# 基于弹性网络模型和微扰响应扫描的PKC-θ的 动力学和关键残基研究

#### 彭振辉,刘腊梅,李春华\*

北京工业大学化学与生命科学学院,北京

收稿日期: 2024年10月25日; 录用日期: 2024年11月17日; 发布日期: 2024年11月25日

### 摘要

PKC-θ (protein kinase C-theta)激酶能够对底物蛋白中的丝氨酸/苏氨酸进行磷酸化修饰,并参与T细胞 活化、信号转导及免疫应答等重要生理过程,与许多免疫疾病相关,因此研究PKC-θ的结构动力学及其 关键位点具有重要意义。在本工作中,我们对PKC-θ构建了弹性网络模型,并在慢运动模式下识别出了 结构中重要的功能区域。通过残基的运动相关性分析发现:N端小叶和C端大叶的运动是负相关的,这一 致于两叶间的"开合运动",有助于结合配体的稳定;此外,催化相关残基与DFG基序的运动呈正相关, 这有利于催化功能的发挥。接着,利用微扰响应扫描方法来识别变构关键残基,结果发现,高敏感性残 基对配体结合及酶的催化活性很重要。这项工作有助于加强对PKC-θ结构动力学的理解,并为设计激酶 抑制剂提供重要信息。

#### 关键词

PKC-θ, 弹性网络模型, 微扰响应扫描, 动力学

## Study on the Dynamics and Key Residues of PKC-θ Based on Elastic Network Model and Perturbation Response Scanning

#### Zhenhui Peng, Lamei Liu, Chunhua Li\*

College of Chemistry and Life Science, Beijing University of Technology, Beijing

Received: Oct. 25<sup>th</sup>, 2024; accepted: Nov. 17<sup>th</sup>, 2024; published: Nov. 25<sup>th</sup>, 2024

#### Abstract

PKC- $\theta$  (Protein Kinase C-theta) can phosphorylate the serine/threonine of substrate protein,

\*通讯作者。

participating in important physiological processes such as T cell activation, signal transduction and immune response, and related to many immune diseases. Thus, it is of great significance to study its structural dynamics and key residues. In this work, we construct PKC- $\theta$ 's elastic network model, and the important functional areas are identified based on GNM's slow motion modes. According to interresiduemotion correlations, it is found that there exists a negative motion correlation between N-lobe and C-lobe, consistent with their open-closed motion, which helps for the bound ligand's stability; in addition, there is a positive motion correlation between DFG motif and catalysis related residues, which is conducive to the catalytic function exertion. Then, the perturbation response scanning method is used to identify the key residues for allostery, and the results suggest that the key residues of high sensitivity are important for ligand binding and enzyme's catalytic activity. This work helps to strengthen the understanding of structural dynamics of PKC- $\theta$  and provides important information for kinase inhibitor design.

#### **Keywords**

PKC-θ, Elastic Network Model, Perturbation Response Scanning, Dynamics

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc. This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0). http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

ву

## 1. 引言

新型蛋白激酶 C (novel protein kinase C, nPKC)是一类能够磷酸化修饰底物丝氨酸/苏氨酸的激酶[1] [2]。nPKC包括 $\delta$ 、 $\varepsilon$ 、 $\eta$ 、v和 $\theta$ 等成员,参与多种细胞信号转导途径和生理过程[3]。其中,PKC- $\theta$ 主要 分布在免疫细胞中并参与T细胞的活化和免疫应答,其已被证明与多种疾病的发生和发展相关[4][5],是 各种T细胞介导的疾病的有吸引力的治疗靶点。

PKC-θ 由 N 端调节域和 C 端激酶结构域(催化域)组成。激酶结构域自身的磷酸化对其催化活性至关 重要[6],一系列磷酸化事件使其成熟[7],进而具有使底物蛋白磷酸化的功能。如图 1 所示,激酶结构域 为双叶折叠,N 端小叶(N-lobe)和 C 端大叶(C-lobe)间结合一个 ATP 分子,该 ATP 在磷酸化过程中充当 磷酸供体[8]。激活环(Active-loop)中含有保守的催化组件 DFG 基序(Asp-Phe-Gly),其作用是将 ATP 定位 并进行磷酸基转移。激活环通过 αC 螺旋与 N-lobe 相连,环上 Thr536 的磷酸化会导致激酶构象转变。αC 螺旋是 N-lobe 疏水口袋的一部分,在所有激酶中发挥重要的催化和调节功能[8][9]。富含甘氨酸的环(Grich loop),即三个高度保守的甘氨酸 GxGxxG 基序,是激酶核心中最动态的环。该环的主要功能是定位 腺嘌呤环,并在磷酸基的转移中发挥重要作用,其突变与多种疾病有关[10][11]。由于 PKC-θ 是很多疾 病的治疗靶点,所以其结构动力学及关键位点研究受到了广泛关注。

实验方面,Graham 等人用单克隆抗体和磷酸化特异性抗体血清方法确定了 PKC-θ 的磷酸化位点 Thr538、Ser676 和 Ser695,它们分别位于激活环、转角基序和疏水基序上,其中激活环的磷酸化至关重 要[12]。理论方面,Seco 等人利用分子动力学(molecular dynamics, MD)模拟发现激活环的磷酸化诱导了 ATP 结合位点的打开,揭示了激活环的构象与激酶的催化间的关系[6]。Iqbal 和 Hatmal 等人利用 MD 模 拟和分子对接筛选出针对不同疾病的有效激酶抑制剂[13][14]。众所周知,对大分子进行 MD 模拟是非常 耗时的,因此人们提出了粗粒化的弹性网络模型(Elastic Network Model, ENM)用于研究生物大分子结构 动力学与功能的关系[15]。两种传统的 ENM 模型是高斯网络模型(Gaussian Network Model, GNM)[16]和 各向异性网络模型(Anisotropic Network Model, ANM)[17]。Atilgan 等人提出了微扰响应扫描(perturbation response scanning, PRS) [18]方法,该方法与 ENM 相结合来评估蛋白质残基因外界扰动所产生的响应,目前该方法已被证明在蛋白质变构调控位点识别中非常有效[19]。

本研究使用弹性网络模型和微扰响应扫描方法分析了 PKC-θ 的结构动力学与功能间的关系,并识 别出了在变构通信中发挥重要作用的关键残基,加深了对 PKC-θ 的激活及催化机制背后动力学的理 解。



**Figure 1.** Structure of the kinase domain of PKC- $\theta$ . The active-loop (orange),  $\alpha$ C and  $\alpha$ G helix (violet), G-rich loop (yellow) turn motif (bright orange, the phosphorylation site shown in stick model), hydrophobic motif (blue, the phosphorylation site shown in stick model) and DFG (orange stick at active-loop) are all labeled 图 1. PKC- $\theta$  激酶结构域的结构。激活环(橙色)、 $\alpha$ C 和  $\alpha$ G 螺旋(紫罗兰

色)、G-rich loop (黄色) turn motif (亮橙色,磷酸化位点显示为棍棒)、 hydrophobic motif (蓝色,磷酸化位点显示为棍棒)和 DFG (橙色棍棒)均 已标注

## 2. 研究方法

#### 2.1. 弹性网络模型

从蛋白质数据库(Protein data bank, PDB)中获取 PKC-θ激酶结构域的晶体结构(PDB ID: 4Q9Z),其分 辨率为 2.6 Å,选取 A 链作为研究对象,用于搭建 ENM 模型。在 ENM 中,该激酶的结构被粗粒化为一个由弹簧连接的节点网络,其中残基被粗粒化为由 Cα 原子表示的节点,如果两个节点间的距离小于某一截断半径,则用弹簧连接,这表示残基之间有相互作用。在 GNM 中,网络的总势能为:

$$V_{\rm GNM} = \frac{1}{2} \gamma \Big[ \Delta \boldsymbol{R}^{\rm T} \left( \boldsymbol{\Gamma} \otimes \mathbf{E} \right) \Delta \boldsymbol{R} \Big]$$
(1)

其中,  $\gamma$  是弹簧的弹性系数,  $\Delta \mathbf{R}$  代表  $N \uparrow C\alpha$  原子偏离其平衡位置的位移, N 是该蛋白中残基的个数, **E** 是单位矩阵,  $\otimes$  为矩阵的直积,  $\Gamma \supset N \times N$ 阶的 Kirchhoff 矩阵, 其元素为:

$$\boldsymbol{\Gamma}_{ij} = \begin{cases} -1 & \text{if } i \neq j, R_{ij} \leq r_c \\ 0 & \text{if } i \neq j, R_{ij} > r_c \\ -\sum_{j,j\neq i}^N \boldsymbol{\Gamma}_{ij} & \text{if } i = j \end{cases}$$
(2)

DOI: 10.12677/biphy.2024.124006

其中, R<sub>ij</sub>是节点 i 和 j 间的距离, r<sub>c</sub>为截断半径。残基的均方涨落和残基间涨落的交叉相关性分别为:

$$\left\langle \Delta \boldsymbol{R}_{i} \cdot \Delta \boldsymbol{R}_{i} \right\rangle = \frac{3k_{B}T}{\gamma} \Big[ \boldsymbol{\Gamma}^{-1} \Big]_{ii} = \frac{3k_{B}T}{\gamma} \sum_{k=2}^{N} \lambda_{k}^{-1} \big[ u_{k} \big]_{i} \big[ u_{k} \big]_{i}$$
(3)

$$\left\langle \Delta \boldsymbol{R}_{i} \cdot \Delta \boldsymbol{R}_{j} \right\rangle = \frac{3k_{B}T}{\gamma} \Big[ \boldsymbol{\Gamma}^{-1} \Big]_{ij} = \frac{3k_{B}T}{\gamma} \sum_{k=2}^{N} \lambda_{k}^{-1} \big[ \boldsymbol{u}_{k} \big]_{i} \big[ \boldsymbol{u}_{k} \big]_{j} \tag{4}$$

其中, $k_B$ 为 Boltzmann 常数,T为绝对温度。

与 GNM 模型相比, ANM 模型不但可以提供残基运动的幅度信息, 而且还能够提供残基运动的方向 信息。在 ANM 中, 网络的总势能为:

$$V_{\rm ANM} = \frac{1}{2} \gamma \sum_{i,j}^{N} \left( R_{ij} - R_{ij}^{0} \right)^{2}$$
(5)

其中, *R<sub>ij</sub>*表示残基 *i* 和 *j* 之间的瞬时距离, *R<sup>0</sup><sub>ij</sub>*表示在平衡位置时残基 *i* 和 *j* 之间的距离。对公式(5)求二 阶偏导数计算出 Hessian 矩阵 H, 该矩阵分解得到的特征向量表示蛋白质的运动模式。H 的元素 *h<sub>ij</sub>*是 3 × 3 的子矩阵。当 *i≠ j* 时, *h<sub>ij</sub>*为:

$$\boldsymbol{h}_{ij} = \begin{bmatrix} \frac{\partial^2 V}{\partial X_i \partial X_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial X_i \partial Y_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial X_i \partial Z_j} \\ \frac{\partial^2 V}{\partial Y_i \partial X_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial Y_i \partial Y_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial Y_i \partial Z_j} \\ \frac{\partial^2 V}{\partial Z_i \partial X_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial Z_i \partial Y_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial Z_i \partial Z_j} \end{bmatrix}$$
(6)

当i = j时,  $h_{ij}$ 为:

$$\boldsymbol{h}_{ii} = -\sum_{i \neq j} \boldsymbol{h}_{ij} \tag{7}$$

在 ANM 中, 残基的均方涨落和残基间涨落的交叉相关性为:

$$\left\langle \Delta \boldsymbol{R}_{i} \cdot \Delta \boldsymbol{R}_{i} \right\rangle = \frac{k_{B}T}{\gamma} \left( \mathbf{H}_{3i-2,3i-2}^{-1} + \mathbf{H}_{3i-1,3i-1}^{-1} + \mathbf{H}_{3i,3i}^{-1} \right)$$
(8)

$$\left\langle \Delta \boldsymbol{R}_{i} \cdot \Delta \boldsymbol{R}_{j} \right\rangle = \frac{k_{B}T}{\gamma} \left( \mathbf{H}_{3i-2,3j-2}^{-1} + \mathbf{H}_{3i-1,3j-1}^{-1} + \mathbf{H}_{3i,3j}^{-1} \right)$$
(9)

归一化的交叉相关性为:

$$\boldsymbol{C}_{ij} = \frac{\left\langle \Delta \boldsymbol{R}_i \cdot \Delta \boldsymbol{R}_j \right\rangle}{\sqrt{\left\langle \left(\Delta \boldsymbol{R}_i\right)^2 \right\rangle \cdot \left\langle \left(\Delta \boldsymbol{R}_j\right)^2 \right\rangle}}$$
(10)

*C<sub>ij</sub>*的取值范围为[-1,1],1表示残基的运动方向完全相同,-1表示运动方向完全相反,0则表示两残 基的运动不相关。

#### 2.2. 微扰响应扫描方法

为了探究影响蛋白质构象变化的关键残基,Atilgan 等人根据线性响应理论(linear response theory, LRT) [20]提出了 PRS 方法[11]。该方法可以根据胡克定律计算出所有残基在受到外力时的位置变化量。在 PRS 中,依次对残基施加外力 F,通过观察所有残基的位置变化来判断该残基的重要性。其中施加在残基 *i* 上 的力 F 表示为

$$\boldsymbol{F}^{i} = \left(000\cdots\Delta F_{x}^{i}\Delta F_{y}^{i}\Delta F_{z}^{i}\cdots000\right)^{\mathrm{T}}$$
(11)

其他残基的响应:

$$\Delta \boldsymbol{R}^{i} = \mathbf{H}^{-1} \boldsymbol{F}^{i} \tag{12}$$

其中, Δ**R**<sup>i</sup>表示所有残基在残基 i 被扰动时的位置变化量。

对每个残基分别施加 x 方向、y 方向、z 方向、x 和 y 方向、x 和 z 方向、y 和 z 方向、x 和 y 和 z 方向 的 7 个外力。PRS 方法通过对所有残基进行扰动,得到一个  $N \times N$  阶的位移响应矩阵 **P**,矩阵的第 k 列 表示扰动残基 k 时其他残基的响应。利用对角线元素对矩阵 **P** 中的每一列进行归一化,归一化后的列平 均值被定义为相应残基的敏感性。由此可以得到所有残基的敏感性曲线,曲线中的极大值所对应的残基 被认为在蛋白质变构中起关键作用[21]。

#### 3. 结果与讨论

#### 3.1. 基于 GNM 的实验和理论 B 因子的比较

在 X-ray 结构中, Debye-Waller 因子(又称温度因子或 B 因子)常被用于衡量原子的柔性。本文用 Ca 原子的 B 因子来表示其所在残基的柔性信息。通过最大化理论和实验 B 因子之间的皮尔森相关系数 (Pearson correlation coefficient, PCC)来优化 GNM 中的截断半径,以构建最佳模型。在本工作中,截断半径 *r<sub>c</sub>*的寻优范围为: 6.0~13.0 Å,步长为 1.0 Å。当 *r<sub>c</sub>*=8.0 Å 时, GNM 计算的理论 B 因子与实验 B 因子 的 PCC 达到最大值 0.71,故本工作中 *r<sub>c</sub>*=8.0 Å。图 2 显示了 GNM 在截断半径为 8.0 Å 时得到的理论和 实验 B 因子的对比图,可以看出 GNM 能较好的再现 PKC-*θ* 的柔性。



**Figure 2.** Comparison between the experimental (solid line) and computed (dotted line) B factor of PKC-θ **图 2.** PKC-θ 的实验 (实线)和理论 (虚线) B 因子的比较

#### 3.2. 基于 GNM 的 PKC-θ 慢运动模式分析

研究表明,与蛋白质功能有关的慢运动模式通常是大规模的集体运动[22]。为研究 PKC-θ 的功能动 力学特性,本文计算了 PKC-θ 在第一慢运动模式下的涨落,如图 3 所示。图中峰值主要对应于 G-rich loop 和 C 末端的转角基序及疏水基序,这些区域多为 loop 结构,故柔性较大。有趣的是,几个涨落较小的区域与 PKC-θ 的功能密切相关。区域1(残基 421-441)对应于 αC 螺旋,该螺旋具有催化和调节功能[8],其中保守的谷氨酸(Glu428)与赖氨酸(Lys429)形成的氢键有利于催化功能的发挥;区域2(残基 461-473)是连接 N-lobe 和 C-lobe 的铰链区,其中含有一个 ATP 结合位点 Leu461,该铰链区对 PKC-θ 的催化活性和结构稳定起重要作用[8];区域3(残基 506-526)的部分残基位于激活环中,该环在激酶结构域中较为保守,其中包含了重要的催化组件 DFG 基序,另外该区域中的 Ala521 和 Asp522 是 ATP 结合位点[23]。



**Figure 3.** Mean square fluctuation distribution of the residues in the first slow motion mode 图 3. 第一慢运动模式下残基的均方涨落分布

#### 3.3. 基于 ANM 的 PKC- $\theta$ 运动相关性分析

为了研究 PKC-θ 在运动过程中不同残基的相关性,本文通过公式(10)计算出所有残基对的交叉相关性,如图 4 所示。因为慢运动模式对应着蛋白质的功能性运动,所以选取 ANM (*r*<sub>c</sub>=15.0 Å,理论与实验 B 因子之间的 PCC 为 0.69)的前 19 个低频运动模式(对残基涨落贡献大于 50%)进行运动相关性分析。从 图 4 看出,N-lobe (左下角虚线方框)和 C-lobe (右上角虚线方框)内的残基运动多呈正相关,两叶间的残基运动多呈负相关,这与其"开合运动"相一致[24]。图中区域 1 显示 αC 螺旋与 Ala483 和 Phe484 等残基 具有强烈的运动正相关性,它们均与 ATP 的结合有关[25]。此外,对催化起重要作用的 Asp466 和 Asn471 与催化组件 DFG 基序也存在强的运动相关性,它们一起保证催化功能的稳定发挥。区域 2 表明 C 末端的疏水基序与 αC 螺旋呈正相关,两者的相互作用对激酶活性具有调节作用[26]。区域 3 反应了转角基序 与 β1 间的运动相关性,由于其空间上的近邻,所以它们具有强正相关性。

#### 3.4. 微扰响应扫描分析

PRS 方法结合了 ENM 和 LRT 来评估在蛋白质上施加外力扰动对其构象的影响。本工作对 PKC-θ中的残基逐个微扰得到响应热图和残基敏感性曲线,如图 5(a)所示;残基敏感性值映射在 PKC-θ 结构上,如图 5(b)所示。

经过分析,发现 PKC- $\theta$  中敏感性较高的残基大多与 ATP 或底物结合有关。在图 5(b)中,区域 1 是 G-rich loop,该环的功能是定位腺嘌呤环和 ATP 的磷酸基,敏感性较高。区域 2 是位于  $\alpha$ C 螺旋和  $\beta$ 4 间



**Figure 4.** The cross-correlation map for PKC-*θ* **图 4.** PKC-*θ* 的残基运动相关性热图



**Figure 5.** (a) PRS heat map of PKC-θ, with sensitivity curve at the top. (b) Mapping of sensitivity values on the structure of PKC-θ 图 5. (a) PKC-θ 的 PRS 热图,顶部是敏感性曲线; (b) 敏感性值在 PKC-θ 结构上的映射

的小螺旋和一段 loop (*α*C-*β*4 loop),它们是激酶发挥功能的多种调节的枢纽,也是调节激酶活性的复杂相 互作用中的热点。Yeung 等人的实验表明,该位置的突变可改变家族保守的和特异性的调节机制[26]。*α*C*β*4 loop 被认为是真核激酶中调节相互作用的保守但研究不足的热点,本文对其敏感性的探究为理解其结 构动力学 - 功能间的关系提供了一个新见解,并为研究新型蛋白激酶抑制剂提供重要信息。区域 3 是 *α*G 螺旋,虽然它远离底物结合位点,但仍与底物相互作用有关[27]。敏感性较高的区域 4 中包含了转角基序 的磷酸化位点和疏水基序的磷酸化位点,对激酶催化活性的调节非常重要。总的来说,识别出的敏感性 高的残基与激酶的变构和催化活性相关,这也说明了 PRS 方法的有效性。

## 4. 结论

PKC-*θ* 是一种能够使底物蛋白发生磷酸化的激酶,在蛋白质的翻译后修饰中发挥重要作用。首先,

构建了 PKC-*θ* 在最优截断半径下的高斯网络模型,实验和理论 B 因子的 PCC 达到 0.71,并且在第一慢运动模式下较好的识别出了 PKC-*θ* 中的功能性铰链区和柔性区域。对 PKC-*θ* 的运动相关性分析发现 N-lobe 和 C-lobe 之间存在较强的相互作用,一致于激酶的"开合运动",这有助于结合配体的稳定。接着,通过 PRS 方法对 PKC-*θ* 进行微扰,可以识别出关键残基区域,这些区域被证明与该蛋白质的配体结合及催化活性相关。这些关键残基的识别可以为进一步的实验或理论研究提供重要的方向和依据。本工作有利于加深人们对 PKC-*θ* 催化活性成熟及其变构机制的理解,并为设计新的蛋白激酶抑制剂提供有用信息。

#### 基金项目

国家自然科学基金项目(32271294, 31971180)。

#### 参考文献

- Isakov, N. (2018) Protein Kinase C (PKC) Isoforms in Cancer, Tumor Promotion and Tumor Suppression. Seminars in Cancer Biology, 48, 36-52. <u>https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.04.012</u>
- [2] Zeng, L., Webster, S.V. and Newton, P.M. (2012) The Biology of Protein Kinase C. In: Islam, M., Ed., *Calcium Signaling. Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 740, Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2\_28
- [3] Ohno, S., Akita, Y., Hata, A., et al. (1991) Structural and Functional Diversities of a Family of Signal Transducing Protein Kinases, Protein Kinase C Family; Two Distinct Classes of PKC, Conventional cPKC and Novel nPKC. Advances in Enzyme Regulation, 31, 287-303. <u>https://doi.org/10.1016/0065-2571(91)90018-H</u>
- [4] Chand, S., Mehta, N., Bahia, M.S., et al. (2012) Protein Kinase C-Theta Inhibitors: A Novel Therapy for Inflammatory Disorders. Current Pharmaceutical Design, 18, 4725-4276. <u>https://doi.org/10.2174/138161212802651625</u>
- [5] Brezar, V., Tu, W.J. and Seddiki, N. (2015) PKC-Theta in Regulatory and Effector T-Cell Functions. Frontiers in Immunology, 6, Article 530. <u>https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00530</u>
- [6] Seco, J., Ferrer-Costa, C., Campanera, J.M., *et al.* (2012) Allosteric Regulation of PKC0: Understanding Multistep Phosphorylation and Priming by Ligands in AGC Kinases. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 80, 269-280. <u>https://doi.org/10.1002/prot.23205</u>
- [7] Keranen, L.M., Dutil, E.M. and Newton, A.C. (1995) Protein Kinase C Is Regulated *in vivo* by Three Functionally Distinct Phosphorylations. *Current Biology*, **5**, 1394-1403. <u>https://doi.org/10.1016/S0960-9822(95)00277-6</u>
- [8] Kornev, A.P. and Taylor, S.S. (2015) Dynamics-Driven Allostery in Protein Kinases. *Trends in Biochemical Sciences*, 40, 628-647. <u>https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.09.002</u>
- [9] Kannan, N., Haste, N., Taylor, S.S., et al. (2007) The Hallmark of AGC Kinase Functional Divergence Is Its C-Terminal Tail, a Cis-Acting Regulatory Module. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104, 1272-1277. https://doi.org/10.1073/pnas.0610251104
- [10] Torkamani, A., Kannan, N., Taylor, S.S., et al. (2008) Congenital Disease SNPs Target Lineage Specific Structural Elements in Protein Kinases. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105, 9011-9016. https://doi.org/10.1073/pnas.0802403105
- [11] Hemmer, W., Mcglone, M., Tsigelny, I., et al. (1997) Role of the Glycine Triad in the ATP-Binding Site of cAMP-Dependent Protein Kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 16946-16954. https://doi.org/10.1074/jbc.272.27.16946
- [12] Liu, Y., Graham, C., Li, A., *et al.* (2002) Phosphorylation of the Protein Kinase C-Theta Activation Loop and Hydrophobic Motif Regulates Its Kinase Activity, But Only Activation Loop Phosphorylation Is Critical to *in vivo* Nuclear-Factor-κB Induction. *Biochemical Journal*, **361**, 255-265. <u>https://doi.org/10.1042/bj3610255</u>
- [13] Hatmal, M.M. and Taha, M.O. (2017) Simulated Annealing Molecular Dynamics and Ligand-Receptor Contacts Analysis for Pharmacophore Modeling. *Future Medicinal Chemistry*, 9, 1141-1159. https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0061
- [14] Iqbal, S., Anantha, K.D. and Gunasekaran, K. (2017) Identification of Potential PKC Inhibitors through Pharmacophore Designing, 3D-QSAR and Molecular Dynamics Simulations Targeting Alzheimer's Disease. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, **36**, Article ID: 1406824. <u>https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1406824</u>
- [15] Tirion, M.M. (1996) Large Amplitude Elastic Motions in Proteins from a Single-Parameter, Atomic Analysis. *Physical Review Letters*, 77, 1905-1908. <u>https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.77.1905</u>

- [16] Bahar, I., Atilgan, A.R. and Erman, B. (1997) Direct Evaluation of Thermal Fluctuations in Proteins Using a Single-Parameter Harmonic Potential. *Folding & Design*, 2, 173-181. <u>https://doi.org/10.1016/S1359-0278(97)00024-2</u>
- [17] Atilgan, A.R., Durell, S.R., Jernigan, R.L., et al. (2001) Anisotropy of Fluctuation Dynamics of Proteins with an Elastic Network Model. *Biophysical Journal*, 80, 505-515. <u>https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76033-X</u>
- [18] Atilgan, C. and Atilgan, A.R. (2009) Perturbation-Response Scanning Reveals Ligand Entry-Exit Mechanisms of Ferric Binding Protein. PLOS Computational Biology, 5, e1000544. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000544</u>
- [19] Liang, Z., Zhu, Y., Liu, X., et al. (2020) Role of Protein-Protein Interactions in Allosteric Drug Design for Dnamethyltransferases. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, 121, 49-84. <u>https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.12.005</u>
- [20] Omori, S., Fuchigami, S., Ikeguchi, M., et al. (2009) Linear Response Theory in Dihedral Angle Space for Protein Structural Change upon Ligand Binding. Journal of Computational Chemistry, 30, 2602-2608. https://doi.org/10.1002/jcc.21269
- [21] Dutta, A., Krieger, J., Lee, J.Y., et al. (2015) Cooperative Dynamics of Intact AMPA and NMDA Glutamate Receptors: Similarities and Subfamily-Specific Differences. Structure, 23, 1692-1704. <u>https://doi.org/10.1016/j.str.2015.07.002</u>
- [22] Bahar, I., Atilgan, A.R., Demirel, M.C., *et al.* (1998) Vibrational Dynamics of Folded Proteins: Significance of Slow and Fast Motions in Relation to Function and Stability. *Physical Review Letters*, **80**, 2733-2736. <u>https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.80.2733</u>
- [23] George, D.M., Breinlinger, E.C., Friedman, M., *et al.* (2015) Discovery of Selective and Orally Bioavailable Protein Kinase Cθ(PKCθ) Inhibitors from a Fragment Hit. *Journal of Medicinal Chemistry*, **58**, 222-236. <u>https://doi.org/10.1021/jm500669m</u>
- [24] 徐锋. 蛋白激酶催化域分子内共进化网络分析[D]: [博士学位论文]. 上海: 复旦大学, 2008.
- [25] Komander, D., Kular, G., Deak, M., et al. (2005) Role of T-Loop Phosphorylation in PDK1 Activation, Stability, and Substrate Binding. Journal of Biological Chemistry, 280, 18797-18802. https://doi.org/10.1074/jbc.M500977200
- [26] Yeung, W., Ruan, Z. and Kannan, N. (2020) Emerging Roles of the αC-β4 Loop in Protein Kinase Structure, Function, Evolution, and Disease. IUBMB Life, 72, 1189-1202. <u>https://doi.org/10.1002/iub.2253</u>
- [27] Pearce, L.R., Komander, D. and Alessi, D.R. (2010) The Nuts and Bolts of AGC Protein Kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11, 9-22. <u>https://doi.org/10.1038/nrm2822</u>