

УДК 577.15:616.155.392

ПРОТЕИНКИНАЗЫ СЕМЕЙСТВА Pim: СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ И РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ ГЕМОБЛАСТОЗОВ

© 2011 г. Ю. Н. Жукова¹, М. Г. Алексева¹, Н. В. Захаревич¹, А. А. Штиль^{1,2}, В. Н. Даниленко^{1*}

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991

²Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина Российской академии медицинских наук, Москва, 115478

Поступила в редакцию 16.11.2010 г.

Принята к печати 20.01.2010 г.

Каскады фосфорилирования — универсальный механизм контроля важнейших физиологических процессов — развития, дифференцировки, пролиферации, выживания и злокачественной трансформации клеток. В обзоре рассмотрены серин/треониновые протеинкиназы семейства Pim (от proviral integration of Moloney virus), открытые в ходе изучения экспериментальных лимфоидных опухолей. Обсуждаются данные о структуре генов этого семейства, эволюционных особенностях и механизмах фосфорилирования субстратов, а также роль наиболее важного представителя семейства — Pim-1, в патогенезе опухолей системы крови. Представители семейства Pim поддерживают выживание и пролиферацию опухолевых клеток: Pim-1 не нуждается в активации другим партнером (активируется посредством аутофосфорилирования), а субстраты этой протеинкиназы позитивно регулируют клеточный цикл. Pim-1 усиливает онкогенные эффекты онкобелка c-Myc и наряду с протеинкиназой Akt способствует снижению гибели клеток. Обосновано представление о семействе Pim как о новых мишенях для терапии лейкозов и лимфом. Рассмотрена оригинальная тест-система для фенотипического скрининга ингибиторов протеинкиназ семейства Pim, основанная на чувствительности к канамицину штамма *Escherichia coli*, в котором экспрессированы исследуемая протеинкиназа и аминокликозид-3'-фосфотрансфераза типа VIII: ингибирование фосфорилирования с помощью фармакологических препаратов усиливает гибель тест-бактерий.

Ключевые слова: серин/треониновые протеинкиназы, семейство протеинкиназ Pim, фосфорилирование, структура генов, структура белков, тест-системы, гемобласты.

THE Pim FAMILY OF PROTEIN KINASES: STRUCTURE, FUNCTIONS AND ROLES IN HEMATOPOIETIC MALIGNANCIES, by Yu. N. Zhukova¹, M. G. Alekseeva¹, N. V. Zakharevich¹, A. A. Shtil'^{1,2}, V. N. Danilenko^{1*} (¹Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; *e-mail: valerid@vigg.ru; ²Blokhin Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478 Russia). Phosphorylation is the universal regulatory mechanism in key physiological processes such as development, cell differentiation, proliferation, survival and malignant transformation. In this review we analyze serine/threonine protein kinases of the Pim (proviral integration of Moloney virus) family that have been initially discovered in experimental lymphomas. We provide data on gene structure, evolution, functions and substrates of Pim protein kinases. Focusing on Pim-1 as the major isoform, we analyze its role in the biology of hematopoietic malignancies. Pim-1 is a pro-proliferative and pro-survival protein kinase. It is constitutively active due to autophosphorylation, and its downstream partners positively regulate the cell cycle. Pim-1 cooperates with c-Myc oncoprotein in leukemogenesis; furthermore, Pim-1, like the Akt protein kinase, prevents cell death. Thus, Pim kinases are regarded as new therapeutic targets. Finally, we present an original test system for screening of Pim inhibitors. In this test system the growth of a genetically engineered *Escherichia coli* strain in the presence of kanamycin is dependent on the phosphorylation of aminoglycoside-3' phosphotransferase VIII by Pim-1: pharmacological inhibition of this phosphorylation increases the bacterial cell lysis.

Keywords: serine/threonine protein kinases; Pim kinase family; phosphorylation; gene structure; protein structure; test systems; hematopoietic malignancies.

Принятые сокращения: AML (acute myeloblastic leukemia) — острый миелоидный лейкоз; MoMuLV (Moloney murine leukemia virus) — вирус лейкоза мышей Молони; JAK — тирозинкиназы семейства Janus; PP2A (protein phosphatase 2A) — протеинфосфатаза 2A; NuMA (nuclear mitotic apparatus protein) — ядерный белок митотического аппарата; IL (interleukin) — интерлейкин; EBV (Epstein-Barr virus) — вирус Эпштейна-Барр; KSHV (Kaposi sarcoma associated herpesvirus) — герпесвирус, ассоциированный с саркомой Капоши; NHL (non-Hodgkin lymphoma) — неходжкинская лимфома; DLBCL (diffuse large B-cell lymphomas) — диффузная крупноклеточная лимфома из В-клеток; DBA (Diamond-Blackfan anemia) — анемия Даймонда-Блэкфана; STPK (Serine/threonine protein kinases) — серин/треониновые протеинкиназы; 4E (e1E-4E) — эукариотический фактор инициации трансляции; 4E-BP1 — 4E-связывающий белок-1; mTOR (mammalian target of rapamycin) — мишень действия рапамицина у млекопитающих; CXCR-4 (chemokine receptor type 4) — рецептор хемокинов типа 4.

* Эл. почта: valerid@vigg.ru

Около 15 лет назад, изучая вирусный канцерогенез у мышей, впервые обнаружили ген *pim-1* как область интеграции провируса лейкоза мышей Молони (MoMuLV, Moloney murine leukemia virus). Локусы, несущие *pim-1* и гены факторов транскрипции *c-myc* и *gf1*, определены как сайты частой инсерции ретровируса MoMuLV в Т-лимфомах мышей [1, 2]. Эти открытия позволили считать *pim-1* протоонкогеном. Вместе с тем, мыши с нокаутом гена *pim-1* не имели выраженных отличий от интактных животных. Одно из объяснений этому — существование других белков, выполняющих функции продукта гена *pim-1*. Действительно, изучение гомологии нуклеотидных последовательностей указывало на существование семейства белков [3]. Протеинкиназы семейства Pim высоко консервативны у позвоночных; они характеризуются высокой гомологией первичных структур белков и кодирующих их генов [3].

В последние годы опубликованы обзоры [4–7], посвященные Pim-киназам как мишеням для лекарственных средств. Обобщены результаты химического синтеза и скрининга ингибиторов этих белков, изучена роль протеинкиназ семейства Pim в патогенезе заболеваний человека. В представленном обзоре приведен сравнительный анализ структуры эукариотических Pim-киназ и их ближайших аналогов у бактерий. Рассмотрены механизм фосфорилирования белков посредством Pim и роль опосредованной Pim передачи сигналов в физиологических и патологических процессах, происходящих в системе крови (на экспериментальных моделях и клинических примерах гемобластозов), а также предложена новая бактериальная тест-система для скрининга ингибиторов протеинкиназ семейства Pim.

СТРУКТУРА ГЕНОВ И БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА Pim, ЭКСПРЕССИЯ В ТКАНЯХ

Три изоформы протеинкиназ семейства Pim кодируются отдельными генами. У человека ген *Pim-1* локализован на хромосоме бр21.1-p21.31, а ген *pim-1* мыши — на хромосоме 17. Ген *Pim-1* длиной примерно 5000 п.н. состоит из шести экзонов и пяти интронов. Длина транскрипта — 2684 н. (NM_002648). Промотор гена *Pim-1* обогащен GC-парами и не содержит ТАТА- и СААТ-боксов [8]. По нуклеотидной последовательности кДНК предсказали, что ген *Pim-1* и его гомолог у мыши кодируют белок из 313 аминокислотных остатков (молекулярная масса 34 кДа). Ген *pim-2*, локализованный на хромосоме Хр11, состоит из шести экзонов, а его продукт имеет 53% гомологии на уровне аминокислотных последовательностей с Pim-1 и транслируется преимущественно с альтернативных (не-AUG) инициаторных кодонов, в результате чего образуются три изоформы белка [9]. Ген *pim-3* находится на длинном плече хромосомы 22, он кодирует серин-треонино-

вую протеинкиназу (STPK), имеющую более 60% гомологии с Pim-1 и Pim-2 [10].

Изучение альтернативных сайтов инициации трансляции в мРНК гена *pim-1* мыши показало, что в результате альтернативной инициации образуются два белка — 34 и 44 кДа [11]. Белок 44 кДа содержит N-концевой фрагмент белка 34 кДа и синтезируется с вышележащего кодона CUG. Вследствие подобной двойной инициации с одной рамки считывания могут образоваться два функционально различных продукта [12]. Кроме того, инициация с вышележащего стартового кодона может играть регуляторную роль, что показано для открытых рамок считывания, часто обнаруживаемых в строго регулируемых генах [13]. Именно такая регуляция предполагается для *pim-1*, поскольку синтез белка 44 кДа неконсервативен у человека и мыши [11]. Подобно белкам 34 кДа человека и грызунов, белок 44 кДа мыши также обладает активностью STPK [11]. Белок Pim-1 с мол. массой 44 кДа более стабилен, чем его аналог с мол. массой 34 кДа: периоды их полужизни составляют 1 ч и 10 мин соответственно [11].

Ген *Pim-1* человека и его мышинный гомолог экспрессируются преимущественно в лимфоидных тканях в виде транскриптов длиной 2.8–2.9 т.н. [14]; более короткие транскрипты обнаружены в семенниках [15]. Pim-1 первоначально нашли в цитоплазме [11], а позднее и в ядрах [16, 17] нормальных и трансформированных клеток. *Pim-1* экспрессируется в опухольных системах крови, органов головы и шеи, желудка, в предстательной железе, а *Pim-2* — во многих тканях, главным образом, в головном мозге и лимфоидных клетках. Pim-2, подобно Pim-1, активирован при с-Myc-индуцированном лимфомогенезе [9]. *Pim-3* также экспрессируется во многих тканях, преимущественно в почках, молочной железе и головном мозге [10].

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РОДСТВО Pim-1 ЧЕЛОВЕКА И ДРУГИХ ОРГАНИЗМОВ

Среди STPK прокариот наибольшую гомологию с каталитическим доменом протеинкиназы Pim-1 *Homo sapiens* ($\geq 30\%$ идентичности) имеют STPK SERP0786 *Staphylococcus epidermidis*, pknB *S. carnosus*, prkC *Bacillus clausii* и pk10 *Streptomyces coelicolor*. Гомология Pim-1 среди высших эукариот (*H. sapiens*, *Canis lupus familiaris*, *Bos taurus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* и *Danio rerio*) [GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene?term=PIM1>] составляет 72–99%. На рис. 1 представлено филогенетическое дерево указанных протеинкиназ. Получены данные, свидетельствующие об удаленности бактериальных STPK от протеинкиназы Pim-1 человека. Это важное обстоятельство открывает возможности создания селективных ингибиторов бактериальных STPK, гомологов Pim-1 (см. ниже).

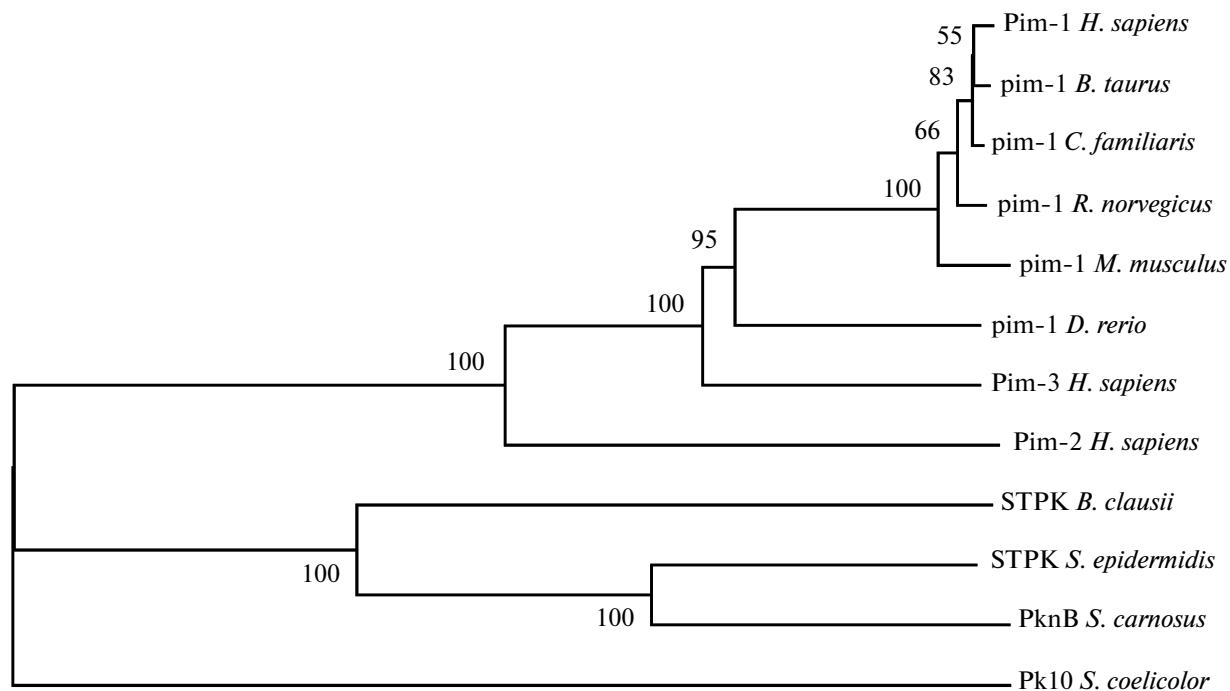


Рис. 1. Филогенетическое дерево протеинкиназы Pim-1 высших эукариот и наиболее близких по структуре бактериальных STPK. Представлены Pim-1 эукариот (*Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Canis familiaris*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Danio rerio*) и Pim-подобные киназы прокариот (*Streptomyces coelicolor*, *Bacillus clausii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus carnosus*).

АДЕНОЗИНСВЯЗЫВАЮЩИЙ КАРМАН У Pim-1 Homo sapiens И ЕГО ГОМОЛОГОВ ИЗ ВЫСШИХ ЭУКАРИОТ И АНАЛОГОВ У БАКТЕРИЙ

Согласно данным рентгеноструктурного анализа [18], в молекуле Pim-1 можно выделить две части: N-концевую, состоящую из антипараллельных β-слоев, и C-концевую, представленную α-спиралями (рис. 2а). Эти части соединены петлей (“шарниром”, аминокислотные остатки 121–126) с общей для всех изоформ консенсусной последовательностью ERXPX (где X – любой аминокислотный остаток), уникальной для всех членов семейства Pim (у Pim-1 это ERPEPV). Для анализа свойств и создания эффективных ингибиторов гомологов Pim-1 [6, 7] наиболее важны область петли и аденозинсвязывающий карман. На рис. 2б представлена кристаллическая структура Pim-1 в комплексе с ингибитором – флавоноидом кверцететином [19]. Во взаимодействии с ингибитором участвуют аминокислотные остатки АТР-связывающего кармана фермента. В данной кристаллической структуре это остаток Glu121 в петле, боковые цепи высококонсервативных остатков – Lys67 и Glu89 и остаток Arg122 (рис. 2б).

Определены аминокислотные остатки каталитического домена, участвующие в связывании АТР [20]. С использованием набора из 38 аминокислотных остатков, способных взаимодействовать с конкурентными ингибиторами АТР, определен АТР-

связывающий карман протеинкиназ человека с известной трехмерной структурой [21]. Многие из этих остатков консервативны, поэтому для первичной оценки использовали набор из девяти аминокислотных остатков [22], которые участвуют в связывании АТР и не являются инвариантными. В таблице показаны различия в АТР-связывающем сайте протеинкиназ семейства Pim у высших эукариот и бактериальных STPK. Именно в шарнирной области аденозинсвязывающий карман Pim-1 значительно отличается от STPK бактерий (позиции IV–VII).

У протеинкиназ высших эукариот наблюдается сходство аминокислотных остатков в лигандсвязывающих областях каталитических доменов. АТР-связывающие карманы у Pim и STPK бактерий несколько отличаются: из девяти рассматриваемых аминокислотных остатков не совпадают от четырех до шести (таблица). Эти различия объясняются вариабельностью данной области, а также уникальностью шарнирной области у протеинкиназ семейства Pim эукариот. По классификации протеинкиназ человека (The Human Kinome) семейство Pim относится к группе кальмодулин-зависимых киназ (calmodulin kinase, САМК). В кладу протеинкиназ Pim-1–Pim-3 не входят представители других семейств.

Наибольший интерес представляет сравнительное изучение структуры Pim-1 *H. sapiens* и ее гомолога у *Mus musculus*, так как белок мышцы служит модельным объектом в доклинических исследованиях

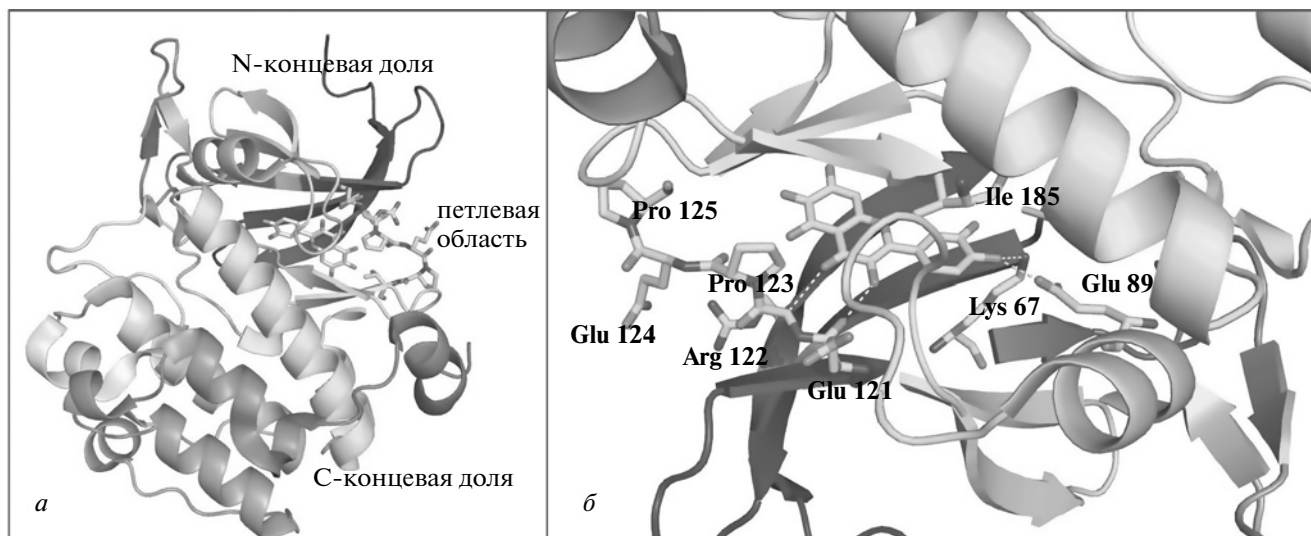


Рис. 2. Кристаллическая структура Pim-1 в комплексе с кверцетагином (PDB-код 2O64). *a* – Полноразмерная структура Pim-1. *б* – Комплекс Pim-1 с ингибитором в аденозинсвязывающем кармане. Отмечены аминокислоты, взаимодействующие с ингибитором, и некоторые аминокислоты аденозинсвязывающего кармана. Пунктирными линиями показаны водородные связи между ингибитором и аминокислотами активного центра.

лекарственных препаратов. В аденозинсвязывающем кармане Pim-1 человека и мыши полностью идентичны 38 аминокислотных остатков, выделенных согласно [21].

РЕГУЛЯЦИЯ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ ФУНКЦИИ Pim

В отличие от других STPK, в частности, от митоген-активируемой протеинкиназы, протеинкиназ А, В (Akt) и С, Pim-1 не нуждается в активации другими протеинкиназами. Анализ кристаллической структуры Pim-1 показал, что фермент содержит

консервативный каталитический домен, но в нем нет регуляторного домена. Это конститутивно активная протеинкиназа, фосфорилирование которой способствует ее стабильности, но не является необходимым для регуляции каталитической активности [23]. Негативная регуляция стабильности Pim фосфатазой 2А (PP2A) предполагает, что аутофосфорилирование и/или фосфорилирование пока не известными партнерами могут быть важными регуляторами активности Pim [24].

Изучение специфичности аминокислотных последовательностей субстратов Pim-1 показало, что эта киназа предпочитает пептиды с мотивом

Сравнение аминокислотных остатков аденозинсвязывающего кармана Pim-1 высших эукариот и бактериальных STPK

Организм	Позиции аминокислотных остатков										
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX		
<i>Homo sapiens</i>	Pim1	L	V	A	S	E	P	E	L	I	Eukaryota
	Pim2	L	V	A	I	E	P	L	L	I	
	Pim3	L	V	A	I	E	P	E	L	I	
<i>Bos taurus</i>	L	V	A	S	E	P	E	L	I		
<i>Canis familiaris</i>	L	V	A	S	E	P	E	L	I		
<i>Rattus norvegicus</i>	L	V	A	S	E	P	E	L	I		
<i>Mus musculus</i>	L	V	A	S	E	P	E	L	I		
<i>Danio rerio</i>	L	V	A	R	E	P	E	L	I		
<i>Streptomyces coelicolor</i>	L	V	A	A	T	F	I	L	I	Prokaryota	
<i>Bacillus clausii</i>	I	V	A	V	M	Y	V	L	T		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	L	V	A	V	M	Y	I	L	F		

Примечание. Выделены аминокислотные остатки, отличающиеся у Pim-1 эукариот и бактериальных STPK.

K/R3-X-S/T (где X – аминокислотные остатки, содержащие основные группы или большие гидрофобные группы) [25]. В результате скрининга пептидных библиотек выявлена консенсусная последовательность ARKRRRHPSGPPTA, которая с низким сродством связывается с протеинкиназами семейства Pim [26, 27]. Масс-спектрометрический анализ *pim-1 Xenopus laevis* позволил идентифицировать потенциальные сайты аутофосфорилирования – Ser190 и Thr205, консервативные в семействах Pim у изученных видов [28]. Правомерно предположить, что аутофосфорилирование Pim-1 человека и ее гомологов у грызунов происходит именно в этих сайтах.

ФУНКЦИИ Pim-1 В КЛЕТКАХ ЭУКАРИОТ

Регуляция клеточного цикла

Поиск субстратов Pim-1 позволил выявить белки-партнеры, важные для регуляции клеточного цикла и выживания или гибели клеток. Так, субстратами Pim-1 являются ядерный адапторный белок p100 – активатор фактора транскрипции c-Myc [29] и фактор транскрипции NFAT, участвующий в передаче сигналов при активации Т-лимфоцитов [30]. Проапоптотический белок Bad взаимодействует с Pim-1, что приводит к фосфорилированию остатка Ser112 в белке Bad и его инактивации. Эти данные указывают на важную роль Pim-1 в защите клеток от гибели, так как инактивация Bad может усиливать функцию антиапоптотического белка Bcl-2 [31]. Противоапоптотическое действие Pim-1 подтверждено в нескольких независимых экспериментальных системах [32].

Прямое участие Pim-1 в клеточном цикле подтверждается связыванием Pim-1 с фосфатазой Cdc25A – позитивным регулятором фазы G1, в результате чего Cdc25A подвергается фосфорилированию [33], усиливается ее фосфатазная активность и ускоряется переход клеток из фазы G1 в S. Кроме того, Pim-1 фосфорилирует и инактивирует циклинзависимую протеинкиназу p21^{Waf}, способствуя переходу G1-S [34].

Функции Pim-1 в клеточном цикле не ограничиваются регуляцией G1-S-перехода. Pim-1 фосфорилирует белок NuMA (nuclear mitotic apparatus protein), участвующий в организации веретена деления [35]. Белки Tak1 и Cdc25C также служат субстратами Pim-1 [36]. Оба белка важны для перехода клеток из фазы G2 в митоз. Tak1 функционирует как киназа, ингибирующая фосфатазу Cdc25C [37], которая, в свою очередь, стимулирует переход G2-M. По-видимому, Pim-1 может фосфорилировать оба белка, инактивируя Tak1 и активируя Cdc25C. В обоих случаях стимулируется G2-M-переход.

РОЛЬ Pim-1 В ВЫЖИВАЕМОСТИ, ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ КЛЕТОК

Поскольку протеинкиназы семейства Pim играют существенную роль в выживаемости клеток и фосфорилируют общие субстраты [38], не удивительно, что у мышей с нокаутом трех генов *pim* наблюдается выраженное уменьшение размеров тела и дефекты передачи сигналов, сопровождающиеся нарушением пролиферации Т-лимфоцитов [3]. Вместе с тем, такие мыши жизнеспособны и фертильны.

Выше сказано, что Pim-1 защищает клетки от апоптоза [31, 32]; этот механизм способствует злокачественной трансформации клеток [39]. При лимфогенезе Pim-1 функционирует кооперативно с антиапоптотическим белком Bcl-2 [40] и ингибитором апоптоза Gfi-1 [41]. Эти важнейшие вопросы подробно рассмотрены в обзорах [6, 42].

Pim-1 регулирует дифференцировку клеток. Показана гиперэкспрессия мРНК *Pim-1* в печени и селезенке плода человека в ходе гемопоэза [43]. В отличие от этого у взрослых выявлена лишь незначительная экспрессия *Pim-1* в циркулирующих гранулоцитах. Эмбриоспецифичная экспрессия *Pim-1* свидетельствует об участии этой протеинкиназы в нормальном созревании клеток крови и о возможной связи Pim-1 с нарушениями гемопоэза при лейкозах [43]. Уровень активности протеинкиназы Pim-1 определяет размер ранних В-клеточных компартментов в костном мозге. У мышей с дефицитом *pim-1* количество ранних В-клеток уменьшается, а число зрелых В-клеток в костном мозге остается нормальным. При гиперэкспрессии *pim-1* наблюдается противоположная картина – количество ранних предшественников В-клеток возрастает, а число зрелых В-клеток снижается [44]. Гиперэкспрессия *pim-1* способствует образованию линий ранних лимфоидных клеток, зависимых от факторов роста, по-видимому, эти клоны элиминируются при дифференцировке [44].

Значение семейства Pim при гемобластозах

Роль Pim-1 в неоплазиях системы крови выявлена при изучении вирусиндуцированных Т-лимфом [1, 2]. Показано, что Pim-1 опосредует развитие В-клеточной неходжкинской лимфомы (NHL) [45], диффузной В-клеточной лимфомы [46], лимфомы Беркитта [47] и мантийно-клеточной лимфомы [48]. У трансгенных мышей, несущих ген *pim-1* под транскрипционным контролем энхансера генов иммуноглобулинов, развивались Т-клеточные лимфомы, хотя и с низкой частотой (5–10%) и длительной латентностью (~7 мес) [49]. Онкогенный потенциал *pim-1* зависит от дозы гена [50]. У гомозиготных трансгенных мышей *Em-pim-1* частота возникновения лимфом (40% в течение 1 года) вы-

ше, чем у гетерозиготных (5–10% за этот же период времени) [51]. Подобный дозозависимый эффект отмечен и у мышей с генотипом *pim-1*^{-/-}, более устойчивых к MoMuLV-индуцированному лимфомогенезу, чем мыши с одним нефункционирующим аллелем *pim-1* [51].

Низкая частота возникновения и высокая латентность развития лимфом у *pim-1*-трансгенных мышей указывают на то, что гиперэкспрессия *pim-1* недостаточна для трансформации клеток. Однако, если мыши *Eμ-pim-1* подвергались воздействию вирусов, химических канцерогенов или ионизирующего излучения, то развитие лимфом значительно ускорялось [49] и в большинстве случаев коррелировало с активацией одного из онкогенов семейства *mys*. У мышей *Eμ-mys* в 35% MoMuLV-индуцированных опухолей выявлена инсерция провируса около локуса *pim-1* [45]. У всех битрансгенных мышей *mys/pim-1* отмечалось существенное ускорение лимфомогенеза по сравнению с монотрансгенными родительскими линиями [52]. В дальнейшем были обнаружены онкогены *tiam-1*, *gfi-1*, *frat-1* и *runx-2*, продукты которых действуют кооперативно с *pim-1* при лимфомогенезе [53–56]. Ускорение развития опухолей наблюдалось и при обратном скрещивании *pim-1*- и *bcl-2*-трансгенных мышей [57].

Pim-1 может усиливать активность фактора транскрипции *c-Myc*, фосфорилируя его коактиватор p100 [29]. Как и *Pim-1*, *c-Myc* экспрессируется в ходе гемопоэза и участвует в активации JAK в ответ на многие цитокины [29]. Важно отметить, что в ходе канцерогенеза *c-Myc* и *c-Mus* действуют как партнеры [58]. Таким образом, кооперативный эффект *Pim-1*, *c-Mus* и *c-Myc* способствует формированию и поддержанию трансформированных фенотипов.

Некоторые В-клеточные лимфопролиферативные заболевания связаны с латентной инфекцией вирусом Эпштейна-Барр (EBV) или с герпесвирусом саркомы Капоши (KSHV). При инфицировании EBV первичных В-лимфоцитов возрастает уровень мРНК *Pim*, а высокий уровень белка *Pim* способствует активации вирусного трансактиватора EBNA2 [47]. В результате изучения киношной библиотеки установлено, что *Pim-1* и *Pim-3* – важнейшие факторы реактивации латентной инфекции KSHV [59].

Для NHL характерны хромосомные транслокации, приводящие к нарушению экспрессии ряда протоонкогенов. Как и гены варибельной области иммуноглобулинов при нормальном развитии В-клеток, более 50% диффузных крупноклеточных лимфом (DLBCL) содержат соматические гипермутации, затрагивающие многие области генома, включая протоонкогены *c-Myc*, *RhoH*, *PAX5* и *Pim-1* [60]. Обычно эти мутации локализуются в 5'-нетранслируемой или в кодирующей области генов и не зависят от хромосомных транслокаций. Некото-

рые соматические гипермутации, затрагивающие *Pim-1*, обнаружены также в NHL из фолликулярных клеток, HIV-ассоциированной NHL и мантийноклеточной лимфоме [60].

Мутации в гене, кодирующем рибосомный белок S19, обнаружены у ~25% больных анемией Даймонда-Блэкфана (Diamond-Blackfan, DBA). DBA – врожденный синдром недостаточности функций костного мозга, выражающийся в макроцитарной анемии в первый год жизни и повышенной частоте развития опухолей [61]. Возможное взаимодействие с белком S19 и его фосфорилирование в рибосомах протеинкиназой *Pim-1* позволяют предположить, что на размер эритроцитов влияет доза гена: эритроциты мышей *pim*^{-/-} более мелкие, чем у животных, у которых экспрессия экзогенного *pim-1* находилась под контролем энхансера гена иммуноглобулина [62]. Хотя в белке S19 аминокислотные остатки, фосфорилируемые *Pim-1*, и не картированы, большинство миссенс-мутаций затрагивают область этого белка, обогащенную остатками серина и треонина и служащую мишенью STPK [61]. Для выявления роли *Pim-1* в возникновении DBA в отсутствие мутаций в S19 проведен скрининг мутаций в гене *Pim-1* у 99 больных DBA. Обнаружены две миссенс-мутации – Pro311Thr (C/A) и Cys17Thr (G/A) [62]. Эти мутации локализуются только в 5'- и 3'-концевых областях гена *Pim-1*, и их функциональные последствия изучаются.

Экспрессия С-Х-С хемокинового рецептора 4 (CXCR-4) на поверхности опухолевых клеток может рассматриваться как независимый прогностический маркер рецидива острого миелоидного лейкоза (AML) [63]. Корреляция между гиперэкспрессией *Pim-1* и экспрессией CXCR-4 обнаружена в бластных клетках больных AML. Обработка этих клеток *ex vivo* низкомолекулярными ингибиторами *Pim* снижала экспрессию CXCR-4 у четырех из шести больных. Эти наблюдения позволили предположить, что *Pim-1* регулирует хоминг и миграцию лейкозных клеток, модулируя экспрессию CXCR-4 [64].

В бластных клетках больных AML наряду с *Pim-1* активно экспрессируется и *Pim-2* [65]. Недавно *Pim-2* (но не *Pim-1*) была идентифицирована как протеинкиназа, фосфорилирующая 4E-BP1, что приводит к mTOR-независимому контролю трансляции в опухолевых клетках при AML. Вероятно, ингибитор *Pim-2* способен блокировать рапамицин-нечувствительную трансляцию онкобелков [65]. *Pim-2* также экспрессируется в предшественниках В-лимфоцитов и участвует в регуляции гомеостаза В-клеток [66]. Кроме того, гиперэкспрессия *Pim-2* ассоциирована с В-клеточными опухолями – хроническим лимфоидным лейкозом, DLBCL, мантийно-клеточной лимфомой и множественной миеломой [67]. Способность *Pim-2* поддерживать выживаемость лимфоидных клеток за-

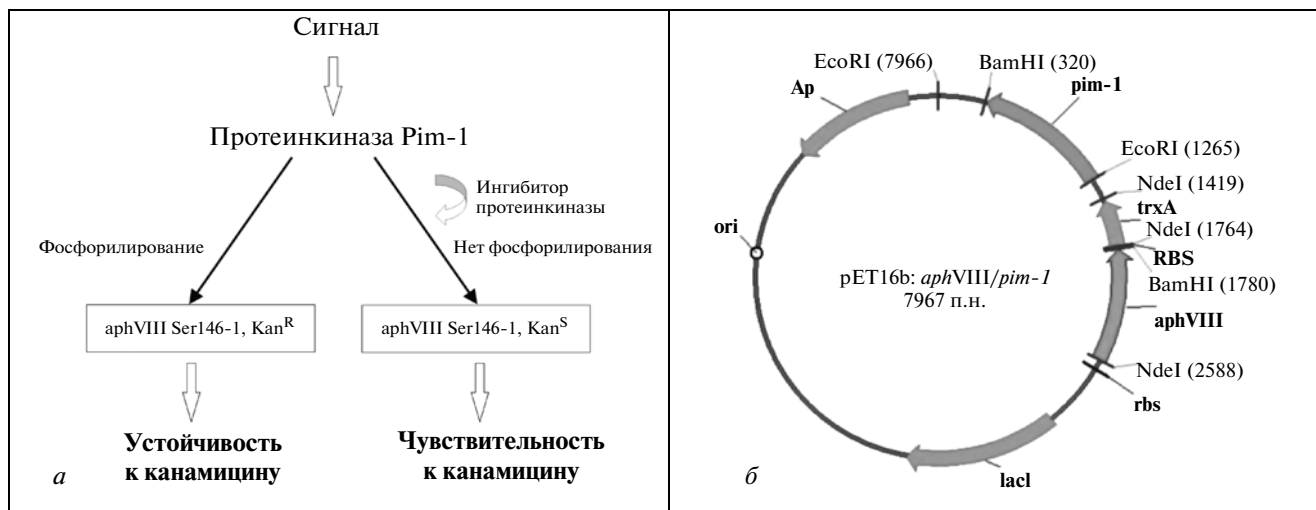


Рис. 3. Бактериальная тест-система *E. coli aphVIII/Pim-1* для скрининга ингибиторов STPK. *a* – Принцип тест-системы: фосфорилирование aphVIII по Ser146 посредством Pim-1 приводит к устойчивости штамма *E. coli/aphVIII^R/Pim-1^R* к канамицину; добавление ингибитора STPK препятствует фосфорилированию aphVIII и снижает устойчивость к канамицину. *б* – Экспрессионный вектор pET16b, объединяющий фрагменты генов *Pim-1* и *aphVIII*.

висит, в частности, от активации ядерного фактора NF-κB протеинкиназой Cot/Trp2 [68].

БАКТЕРИАЛЬНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ СКРИНИНГА ИНГИБИТОРОВ STPK (НА ПРИМЕРЕ Pim-1)

Нами разработана тест-система [69], позволяющая проводить недорогой скрининг десятков низкомолекулярных соединений на способность модулировать активность STPK эукариотического типа у бактерий и человека. Принцип тест-системы состоит в следующем: чувствительность штаммов *Streptomyces* к аминогликозидным антибиотикам (например, канамицину) опосредуется STPK, регулирующей аминогликозид-3'-фосфотрансферазу типа VIII (aphVIII) – фермент, инактивирующий канамицин [70]. Белок aphVIII содержит остаток Ser146 – потенциальный сайт, фосфорилируемый STPK *S. lividans* [71]. Фосфорилирование aphVIII по этому сайту повышает устойчивость *S. lividans* к канамицину [72]. В штамме *S. lividans* ТК24 идентифицированы 32 гена STPK. По крайней мере одна STPK – pkl-08 [73] (гомолог pkl25 *S. coelicolor*) – способна фосфорилировать aphVIII. Выживание бактерий в присутствии канамицина – феномен, регулируемый фосфорилированием aphVIII, – можно использовать для тестирования способности химических соединений подавлять активность протеинкиназ, фосфорилирующих aphVIII. В отсутствие ингибитора STPK aphVIII фосфорилирован, и бактерии устойчивы к относительно высокой концентрации канамицина. При добавлении ингибитора STPK фосфорилирование aphVIII снижается или

отсутствует, и бактерии более чувствительны к антибиотику (рис. 3а). Канамицин и модулятор STPK наносятся на бумажный диск в субингибирующих концентрациях [73]. Тест-система валидирована с использованием производных бис-индолилмалеимида – известных ингибиторов STPK. Таким образом, тест-система позволяет проводить фенотипический скрининг ингибиторов протеинкиназ путем несложного измерения зоны лизиса бактерий.

Известно, что штаммы *E. coli* не содержат STPK эукариотического типа. Это дает возможность сконструировать клеточную систему для тестирования ингибиторов протеинкиназ, основанную на фосфорилировании aphVIII. В такой системе сайт фосфорилирования aphVIII может быть адаптирован к исследуемой протеинкиназе. Мы сконструировали бицистронный вектор на основе плазмиды pET16b, который содержит фрагменты ДНК, кодирующие Pim-1 и aphVIII (рис. 3б). Сайт-направленный мутагенез в окружении остатка Ser146 aphVIII позволяет оптимизировать этот сайт для наиболее эффективного фосфорилирования протеинкиназой Pim-1. Чувствительность к канамицину штамма *E. coli/Pim-1⁺/aphVIII⁺*, в котором экспрессируются одновременно *Pim-1* и *aphVIII*, зависит от фосфорилирования aphVIII протеинкиназой Pim-1. Сконструированный штамм можно использовать для прескрининга низкомолекулярных соединений – предполагаемых ингибиторов Pim-1.

STPK семейства Pim регулируют важнейшие биологические процессы – клеточный цикл, выживание, злокачественную трансформацию. В физиологических условиях сигнальные каскады с участием этих ферментов, самостоятельно или в коопера-

ции с другими путями передачи внутриклеточных сигналов, могут рассматриваться как “анаболические”. Они активируют пролиферацию и снижают долю гибнущих клеток, способствуя морфо- и гистогенезу. При озлокачествлении клеток эти функции протеинкиназ семейства Pim приобретают клинически неблагоприятное значение, и борьба с опухолью требует подавления Pim-зависимого фосфорилирования. Подобная стратегия проходит испытания при гемобластозах и некоторых солидных опухолях [6, 7]. Роль аналогов этих протеинкиназ у прокариот изучена недостаточно. Недавние исследования показывают, что эпигенетические механизмы, в частности, фосфорилирование посредством STPK эукариотического типа, важны для регуляции устойчивости бактерий к стрессовым воздействиям, формирования микробных сообществ, вирулентности и др. [73]. Следовательно, актуальным становится создание ингибиторов протеинкиназ семейства Pim, эффективных при онкологических и инфекционных заболеваниях. Анализ структуры белков Pim у отдельных видов позволяет полагать, что эта задача может быть решена с использованием особенностей строения киназ-мишеней и широкомасштабных испытаний библиотек соединений разных химических классов.

Работа поддержана программой Президиума Российской академии наук “Фундаментальные науки – медицине” (проект “Конструирование тест-системы и скрининг ингибиторов серин-треониновой протеинкиназы *Streptomyces* Pk17 – модуляторов программированной гибели актинобактерий”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cuypers H.T., Selten G., Quint W., Zijlstra M., Maandag E.R., Boelens W., van Wezenbeek P., Melief C., Berns A. 1984. Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomagenesis: integration of proviruses in a distinct chromosomal region. *Cell*. **37(1)**, 141–150.
2. Selten G., Cuypers H.T., Berns A. 1985. Proviral activation of the putative oncogene Pim-1 in MuLV induced T-cell lymphomas. *EMBO J.* **4(7)**, 1793–1798.
3. Mikkers H., Nawijn M., Allen J., Brouwers C., Verhoeven E., Jonkers J., Berns A. 2004. Mice deficient for all PIM kinases display reduced body size and impaired responses to haematopoietic growth factors. *Mol. Cell. Biol.* **24(13)**, 6104–6115.
4. Bachmann M., Möröy T. 2005. The serine/threonine kinase Pim-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37(4)**, 726–730.
5. Shah N., Pang B., Yeoh K.G., Thorn S., Chen C.S., Lilly M.B., Salto-Tellez M. 2008. Potential roles for the PIM1 kinase in human cancer – a molecular and therapeutic appraisal. *Eur. J. Cancer*. **44(15)**, 2144–2151.
6. Brault L., Gasser C., Bracher F., Huber K., Knapp S., Schwaller J. 2010. PIM serine/threonine kinases in the pathogenesis and therapy of hematologic malignancies and solid cancers. *Haematologica*. **95(6)**, 1004–1015.
7. Anizon F., Shtil A.A., Danilenko V.N., Moreau P. 2010. Fighting tumor cell survival: advances in the design and evaluation of Pim inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **17(34)**, 4114–4133.
8. Reeves R., Spies G.A., Kiefer M., Barr P.J., Power M. 1990. Primary structure of the putative human oncogene, pim-1. *Gene*. **90(2)**, 303–307.
9. Allen J.D., Verhoeven E., Domen J., van der Valk M., Berns A. 1997. Pim-2 transgene induces lymphoid tumors, exhibiting potent synergy with c-myc. *Oncogene*. **15(10)**, 1133–1141.
10. Feldman J.D., Vician L., Crispino M., Tocco G., Marcheselli V.L., Bazan N.G., Baudry M., Herschman H.R. 1998. KID-1, a protein kinase induced by depolarization in brain. *J. Biol. Chem.* **273(26)**, 16535–16543.
11. Saris C.J., Domen J., Berns A. 1991. The pim-1 oncogene encodes two related protein-serine/threonine kinases by alternative initiation at AUG and CUG. *EMBO J.* **10(3)**, 655–664.
12. Kozak M. 1986. Bifunctional messenger RNAs in eukaryotes. *Cell*. **47**, 481–483.
13. Kozak M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucl. Acids Res.* **15**, 8125–8149.
14. Meeker T.C., Loeb J., Ayres M., Sellers W. 1990. The human Pim-1 gene is selectively transcribed in different hemato-lymphoid cell lines in spite of a G + C-rich housekeeping promoter. *Mol. Cell. Biol.* **10(4)**, 1680–1688.
15. Meijer D., Hermans A., von Lindern M., van Agthoven T., de Klein A., Mackenbach P., Grootegoed A., Talarico D., Delia Valle G., Grosveld G. 1987. Molecular characterization of the testis specific c-abl mRNA in mouse. *EMBO J.* **6**, 4041–4048.
16. Wang Z., Bhattacharya N., Meyer M.K., Seimiya H., Tsuruo T., Magnuson N.S. 2001. Pim-1 negatively regulates the activity of ptp-u2s phosphatase and influences terminal differentiation and apoptosis of monoblastoid leukemia cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **390(1)**, 9–18.
17. Ionov Y., Le X., Tunquist B.J., Sweetenham J., Sachs T., Ryder J., Johnson T., Lilly M.B., Kraft A.S. 2003. Pim-1 protein kinase is nuclear in Brurkitt's lymphoma: nuclear localization is necessary for its biologic effects. *Anticancer Res.* **23**, 167–178.
18. Kumar A., Mandiyan V., Suzuki Y., Zhang C., Rice J., Ysai J., Aetis D.R., Ibrahim P., Bremer R. 2005. Crystal structures of protooncogene kinase Pim1: a target of aberrant somatic hypermutations in diffuse large cell lymphoma. *J. Mol. Biol.* **348**, 183–193.
19. Holder S., Zemskova M., Zhang C., Tabrizid M., Bremer R., Neidigh J.W., Lilly M.B. 2007. Characterization of potent and selective small-molecule inhibitor of the Pim1 kinase. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 163–172.
20. Liao J. 2007. Molecular recognition of protein kinase binding pockets for design of potent and selective kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **50(3)**, 409–424.
21. Vulpetti A., Bosotti R. 2004. Sequence and structural analysis of kinase ATP pocket residues. *Il Farmaco*. **59**, 759–765.
22. Zakharevich N.V., Osolodkin D.I., Artamonova I.I., Palyulin V.A., Danilenko V.N. 2010. Structural classification of bacterial eukaryotic type serine/threonine protein kinases, biological targets for design of new drugs. Abstracts. *2nd International Congress-Partner-*

- ing&Exhibition EurasiaBio-2010 on Biotechnology and Bioenergetics*. Moscow, Russia. P. 401. Abstract.
23. Qian K.C., Wang L., Hickey E.R., Studts J., Barringer K., Peng C., Kronkaitis A., Li J., White A., Mische S., Farmer B. 2005. Structural basis of constitutive activity and unique nucleotide binding mode of human PIM1 kinase. *J. Biol. Chem.* **280**, 6130–6137.
 24. Ma J., Arnold H.K., Lilly M.B., Sears R.C., Kraft A.S. 2007. Negative regulation of Pim-1 protein kinase levels by the B56beta subunit of PP2A. *Oncogene*. **26(35)**, 5145–5153.
 25. Friedmann M., Nissen M.S., Hoover D.S., Reeves R., Magnuson N.S. 1992. Characterization of the proto-oncogene pim-1: kinase activity and substrate recognition sequence. *Arch. Biochem. Biophys.* **298(2)**, 594–601.
 26. Palaty C.K., Clark-Lewis I., Leung D., Pelech S.L. 1997. Phosphorylation site substrate specificity determinants for the Pim-1 protooncogene-encoded protein kinase. *Biochem. Cell Biol.* **75(2)**, 153–162.
 27. Bullock A.N., Debreczeni J., Amos A.L., Knapp S., Turk B.E. 2005. Structure and substrate specificity of the Pim-1 kinase. *J. Biol. Chem.* **280(50)**, 675–682.
 28. Palaty C.K., Kalmar G., Tai G., Oh S., Amankawa L., Affolter M., Aebersold R., Pelech S.L. 1997. Identification of the autophosphorylation sites of the *Xenopus laevis* Pim-1 proto-oncogene-encoded protein kinase. *J. Biol. Chem.* **272(16)**, 10514–10521.
 29. Levenson J.D., Koskinen P.J., Orrico F.C., Rainio E.M., Jalkanen K.J., Dash A.B., Eisenman R.N., Ness S.A. 1998. Pim-1 kinase and p100 cooperate to enhance c-Myb activity. *Mol. Cell.* **2**, 417–425.
 30. Rainio E.M., Sandholm J., Koskinen P.J. 2002. Transcriptional activity of NFATc1 is enhanced by the Pim-1 kinase. *J. Immunol.* **168**, 1524–1527.
 31. Aho T.L., Sandholm J., Peltola K.J., Mankonen H.P., Lilly M., Koskinen P.J. 2004. Pim-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site. *FEBS Lett.* **571**, 43–49.
 32. White E. 2003. The pims and outs of survival signaling: Role of the Pim-2 protein kinase in the suppression of apoptosis by cytokines. *Genes Dev.* **17**, 1813–1816.
 33. Losman J., Chen X.P., Jiang H., Pan P.Y., Kashiwada M., Giallourakis C., Cowan S., Foltenyi K., Rothman P. 1999. IL-4 signaling is regulated through the recruitment of phosphatases, kinases, and SOKS proteins to the receptor complex. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **64**, 405–416.
 34. Wang Z., BhattaCharya N., Mixer P.F., Wiel W., Sedivy J., Magnuson N.S. 2002. Phosphorylation of the cell cycle inhibitor p21 Cip/WAF1 by Pim-1 kinase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1593(1)**, 45–55.
 35. Bhattacharya N., Wang Z., Davitt C., McKenzie I. F., Xing P.X., Magnuson N.S. 2002. Pim-1 associates with protein complexes necessary for mitosis. *Chromosoma.* **111**, 80–95.
 36. Bachmann M., Henneman H., Xing P.X., Hoffmann I., Möröy T. 2004. The oncogenic serine/threonine Pim-1 phosphorylates and inhibits the activity of C-TAK1: A novel role of Pim-1 at the G2/M cell cycle checkpoint. *J. Biol. Chem.* **279(46)**, 48319–48328.
 37. Peng C.Y., Graves P.R., Ogg S., Thoma R.S., Byrnes M.J. 3rd, Wu Z., Stephenson M.T., Piwnica-Worms H. 1998. C-TAK1 protein kinase phosphorylates human Cdc25C on ser 216 and promotes 14-3-3 protein binding. *Cell Growth Diff.* **9**, 197–208.
 38. Amaravadi R., Thompson C.B. 2005. The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets. *J. Clin. Invest.* **115(10)**, 2618–2624.
 39. Möröy T., Grzeschiczek A., Petzold S., Hartmann K.U. 1993. Expression of Pim-1 transgene accelerates lymphoproliferation and inhibits apoptosis in lpr/lpr mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90(22)**, 10734–10738.
 40. Antonsson B., Martinou J.C. 2000. The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.* **256(1)**, 50–57.
 41. Grimes H.L., Gilks C.B., Chan T.O., Porter S., Tschlis P.N. 1996. The Gfi-1 protooncogene represses Bax expression and inhibits T-cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93(25)**, 14569–14573.
 42. Wang Z., Bhattacharya N., Weaver M., Petersen K., Meyer M., Gapter L., Magnuson N.S. 2001. Pim-1: a serine/threonine kinase with a role in cell survival, proliferation, differentiation and tumorigenesis. *J. Vet. Sci.* **2(3)**, 167–179.
 43. Amson R., Sigaux F., Przedborski S., Flandrin G., Givol D., Telerman A. 1989. The human protooncogene product p33pim is expressed during fetal hematopoiesis and in diverse leukemias. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **86(22)**, 8857–8861.
 44. Domen J., van der Lugt N.M., Acton D., Laird P.W., Linders K., Berns A. 1993. Pim-1 levels determine the size of early B lymphoid compartments in bone marrow. *J. Exp. Med.* **178(5)**, 1665–1673.
 45. Sivertsen E.A., Galteland E., Mu D., Holte H., Meza-Zepeda L., Myklebost O., Patzke S., Smeland E.B., Stokke T. 2006. Gain of chromosome 6p is an infrequent cause of increased PIM1 expression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia.* **20**, 539–542.
 46. Deutsch A., Aigelrransreiter A., Behan-Schmid C., Beham A., Linkesch W., Neumeister P. 2005. Aberrant somatic hypermutation in extranodal marginal zone B-cell lymphoma of MALT type. *Blood.* **106**. 125a-6a. Abstr 417.
 47. Rainio E.M., Ahlfors H., Carter K.L., Ruuska M., Matikainen S., Kieff E., Koskinen P.J. 2005. Pim kinases are upregulated during Epstein-Barr virus infection and enhance EBNA2 activity. *Virology.* **333**. 201–206.
 48. de Vos S., Krug U., Hofmann W. K., Pinkus G.S., Swerdlow S.H., Wachsman W., Grogan T.M., Said J.W., Koefler H.P. 2003. Cell cycle alteration in the blastoid variant of mantle cell lymphoma (ML-BV) as detected by gene expression profiling of mantle cell lymphoma (MCL) and MCL-BV. *Diagn. Mol. Pathol.* **12**, 35–43.
 49. van Lohuizen M., Veerbek S., Krompenfort P., Domen J., Sairs C., Radaszkiewicz T., Berns A. 1989. Predisposition to lymphomagenesis in pim-1 transgenic mice: cooperation with c-myc and N-myc in murine leukemia virus-induced tumors. *Cell.* **56(4)**, 673–682.
 50. Domen J., van der Lugt N.M., Laird P.W., Sairs C.J., Berns A. 1993. Analysis of Pim-1 function in mutant mice. *Leukemia.* **7**. Suppl 2. S108–S112.
 51. van der Lugt N.M., Domen J., Verhoeven E., Linders K., van der Gulden H., Allen J., Berns A. 1995. Proviral tagging in E-myc transgenic mice lacking the Pim-1

- proto-oncogene leads to compensatory activation of Pim-2. *EMBO J.* **14(11)**, 2536–2544.
52. Verbeek S., van Lohuizen M., van der Valk M., Domen J., Kraal G., Berns A. 1991. Mice bearing the E mu-myc and E mu-pim-1 transgenes develop pre-B-cell leukemia prenatally. *Mol. Cell Biol.* **11(2)**, 1176–1179.
 53. Habets G.G., Scholtes E.H., Zuydgeest D., van der Kammen R.A., Stam J.C., Berns A., Collard J.G. 1994. Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes for Rho-like proteins. *Cell.* **77(4)**, 537–549.
 54. Blyth K., Terry A., Mackay N., Vaillant F., Ball M., Cameron E.R., Neil J.C., Stewart M. 2001. Runx-2: a novel oncogenic effector revealed by on vivo complementation and retroviral tagging. *Oncogene.* **20(3)**, 295–302.
 55. Jonkers J., Korswagen H.C., Acton D., Breuer M., Berns A. 1997. Activation of a novel proto-oncogene, Frat1, contributes to progression of mouse T-cell lymphomas. *EMBO J.* **16(3)**, 441–450.
 56. Schmidt T., Karsunky H., Gau E., Zevnik B., Elsasser H.P., Moroy T. 1998. Zinc finger protein GFI-1 has low oncogenic potential but cooperates strongly with pim and myc genes in T-cell lymphomagenesis. *Oncogene.* **17(20)**, 2661–2667.
 57. Acton D., Domen J., Jacobs H., Vlaar M., Korsmeyer S., Berns A. 1992. Collaboration of pim-1 and bcl-2 in lymphomagenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **182**, 293–298.
 58. Weston K. 1999. Reassessing the role of C-MYB in tumorigenesis. *Oncogene.* **18(19)**, 3034–3038.
 59. Cheng F., Weidner-Glunde M., Varjosalo M., Rainio E.M., Lehtonen A., Schulz T.F., Koskinen P.J., Taipale J., Ojala P.M. 2009. KSHV reactivation from latency requires Pim-1 and Pim-3 kinases to inactivate the latency-associated nuclear antigen LANA. *PLoS Pathog.* **5(3)**, e1000324.
 60. Pasqualucci L., Neumeister P., Goossens T., Nanjangud G., Chaganti R.S., Küppers R., Dalla-Favera R. 2001. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature.* **412(6844)**, 341–346.
 61. Flygare J., Karlsson S. 2007. Diamond-Blackfan anemia: erythropoiesis lost in translation. *Blood.* **109(8)**, 3152–3154.
 62. Chiocchetti A., Gibello L., Carando A., Aspesi A., Secco P., Garelli E., Loreni F., Angelini M., Biava A., Dahl N., Dianzani U., Ramenghi U., Santoro C., Dianzani I. 2005. Interactions between RPS19, mutated in Diamond-Blackfan anemia, and the PIM-1 oncoprotein. *Haematologica.* **90(11)**, 1453–1462.
 63. Spoo A.C., Lubbert M., Wierda W.G., Burger J.A. 2007. CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia. *Blood.* **109(2)**, 786–791.
 64. Grundler R., Brault L., Gasser C., Bullock A.N., Dechow T., Woetzel S., Pogacic V., Villa A., Ehret S., Berridge G., Spoo A., Dierks C., Biondi A., Knapp S., Duyster J., Schwaller J. 2009. Dissection of PIM serine/threonine kinases in FLT3-ITD-induced leukemogenesis reveals PIM1 as regulator of CXCL12-CXCR4-mediated homing and migration. *J. Exp. Med.* **206(9)**, 1957–1970.
 65. Tamburini J., Green A.S., Bardet V., Chapuis N., Park S., Willems L., Uzunov M., Ifrah N., Dreyfus F., Lacombe C., Mayeux P., Bouscary D. 2009. Protein synthesis is resistant to rapamycin and constitutes a promising therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Blood.* **114(8)**, 1618–1127.
 66. Woodland R.T., Fox C.J., Schmidt M.R., Hammerman P.S., Opferman J.T., Korsmeyer S.J., Hilbert D.M., Thompson C.B. 2008. Multiple signaling pathways promote B lymphocyte stimulator dependent B-cell growth and survival. *Blood.* **111(2)**, 750–760.
 67. Hüttmann A., Klein-Hitpass L., Thomale J., Deenen R., Carpinteiro A., Nüchel H., Ebeling P., Führer A., Edelmann J., Sellmann L., Dührsen U., Dürig J. 2006. Gene expression signatures separate B-cell chronic lymphocytic leukaemia prognostic subgroups defined by ZAP-70 and CD38 expression status. *Leukemia.* **20(10)**, 1774–1782.
 68. Hammerman P.S., Fox C.J., Birnbaum M.J., Thompson C.B. 2005. Pim and Akt oncogenes are independent regulators of haematopoietic cell growth and survival. *Blood.* **105(11)**, 4477–4483.
 69. Danilenko V.N., Simonov A.Y., Lakatosh S.A., Kubbutat M.H.G., Totzke F., Schächtele C., Elizarov S.M., Bekker O.B., Printsevskaya S.S., Luzikov Y.N., Reznikova M.I., Shtil A.A., Preobrazhenskaya M.N. 2008. Search for inhibitors of bacterial and human protein kinases among derivatives of diazepines[1,4]annelated with maleimide and indole cycles. *J. Med. Chem.* **51**, 7731–7736.
 70. Елизаров С.М., Сергиенко О.В., Сизова И.А., Даниленко В.Н. 2005. Зависимость активности аминогликозид-3'-фосфотрансферазы типа VIII от серин-треонин-протеинкиназ у *Streptomyces rimosus*. *Молекуляр. биология.* **39**, 255–263.
 71. Alekseeva M.G., Elizarov S.M., Danilenko V.N. 2010. Dependence of aminoglycoside 3'-phosphotransferase APHVIII activity on the phosphorylation with serine/threonine protein kinases: the basis of test system for the screening of protein kinase inhibitors. *2nd International Congress-Partnering & Exhibition on Biotechnology and Bioenergy. World Trade Center, Moscow, Russia.* P. 215–216. Abstract.
 72. Bekker O.B., Elizarov S.M., Alekseeva M.G., Lyubimova I.K., Danilenko V.N. 2008. Ca²⁺-dependent modulation of antibiotic resistance in *Streptomyces lividans* 66 and *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology.* **77**, 559–567.
 73. Danilenko V.N., Osolodkin D.I., Lakatosh S.A., Preobrazhenskaya M.N., Shtil A.A. 2011. Bacterial eukaryotic type serine-threonine protein kinases: from structural biology to targeted anti-infective drug design. *Curr. Top. Med. Chem.* **11(11)**, 1352–1369.