goldsmith E.J. Crystal structure of the kinase domain of WNK1, a kinase that causes a hereditary form of hypertension // *Structure.* – 2004. – V. 12, No 7. – P. 1303–1311. – doi: 10.1016/j.str.2004.04.014.
23. Mukherjee K., Sharma M., Urlaub H., Bourenkov G.P., Jahn R., Südhof T.C., Wahl M.C. CASK Functions as a Mg²⁺-independent neurexin kinase // *Cell.* – 2008. – V. 133, No 2. – P. 328–339. – doi: 10.1016/j.cell.2008.02.036.
24. Jaleel M., Saha S., Shenoy A.R., Visweswariah S.S. The kinase homology domain of receptor guanylyl cyclase C: ATP binding and identification of an adenine nucleotide sensitive site // *Biochemistry.* – 2006. – V. 45, No 6. – P. 1888–1898. – doi: 10.1021/bi052089x.

Поступила в редакцию
26.05.13

Несмелов Александр Александрович – научный сотрудник кафедры микробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.
E-mail: nesmelov@gmail.com

Маркелова Мария Ивановна – студент Института фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.
E-mail: mimarkelova@gmail.ru

Колпаков Алексей Иванович – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией биосинтеза и биоинженерии ферментов, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.
E-mail: alexei.kolpakov@kpfu.ru

Ильинская Ольга Николаевна – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.
E-mail: Olga.Ilinskaya@kpfu.ru

* * *

BIINFORMATIC SEARCH FOR NEW MECHANISMS OF BINASE CYTOTOXICITY

A.A. Nesmelov, M.I. Markelova, A.I. Kolpakov, O.N. Ilinskaya

Abstract

Ribonucleases including an exoribonuclease from *Bacillus intermedius* (binase) are proposed to be potential anticancer agents due to their cytotoxicity toward tumor cells. The mechanism of ribonuclease cytotoxicity is not well understood. Some experimental data contradict the general viewpoint that cytotoxicity of ribonucleases is based on their ability to degrade some types of cellular RNA. In this work

we search for the conservative motifs of protein kinases in the binase peptide sequence. Bifunctionality is known for human tryptophanyl-tRNA synthetase and some dehydrogenases. The fact that binase possesses the protein kinase activity may explain its complex impact on tumor cells. Sites that are closed to G-loop and $\beta 3$ motifs of serine/threonine-specific protein kinases were found in the binase sequence. The function of these kinase motifs is to bind and orient ATP molecules. However, the location and configuration of the found analogs in the tertiary structure of binase is quite different from that in protein kinases, and these analogs are knowingly not functional.

Keywords: bacterial RNases, binase, protein kinase, bioinformatics.

References

1. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents. *BioEssays*, 2008, vol. 30, no. 8, pp. 781–790. doi: 10.1002/bies.20789.
2. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Spirin P.V., Fedorova T.V., Kretova O.V., Tchurikov N.A., Prassolov V.S., Ilinskaya O.N., Makarov A.A. Sensitivity of acute myeloid leukemia Kasumi-1 cells to binase toxic action depends on the expression of KIT and AML1-ETO oncogenes. *Cell Cycle*, 2011, vol. 10, no. 23, pp. 4090–4097. doi: 10.4161/cc.10.23.18210.
3. Cabrera-Fuentes H.A., Zelenikhin P.V., Kolpakov A.I., Ilinskaya O.N. Antitumor RNase (binase) induces the alteration of cellular permeability. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*, 2012, vol. VII, no. 3, pp. 72–76. (In Russian)
4. Cabrera-Fuentes H.A., Zelenikhin P.V., Kolpakov A.I., Preissner K.T., Ilinskaya O.N. Comparative toxicity of binase towards tumor and normal cells. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2010, vol. 152, no. 3, pp. 143–148. (In Russian)
5. Ardelt W., Ardelt B., Darzynkiewicz Z. Ribonucleases as potential modalities in anti-cancer therapy. *Eur. J. Pharmacol.*, 2009, vol. 625, no. 1–3, pp. 181–189. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.06.067.
6. Lee J.E., Raines R.T. Ribonucleases as novel chemotherapeutics: the ranpirinase example. *BioDrugs*, 2008, vol. 22, no. 1, pp. 53–58. doi: 10.2165/00063030-200822010-00006.
7. Goparaju C.M., Blasberg J.D., Volinia S., Palatini J., Ivanov S., Donington J.S., Croce C., Carbone M., Yang H., Pass H.I. Onconase mediated NFK β downregulation in malignant pleural mesothelioma. *Oncogene*, 2011, vol. 30, no. 24, pp. 2767–2777. doi: 10.1038/onc.2010.643.
8. Torrent G., Benito A., Castro J., Ribó M., Vilanova M. Contribution of the C30/C75 disulfide bond to the biological properties of onconase. *Biol. Chem.*, 2008, vol. 389, no. 8, pp. 1127–1136. doi: 10.1515/BC.2008.114.
9. Matoušek J., Poučková P., Hloušková D., Zadinová M., Souček J., Škvor J. Effect of hyaluronidase and PEG chain conjugation on the biologic and antitumor activity of RNase A. *J. Control. Release*, 2004, vol. 94, no. 2–3, pp. 401–410. doi: 10.1016/j.jconrel.2003.10.025.
10. Zhou Q., Kapoor M., Guo M., Belani R., Xu X., Kiosses W.B., Hanan M., Park C., Armour E., Do M.-H., Nangle L.A., Schimmel P., Yang X.-L. Orthogonal use of a human tRNA synthetase active site to achieve multi-functionality. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2011, vol. 17, no. 1, pp. 57–61. doi: 10.1038/nsmb.1706.
11. Evguenieva-Hackenberg E., Schiltz E., Klug G. Dehydrogenases from all three domains of life cleave RNA. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, no. 48, pp. 46145–46150. doi: 10.1074/jbc.M208717200.
12. Nelson D.L., Cox M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. N. Y.: W.H. Freeman & Comp., 2008, 1158 p.
13. Tsatsanis C., Spandidos D.A. The role of oncogenic kinases in human cancer (Review). *Int. J. Mol. Med.*, 2000, vol. 5, no. 6, pp. 583–590.
14. Uniprot Resource of protein sequence and functional information. 2013. Available at: <http://www.uniprot.org>.
15. Prosite Database of protein domains, families and functional sites. 2013. Available at: <http://prosite.expasy.org>.
16. Scheeff E.D., Eswaran J., Bunkoczi G., Knapp S., Manning G. Structure of the pseudokinase VRK3 reveals a degraded catalytic site, a highly conserved kinase fold, and a putative regulatory binding site. *Structure*, 2009, vol. 17, no. 1, pp. 128–138. doi: 10.1016/j.str.2008.10.018.

17. Wolanin P.M., Thomason P.A., Stock J.B. Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol.*, 2002, vol. 3, no. 10, pp. 1–8. doi: 10.1186/gb-2002-3-10-reviews3013.
18. SIM Alignment Tool for protein sequences. 2013. Available at: <http://web.expasy.org/sim>.
19. ClustalW2 Multiple Sequence Alignment. 2013. Available at: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>.
20. SWISS-MODEL protein structure homology-modeling server. 2013. Available at: <http://www.swissmodel.expasy.org>.
21. Polyakov K.M., Lebedev A.A., Okorokov A.L., Panov K.I., Schulga A.A., Pavlovsky A.G., Karpeisky M.Y., Dodson G.G. The structure of substrate-free microbial ribonuclease binase and of its complexes with 3'GMP and sulfate ions. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 2002, vol. 58, no. 5, pp. 744–750. doi: 10.1107/S0907444902003207.
22. Min X., Lee B.-H., Cobb M.H., Goldsmith E.J. Crystal structure of the kinase domain of WNK1, a kinase that causes a hereditary form of hypertension. *Structure*, 2004, vol. 12, no. 7, pp. 1303–1311. doi: 10.1016/j.str.2004.04.014.
23. Mukherjee K., Sharma M., Urlaub H., Bourenkov G.P., Jahn R., Südhof T.C., Wahl M.C. CASK Functions as a Mg²⁺-independent neurexin kinase. *Cell*, 2008, vol. 133, no. 2, pp. 328–339. doi: 10.1016/j.cell.2008.02.036.
24. Jaleel M., Saha S., Shenoy A.R., Visweswariah S.S. The kinase homology domain of receptor guanylyl cyclase C: ATP binding and identification of an adenine nucleotide sensitive site. *Biochemistry*, 2006, vol. 45, no. 6, pp. 1888–1898. doi: 10.1021/bi052089x.

Received
May 26, 2013

Nesmelov Aleksandr Aleksandrovich – Research Fellow, Department of Microbiology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: nesmelov@gmail.com

Markelova Mariya Ivanovna – Student, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: mimarkelova@gmail.ru

Kolpakov Aleksei Ivanovich – PhD in Biology, Head of the Laboratory of Biosynthesis and Biological Engineering of Enzymes, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: alexei.kolpakov@kpfu.ru

Ilinskaya Olga Nikolaevna – Doctor of Biology, Professor, Head of the Department of Microbiology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: Olga.Ilinskaya@kpfu.ru