



УДК 547.962:541.68

КОНФОРМАЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ФРАГМЕНТОВ ОНКОБЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА p21ras

3. ФРАГМЕНТ 34–46 НАТИВНОГО ОНКОБЕЛКА И ДЕКАПЕПТИД, СООТВЕТСТВУЮЩИЙ УЧАСТКУ 35–44 ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ p21

© 2003 г. К. Д. Мзареулов

Бакинский государственный университет,

370033, Баку, Московский просп., 66–20, Азербайджан

Поступила в редакцию 09.01.2002 г. Принята к печати 12.09.2002 г.

Методом теоретического конформационного анализа исследовано пространственное строение предполагаемого участка связывания онкобелков p21 с другими онкобелками. Получены данные о конформационных возможностях изолированного адресного фрагмента, локализованного на участке 34–46 нативного p21, а также декапептидной молекулы, последовательность которой соответствует участку 35–44 первичной структуры онкобелков данного семейства. Результаты вычислений указывают на сходство трехмерного строения изучаемых пептидов, что подтверждает гипотезу об идентичности выполняемых ими биологических функций.

Ключевые слова: онкобелок p21, ras, участок связывания, пространственная структура.

Ранее мы уже приводили часть экспериментальных данных [1, 2], указывающих, что на участке 35–44 онкобелков семейства p21 локализован адресный фрагмент, выполняющий функцию связывания этих молекул с другими онкобелками. Конкретная постановка новой расчетной задачи требует углубленного изложения известной информации. Отметим при этом, что результаты биохимических исследований структурно-функциональной организации p21 представляются недостаточно полными и во многом противоречивыми.

Так, в работе Гиббса, Сигала и др. [3] указывалось, что онкобелки ras могут быть частью комплекса, стимулирующего клетки к делению, но потерявшего в результате мутаций регуляторные функции, в то время как Виттингхофер [4] полагает, что p21 – молекулярный регулятор клеточного роста. Многие исследователи отмечали, что онкобелки данного семейства осуществляют свою биохимическую функцию в тесном взаимодействии с другими онкогенными белками. В частности, известны результаты, свидетельствующие, что при трансформации клеток онкогены *ras*, *src* и *myc* действуют кооперативно [5–7], а МакКормик, Мартин и др. [8] обнаружили, что белки-активаторы ГТФазы, содержащие участки гомологии с онкобелками семейства *src*, негативно влияют на активность p21, превращая его ак-

тивную ГТФ-связанную форму в пассивную ГДФ-связанную. Известно также, что p21 прочно связан с клеточной мембраной [9]. Ши, Хаттори и др. [10] предложили модель функционирования p21, согласно которой этот онкобелок связан как с внутриклеточным эффектором, так и с трансмембранным рецептором, взаимодействующим с гормонами ростовых факторов.

Способность белка создавать комплексы с клеточными рецепторами и другими макромолекулами подразумевает наличие в его структуре фрагментов, непосредственно участвующих в процессе комплексообразования. Согласно данным Лакаля, Ааронсона и др. [11], молекулярные антитела, подавляющие активность p21, взаимодействуют с участком 5–69 онкобелка, а Сигал, Гиббс и др. [12] установили, что замены аминокислотных остатков на участке 35–40 первичной последовательности ras существенно снижают его биологическую активность.

Важным шагом к раскрытию структурно-функциональной организации ras стала работа Чертова, Хохлачева и Дейчина [13], обнаруживших в первичной структуре онкогенных белков *src*, *fgr*, *fps* и *yes* фрагменты, обладающие зарядовой комплементарностью по отношению к участку 37–42 онкобелка p21. Так, например, p21 имеет в позициях 37 и 38 аминокислотные остатки с отрицательно заряженными боковыми радикалами, а в позициях 41 и 42 – остатки, заряженные поло-

Сообщение 2 см. [1].

Эл. почта: stegocefal@mail.ru.

жительно. В то же время у онкобелка *src* имеется положительный заряд на боковой цепи остатка 409 и отрицательные заряды на боковых цепях 412-го и 413-го остатков. Поэтому было высказано предположение, что участок 37–42 полипептидной цепи *gas* – часть адресного фрагмента, ответственного за связывание *p21* с указанными онкобелками. Проверая данную гипотезу, авторы работы [13] синтезировали декапептид, соответствующий последовательности 35–44 нативного *p21*. Экспериментально установленное связывание этого декапептида с белками, имеющими массу 27, 35, 50 и 85 кДа, интерпретировано авторами как подтверждение предложенной ими модели. Позднее Де Клу с сотр. [14] также пришли к выводу, что область 32–44 онкобелков семейства *p21^{gas}* является эффекторным доменом, необходимым для взаимодействия с молекулами-посредниками. Аналогичные результаты исследования эффекторов онкобелков *gas* приведены в работах МакКормика [15] и Маршала [16].

Анализируя опубликованные экспериментальные данные, можно прийти к заключению, что *gas* реализует свою патогенную функцию (т.е. осуществляет злокачественную трансформацию клеток) через образование комплексов с другими протеинкиназами, в частности, *src*, *fgr*, *fps*, *yes*. Участок связывания с перечисленными белками, вероятно, локализован на отрезке 37–42 аминокислотной последовательности *p21*, причем блокирование данного участка сопровождается подавлением GTF-связывающей активности белков семейства *gas*. Таким образом, открываются перспективы для создания искусственного ингибитора онкобелков этого семейства, например олигопептидной природы, который мог бы связываться с адресным доменом, блокируя образование комплексов *p21* с различными медиаторами и, как следствие, тормозить либо вовсе прерывать развитие канцерогенного процесса.

Очевидно, что подобный ингибитор должен быть комплементарен по пространственному строению и по расположению зарядов участку поверхности *p21*, ответственному за образование комплекса. Следовательно, первым шагом к решению поставленной задачи должно быть установление пространственной структуры и конформационных возможностей участков связывания *p21*, а также белков-медиаторов, кодируемых онкогенами *src*, *fgr*, *fps*, *yes*.

Наиболее надежные на данный момент сведения о пространственной организации *gas* получены в эксперименте по рентгеноструктурному анализу комплекса *p21* с GDP, осуществленном группой Тонга и Де Воста с разрешением 2.2 Å [17, 18], а также в рентгеноструктурном эксперименте по изучению комплекса *p21* с GTP с разрешением 3.0 Å, выполненном группой Шлихтинга [19]. Однако

данные этих экспериментов весьма сложно использовать для оценки конформационного состояния интересующих нас фрагментов белковой молекулы, ввиду принципиальных противоречий в интерпретации результатов. Так, в работах [17, 18] указано, что фрагмент 32–37 имеет преимущественно развернутую форму основной цепи и вытянут параллельно молекуле GDP. Авторы работы [19] пришли к противоположному выводу: на участке 32–37 полипептидная цепь образует изгиб, а развернутое строение характерно для фрагмента 38–46. При этом данный фрагмент онкобелка ориентирован перпендикулярно оси молекулы GTP. Подобный разброс экспериментальных данных подтверждает ранее высказанное нами [2] предположение о том, что функциональные фрагменты *p21*, расположенные на поверхности белковой глобулы, являются конформационно лабильными, причем строение основной цепи этих последовательностей может существенно изменяться на различных стадиях функционирования *p21*. К аналогичному выводу пришли также Шлихтинг и др. [19], а также Пингуд и др. [20], изучавшие строение *p21* по спектрам кругового дихроизма. В обеих статьях отмечены, в частности, структурные различия между GDP- и GTP-комплексами *p21*.

Интересно отметить, что наиболее значимые сведения по структурно-функциональной организации *p21* получены в конце 1980-х – начале 1990-х гг. В более поздних работах [21–25] принципиально новой информации по данной проблеме не встречается, авторы лишь уточняют ранее полученные данные. Можно предположить, что возможности биохимического эксперимента в значительной степени исчерпаны, т.е. требуется продолжать исследования иными методами.

Таким образом, представляется своевременным исследовать расчетным методом пространственное строение и конформационные возможности предполагаемых участков связывания *p21*, его клеточных рецепторов *src*, *fgr*, *fps* и *yes*, а также декапептида, соответствующего фрагменту 35–44 аминокислотной последовательности нативного *p21*. Краткое сообщение о результатах теоретического конформационного анализа перечисленных пептидов было сделано автором на республиканской научной конференции “Физика-93” [26].

Метод исследования подробно описан ранее в работе [2]. Вкратце напомним, что при изложении результатов использована введенная Е.М. Поповым [27] классификация пептидных структур по конформациям, формам и шейпам. В рамках классификации конформационное состояние каждого аминокислотного остатка, при заданных валентных углах и длинах связей, определяется значениями двугранных углов ϕ и ψ основной цепи и

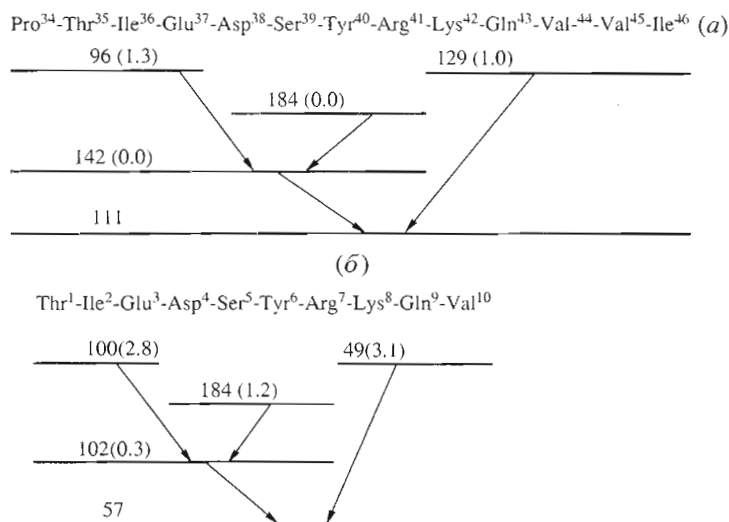


Рис. 1. Схема поэтапного расчета фрагмента 34–46 онкобелка p21 (a) и декапептида, соответствующего участку 35–44 аминокислотной последовательности p21 (б). Для каждого пептида указаны число рассчитанных структурных вариантов и относительная энергия конформационного состояния (в скобках, ккал/моль), соответствующего геометрии глобальной структуры всей последовательности.

углов χ_1, χ_2, \dots боковой цепи, что позволяет представить конформации в системе идентификаторов вида $X_{i,j} \dots$. Здесь X – форма основной цепи остатка: R ($\varphi, \psi = -180-0^\circ$), B ($\varphi = -180 - 0, \psi = 0 - 180^\circ$), L ($\varphi, \psi = 0 - 180^\circ$), P ($\varphi = 0 - 180, \psi = -180-0^\circ$), а индексы $i, j \dots$ отвечают положению боковой цепи, причем индекс 1 соответствует значению углов χ в области $0 - 120^\circ$, 2 – области от -120 до 120° , 3 – области от -120 до 0° . Согласно данной классификации, дипептидные формы основной цепи – $BB, BR, RL, LB, LR, RP, PL, PP$ образуют структуру развернутого типа (шейп e), а формы $RB, RR, BL, BP, LL, LP, PR, PB$ – свернутую структуру (шейп f). Таким образом, шейпы вида $fffff \dots$ описывают спиральное строение основной цепи молекулы, а $eeeeee$ – участки β -структуры. Допускается сокращенная запись: $eeee = e_4$ или $fffff = f_6$. Для краткости записи конформаций могут быть также опущены индексы, обозначающие величины углов $\chi_2, \chi_3, \chi_4, \chi_5$, в тех случаях, когда эти углы близки к 180° . Так, например, в случае лизина или метионина записи B_{13} и B_{1322} эквивалентны.

Различия между шейпами определяются величиной угла

$$\theta_i = \psi_i + \omega_i + \varphi_{i+1},$$

определяющего строение пептидного звена. Под “ i ” понимается номер остатка. Для развернутого шейпа e угол $\theta \approx 180^\circ$, а для свернутого шейпа f угол $\theta \approx 0^\circ$. Таким образом, в случае шейпа f боковые цепи двух смежных аминокислотных остатков ориентированы приблизительно коллине-

арно, тогда как для шейпа e они направлены в противоположных направлениях.

Хотя данная классификация не является общепринятой, она представляет весьма удобной, поскольку описывает строение практически каждого дипептидного звена изучаемой последовательности. Подтверждение тому – публикация работ, использующих данную терминологию, в солидных научных журналах [28–30].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

С целью изучения конформационных аспектов функционирования p21 был проведен вычислительный эксперимент по определению пространственного строения изолированного фрагмента 34–46 нативного белка, а также декапептида, соответствующего последовательности 35–44. Аминокислотный состав и расчетные схемы для обоих пептидов приведены на рис. 1.

Тридекапептид Pro³⁴-Ile⁴⁶ нативного p21

Первый этап вычислений выявил конформационную лабильность тетрапептида 34–37. Наиболее предпочтительная по энергии структура этой последовательности $RR_3R_3R_3$ принадлежит полностью свернутому шейпу f_3 . Структурные типы fee и ffe имеют одинаковую относительную энергию, равную 1.5 ккал/моль, а efe, eff и fef характеризуются величинами относительной энергии в интервале от 2.2 до 2.3 ккал/моль. Из дальнейшего расчета были исключены лишь преимущественно развернутые формы основной цепи,

Таблица 1. Величины относительной энергии, невалентного, электростатического и торсионного вкладов (ккал/моль) и расстояния (Å) между атомами C^α терминальных аминокислот для энергетически предпочтительных структур фрагмента 34–46

Шейпы	Конформации	$E_{\text{отн}}$	$E_{\text{нев}}$	$E_{\text{эл}}$	$E_{\text{торс}}$	$R(C_{34}^{\alpha}-C_{46}^{\alpha})$
<i>ffefefef</i> ₄	<i>RR₁B₁R₃B₁R₁B₂B₃R₃R₂R₂R₃</i>	0.0	-68.3	7.8	7.7	18.4
<i>f</i> ₁₂	<i>RR₃R₃R₂R₂R₁R₃R₃R₂R₂R₂R₃</i>	4.3	-64.0	9.4	6.1	14.9
<i>fefefefef</i> ₄	<i>RB₂B₃R₃B₁R₁B₂B₃R₃R₂R₂R₃</i>	5.0	-63.1	7.7	7.6	17.5
<i>ffe₃feef</i> ₄	<i>RR₁B₂B₃B₁R₁B₂B₃R₃R₂R₂R₃</i>	6.9	-63.0	9.2	8.0	17.2
<i>fe₄feef</i> ₄	<i>RB₁B₃B₃B₁R₁B₂B₃R₂R₂R₂R₃</i>	8.5	-59.3	8.8	6.2	20.9
<i>ffefefef</i> ₃	<i>RR₁B₁R₃B₁R₁B₂B₃B₂R₂R₂R₃</i>	9.7	-54.6	8.0	3.5	24.5
<i>f₄efef</i> ₅	<i>RR₁R₁R₃B₂R₁B₂R₃R₃R₂R₃R₂R₃</i>	11.4	-63.8	11.6	10.8	10.9
<i>fe₄fef</i> ₅	<i>RB₁B₃B₃B₁R₁B₁R₃R₂R₃R₂R₃</i>	11.5	-52.9	9.0	2.6	27.4

соответствующие шейпам *eeef* и *e₃*, оптимальные конформации которых имели относительную энергию соответственно 4.9 и 5.7 ккал/моль.

Четкая дифференциация структурных типов не проявилась и в случае пентапептида 42–46, для которого минимальными значениями конформационной энергии оказались представители восьми шейпов, соответствующих принципиально различным формам основной цепи. Однако для данной последовательности прослеживается некоторая предпочтительность преимущественно свернутых, т.е. α-спиральных форм. Минимальное значение

Таблица 2. Энергия межостаточных взаимодействий на участке нуклеации 38–42 фрагмента 34–46 нативного р21, ккал/моль. В верхней строке представлены данные для глобальной конформации, в нижней – для α-спиральной

Asp38	Ser39	Tyr40	Arg41	Lys42	
4.4	-0.1	0.5	-4.4	-1.9	Glu37
5.0	-0.4	0.2	-4.5	-13.2	
	-1.4	0.2	-12.8	-2.4	Asp38
	-1.3	0.1	-2.8	-2.9	
		-0.8	-0.8	0.1	Ser39
		-2.8	-0.4	-0.7	
			-4.1	-3.1	Tyr40
			-2.6	-0.8	
				1.2	Arg41
				1.7	

энергии получено для конформации *B₂R₃R₂R₂R₃* шейпа *ef₃*, что всего на 0.5 ккал/моль ниже энергии α-спиральной конформации *R₂R₂R₂R₂R₃*. Далее, в порядке возрастания относительной энергии, следуют структурные типы *ffef* ($E_{\text{отн}} = 0.9$ ккал/моль), *efef*, *feff* и *ef₃* (для всех $E_{\text{отн}}$ около 1.7 ккал/моль), а также *feef* и *eeff*, для которых $E_{\text{отн}}$ имеет величину, близкую к 2.8 ккал/моль.

Конформационно жестким оказался фрагмент 38–41, содержащий аминокислотные остатки, несущие на боковых цепях противоположные по знаку заряды. Вследствие электростатических контактов между аргинином и аспарагиновой кислотой, из восьми шейпов данного тетрапептида лишь два имеют относительную энергию, не превышающую 5.0 ккал/моль. Глобальная конформация этого фрагмента *B₁R₁B₂B₃* принадлежит шейпу *efe*, в то время как структурные типы *ffe* и *eff* характеризуются сравнительно высокими величинами относительной энергии: соответственно 3.2 и 5.3 ккал/моль. Еще заметнее уступают оптимальной структуре по значениям конформационной энергии полностью свернутая ($E_{\text{отн}} = 7.5$ ккал/моль) и полностью развернутая ($E_{\text{отн}} = 8.8$ ккал/моль) пространственные формы.

Минимизированные двугранные углы оптимальных конформаций фрагментов Pro34–Glu37 и Asp38–Arg41 послужили исходным приближением для изучения структурных свойств октапептида 34–41. Вычисления продемонстрировали лабильность рассматриваемого изолированного фрагмента полипептидной цепи онкобелка: интервалу относительной энергии от 0 до 7.0 ккал/моль принадлежат 20 шейпов, причем относительная энергия 14 шейпов не превышает 5.0 ккал/моль. Важно отметить, что большинство низкоэнергетических структур указанного октапептида име-

ют на участке 38–41 строение, соответствующее шейпу *efe*.

Глобальная конформация октапептида $RR_1B_1R_3B_1R_1B_2B_3$ принадлежит структурному типу *ffefefe*. Наиболее существенный стабилизирующий вклад в полную энергию этой структуры вносит взаимодействие между остатками аргинина и аспарагиновой кислоты: энергия их взаимодействия составляет -12.5 ккал/моль. Значительно меньше, около -4.5 ккал/моль, энергетический эффект от взаимодействия остатка аргинина с остатками тирозина и глутаминовой кислоты. Среди прочих межостаточных контактов выделяются невалентные взаимодействия соседних по цепи остатков, вклады которых составляют от -1.4 до -3.0 ккал/моль. Сильное электростатическое отталкивание, достигающее 4.4 ккал/моль, возникает между одноименно заряженными остатками аспарагиновой и глутаминовой кислот.

На завершающей стадии расчетов были исследованы конформационные свойства всей последовательности тридекапептида. Основные энергетические и геометрические параметры наиболее предпочтительных структур приведены в табл. 1–3, на рис. 2 схематически показано строение полипептидного остова оптимальных конформаций этого фрагмента молекулы онкобелка.

Объединение лабильных участков 31–41 и 42–46 привело к формированию нуклеации Glu37–Lys42, благодаря которой рассматриваемый тридекапептид приобрел конформационно жесткую структуру: относительную энергию, не превышающую 10.0 ккал/моль имеют лишь шесть шейпов. При этом для фрагмента Glu37–Asp38–Ser39–Tyr40–Arg41–Lys42 реализуются всего три типа строения основной цепи, соответствующие шейпам *fefee*, f_5 и *eefee*, которые создают оптимальные условия для пространственного сближения различных пар боковых цепей, несущих разноименно заряженные радикалы.

Так, шейпы *fefee* и *eefee* благоприятствуют пространственному сближению боковых цепей остатков аргинина и аспарагиновой кислоты, в то время как α -спиральный шейп f_5 – сближению боковых цепей остатка аргинина с глутаминовой кислотой, а остатка лизина – с аспарагиновой кислотой. Таким образом, результаты конформационного анализа показывают, что решающее влияние на формирование конформационно жесткой структуры данного тридекапептида оказывают именно электростатические взаимодействия.

Глобальная конформация $RR_1B_1R_3B_1R_1B_2B_3R_3-R_2R_2R_2R_3$ (табл. 1) соответствует нелинейной структуре со сложной формой основной цепи, вследствие чего основные и боковые цепи остатков, расположенных на участке последовательности 38–46, образуют обширную полость. Боковые цепи положительно заряженных остатков Arg41 и

Таблица 3. Длины водородных связей (Å) в наиболее вероятных структурах фрагмента 34–46 онкобелка p21

Водородные связи	1*	2**
Thr35 O γ ...HN Ile36	2.14	–
Thr35 H γ ...OC Ser39	–	2.23
Ile36 NH...OC Tyr40	–	2.92
Glu37 NH...OC Arg41	–	2.76
Glu37 O ϵ ...H ϵ Lys42	–	2.21
Asp38 NH...OC Lys42	–	2.57
Asp38 O δ ...H ζ Arg41	1.91	–
Ser39 NH...OC Lys42	–	2.79
Ser39 O γ ...HN Tyr40	1.93	2.19
Ser39 H γ ...OC Gln43	–	2.33
Arg41 H ζ ...OC Val45	–	2.12
Lys42 NH...OC Val45	1.88	–
Gln43 NH...OC Ile46	2.72	3.19

* Для глобальной по энергии структуры; ** для α -спиральной структуры.

Lys42 пространственно сближены с бензольным кольцом остатка тирозина, а также с двумя остатками валина. Зону плотной упаковки атомов образует также тетрапептид 43–46, энергия межо-

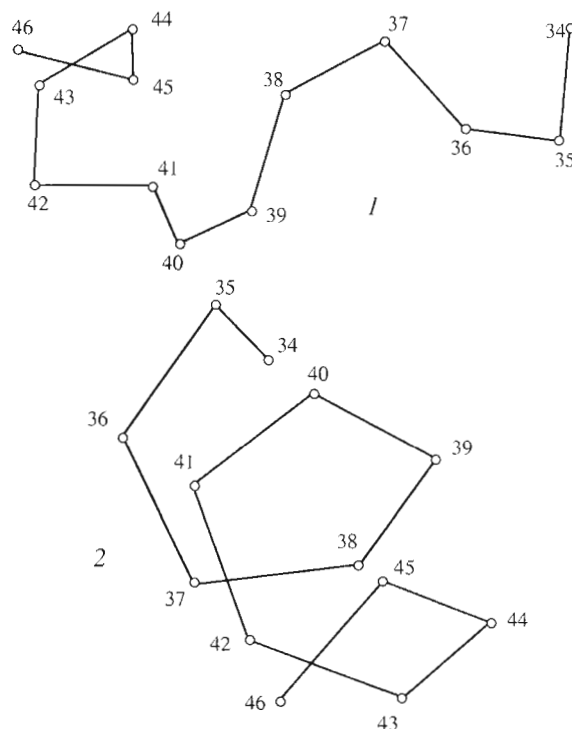


Рис. 2. Схематическое изображение структуры наиболее вероятных конформаций фрагмента 34–46 онкобелка p21: 1 – *ffefefe* f_4 ; 2 – f_{12} .

Таблица 4. Минимизированные величины двугранных углов для фрагмента Pro34–Ile46, град

Остатки	Номер структуры*	Двугранные углы, град						
		ω	φ	χ_1	χ_2	χ_3	χ_4	ψ
Pro34	1	-177	-	-	-	-	-	-55
	2	-177	-	-	-	-	-	-59
	3	178	-	-	-	-	-	-53
	4	178	-	-	-	-	-	-49
	5	178	-	-	-	-	-	-54
	6	-177	-	-	-	-	-	-55
	7	-178	-	-	-	-	-	-41
	8	178	-	-	-	-	-	-54
Thr35	1	174	-86	58	-179	176	-	-65
	2	179	-89	-51	179	180	-	-62
	3	179	-144	-173	-179	176	-	173
	4	179	-81	58	180	178	-	-55
	5	178	-97	59	-179	171	-	147
	6	174	-86	58	-179	176	-	-65
	7	-173	-74	58	180	180	-	-41
	8	178	-97	59	-179	171	-	147
Ile36	1	176	-135	62	-173	173	-172	156
	2	165	-136	-63	-178	179	-178	-66
	3	174	-82	-58	-175	173	-171	97
	4	180	-152	-179	-173	173	-173	144
	5	175	-101	-56	-175	173	-171	94
	6	176	-135	62	-173	173	-172	156
	7	-169	-80	68	-176	174	-176	-29
	8	175	-101	-56	-175	173	-171	94
Glu37	1	180	-97	-61	180	91	-	-58
	2	180	-104	-179	180	90	-	-72
	3	-175	-103	-58	179	88	-	-58
	4	180	-97	-61	179	90	-	142
	5	-176	-118	-60	180	89	-	146
	6	180	-97	-61	180	91	-	-58
	7	179	-85	-66	-179	90	-	-56
	8	-176	-118	-60	180	89	-	146
Asp38	1	180	-110	60	90	-	-	169
	2	-175	-125	175	87	-	-	-69
	3	180	-110	60	90	-	-	169
	4	180	-110	61	89	-	-	168
	5	179	-110	60	90	-	-	169
	6	180	-110	60	90	-	-	169
	7	-175	-107	176	89	-	-	143
	8	180	-110	60	91	-	-	170
Ser39	1	180	-101	59	180	-	-	-81
	2	-172	-98	56	180	-	-	-62
	3	180	-101	59	180	-	-	-81
	4	180	-101	59	180	-	-	-81
	5	-179	-101	59	180	-	-	-80
	6	-179	-101	59	180	-	-	-79
	7	-179	-108	60	180	-	-	-63
	8	179	-99	57	180	-	-	-80
Tyr40	1	179	-113	-165	89	-	-	153
	2	179	-132	-58	95	-	-	-64
	3	179	-112	-165	89	-	-	153
	4	179	-113	-165	89	-	-	154
	5	-179	-111	-172	89	-	-	150
	6	-179	-110	-170	89	-	-	152
	7	-171	-114	177	88	-	-	140
	8	176	-117	61	87	-	-	156

Таблица 4. Окончание

Остатки	Номер структуры*	Двугранные углы, град						
		ω	ϕ	χ_1	χ_2	χ_3	χ_4	ψ
Arg41	1	-174	-121	-60	180	180	180	116
	2	-178	-115	-61	180	180	180	-59
	3	-174	-121	-60	179	180	-178	116
	4	-174	-121	-60	180	180	180	116
	5	180	-123	-60	180	180	180	110
	6	-177	-121	-60	180	180	180	110
	7	176	-122	-62	-63	-62	179	-64
	8	180	-118	-61	180	180	180	-60
Lys42	1	-178	-107	-59	180	180	180	-69
	2	178	-132	179	178	180	180	-89
	3	-178	-107	-59	180	179	-179	-69
	4	-178	-107	-59	180	179	180	-69
	5	-177	-107	180	179	180	180	-68
	6	-178	-119	178	-179	179	180	116
	7	-178	-156	180	-179	179	180	-61
	8	180	-109	179	180	179	180	-68
Gln43	1	172	-104	-176	-178	91	-	-64
	2	-178	-99	-175	-178	91	-	-64
	3	173	-105	-177	-178	91	-	-64
	4	172	-104	-176	-178	90	-	-63
	5	174	-104	-175	-178	91	-	-64
	6	-179	-100	-176	-179	90	-	-67
	7	178	-107	-62	179	93	-	-71
	8	-179	-99	-60	180	90	-	-68
Val44	1	168	-112	179	-	-	-	-70
	2	175	-116	179	-	-	-	-77
	3	168	-112	179	-	-	-	-70
	4	168	-112	179	-	-	-	-69
	5	170	-113	179	-	-	-	-72
	6	178	-114	-172	-	-	-	-72
	7	177	-121	178	-	-	-	-73
	8	-179	-114	-174	-	-	-	-71
Val45	1	160	-117	177	-	-	-	-61
	2	163	-121	178	-	-	-	-60
	3	160	-117	177	-	-	-	-61
	4	159	-117	177	-	-	-	-61
	5	161	-119	177	-	-	-	-60
	6	180	-110	-179	-	-	-	-66
	7	163	-139	-178	-	-	-	-60
	8	-179	-109	-179	-	-	-	-67
Ile46	1	172	-99	-60	-173	176	-171	-59
	2	171	-98	-59	-173	176	-171	-60
	3	172	-99	-60	-173	176	-171	-59
	4	172	-99	-61	-174	176	-171	-59
	5	172	-98	-60	-173	176	-171	-59
	6	-176	-98	-59	-178	-179	-178	-59
	7	168	-100	-63	-174	175	-172	-59
	8	-177	-99	-60	-178	179	-178	-59

* В позициях 1-8 для каждого остатка представлены данные, соответствующие следующим структурам: 1 - ffefefef₄; 2 - f₁₂; 3 - feefefef₄; 4 - ffe₃feef₄; 5 - fe₄feef₄; 6 - ffefefef₃f₃; 7 - f₄efef₅; 8 - fe₄ef₅.

Таблица 5. Величины относительной энергии, невалентного, электростатического и торсионного вкладов (ккал/моль) и расстояния (Å) между атомами C^α терминальных аминокислот для энергетически предпочтительных структур синтетического декапептида

Шейпы	Конформации	$E_{отн}$	$E_{нев}$	$E_{эл}$	$E_{торс}$	$R(C_1^\alpha - C_{10}^\alpha)$	
f_3efef_3	$R_1R_3R_3B_1R_1B_1R_3$ {	$R_3R_2R_3$	0.0	-55.9	1.4	3.7	7.8
$f_3efefef$		$B_2R_3R_3$	1.4	-52.0	-1.0	3.6	15.8
$f_3efefee$		$L_2R_2R_3$	4.2	-49.3	-0.2	4.5	15.3
$f_3efeffe$		$R_2B_3R_3$	5.3	-53.1	3.4	4.3	11.8
f_9	$R_3R_3R_2R_2R_1R_3R_3$ {	$R_3R_2R_2$	0.3	-55.4	0.4	4.6	10.5
f_7ef		$B_1R_2R_3$	12.7	-50.8	8.5	4.3	14.3
f_3efef_3f	$R_1R_3R_3B_1R_1B_1B_3$ {	$B_2R_2R_3$	2.4	-50.3	-1.7	3.7	17.2
$f_3efefff$		$R_2R_2R_3$	3.5	-52.6	1.6	3.8	11.4
f_3efe_4		$B_2B_2R_3$	5.6	-50.4	1.6	3.8	17.7
f_3efee_4		$R_2B_3R_3$	7.5	-53.2	2.2	3.7	11.4
$f_3effeff$	$R_1R_3R_3B_1R_1R_2B_3$ {	$R_2R_2R_3$	5.5	-54.0	3.8	5.0	8.2
$f_3effeef$		$B_3R_2R_3$	9.1	-48.8	2.1	5.2	13.7
$f_3effefe$		$R_2B_3R_3$	10.6	-47.2	1.8	4.5	12.5

статочных взаимодействий для которого составляет от -1.5 до -3.0 ккал/моль. Отметим, что боковая цепь аргинина вытянута вдоль полипептидного остова, что приводит к пространственному сближению противоположно заряженных радикалов остатков аспарагиновой кислоты и аргинина с образованием солевого мостика. Вместе с тем, строение глобальной конформации (табл. 4) исключает возможность сближения боковых цепей остатков лизина и глутаминовой кислоты, которые экспонированы в растворитель и ориентированы во взаимно противоположных направлениях.

Конформация $RR_3R_3R_2R_2R_1R_3R_3R_3R_2R_2R_3$ в силу компактной укладки пептидного остова, свойственного для α -спиральных структурных типов, благоприятствует стабилизирующим невалентным взаимодействиям атомов основной цепи. При этом боковые цепи четырех заряженных остатков пространственно сближены и ориентированы приблизительно в одном направлении, что создает оптимальные условия для взаимодействия с рецепторной молекулой. По другую сторону α -спирали расположены боковые цепи остатков пролина, треонина, серина и тирозина, причем энергетические вклады контактов между ними имеют величину около -2.0 ккал/моль. Боковая цепь остатка изолейцина расположена между двумя указанными областями с плотной упаковкой атомов. Энергетические вклады контактов остатка Пе36 с остатками треонина и аргинина составляют соответственно -1.5 и -2.4 ккал/моль.

Спиральное строение основной цепи также определяет образование характерных контактов между парами остатков, разделенных четырьмя пептидными связями: Pro34-Asp38, Thr35-Ser39... Lys42-Ile46.

Декапептидный фрагмент последовательности 35-44

Данные, полученные в результате расчета строения участка 34-46 нативного белка, носят приблизительный характер, поскольку окончательная структура нативной молекулы p21 в определенной степени определяется влиянием других участков белковой глобулы. Далее мы переходим к результатам анализа изолированного фрагмента молекулы, первичная структура которого соответствует последовательности участка 35-44 p21. Данный декапептид обладает ионизированными концевыми участками основной цепи, и его трехмерная структура полностью определяется аминокислотной последовательностью.

Пространственное строение центрального участка Asp-Ser-Tyr-Arg этой молекулы было рассчитано ранее, при изучении фрагмента 34-46. Поэтому начальная стадия исследования данного пептида свелась к конформационному анализу концевых трипептидов 1-3 и 8-10. Для фрагмента Thr1-Ile2-Glu3 шейп с самым низким значением конформационной энергии принадлежит к развернутому структурному типу *ee*, далее, в порядке

возрастания относительной энергии, следуют шейки fe (0.1 ккал/моль), ff (2.8), ef (3.7). Еще отчетливее дифференциация форм основной цепи выражена для последовательности Lys8–Gln9–Val10: наиболее предпочтительные конформации шейпов ef , ff , ee и fe характеризуются величинами относительной энергии соответственно 0.0, 2.6, 3.8 и 4.4 ккал/моль. Столь существенные различия в энергии между конформационными состояниями сравнительно коротких фрагментов связаны с наличием в каждом из них как ионизированной боковой цепи, так и противоположно заряженного участка основной цепи молекулы.

Из низкоэнергетических структур фрагментов 1–3 и 4–7 были составлены исходные варианты для конформационного анализа гептапептида Thr1–Arg7. Его последовательность, включающая разноименно заряженные радикалы, также характеризуется высокой степенью конформационной жесткости: относительную энергию, не превышающую 10.0 ккал/моль, имеют всего шесть шейпов. Глобальному минимуму конформационной энергии соответствует структурный тип f_3efe , на 7.7 ккал/моль выше энергия шейки f_3eff и на 8.6 ккал/моль – шейпа $fefe$. Оптимальные представители шейпов f_3fe и e_4fe имеют одинаковую относительную энергию, равную 9.0 ккал/моль, а для лучшей спиральной конформации (шейп f_6) $E_{отн} = 14.2$ ккал/моль. Решающее влияние на формирование глобальной конформации оказывают взаимодействия аспарагиновой кислоты с остатками треонина и аргинина: энергетические вклады этих контактов составляют соответственно –14.6 и –12.2 ккал/моль.

Данные о структуре промежуточных фрагментов 1–7 и 8–10 позволили приступить к изучению пространственного строения всей декапептидной последовательности. В табл. 5–7 суммированы основные параметры оптимальных конформаций изучаемой молекулы, а строение основной цепи наиболее предпочтительных структурных типов представлено на рис. 3.

Как и для фрагмента 34–46 нативного белка, в случае свободной декапептидной молекулы пространственная структура формируется, главным образом, под влиянием кулоновских взаимодействий. Однако, ввиду большего, чем в тридекапептиде 34–46, числа ионизированных радикалов, несколько большим оказывается в синтетическом декапептиде и количество низкоэнергетических форм основной цепи, благоприятствующих интенсивным взаимодействиям между всевозможными парами разноименных зарядов. В результате относительную энергию менее 10 ккал/моль имеют 11 шейпов, причем для участка 1–7 реализуются всего четыре предпочтительные формы основной цепи. В то же время C-концевой трипептид, содержащий положительно заряженную боковую

Таблица 6. Длины водородных связей в наиболее вероятных структурах синтетического декапептида, Å

Водородные связи	1*	2**
Thr1 NH3...O ^δ Asp4	2.08	–
Thr1 NH3...OC Asp4	1.90	–
Thr1 NH3...OC Ser5	3.32	–
Thr1 O ^γ ...HN Ile2	1.98	–
Thr1 H ^γ ...OC Ser5	–	2.12
Thr1 O ^γ ...H ^ζ Arg7	2.54	–
Ile2 NH...OC Tyr6	–	2.79
Glu3 NH...OC Arg7	–	2.74
Glu3 O ^ε ...H ^ζ Lys8	–	1.98
Asp4 NH...OC Lys8	–	2.97
Asp4 O ^δ ...HN Ser5	–	3.20
Asp4 O ^δ ...H ^ζ Arg7	2.39	–
Ser5 NH...OC Lys8	–	3.04
Ser5 O ^γ ...HN Tyr6	1.90	2.19
Ser5 H ^γ ...OC Glu9	–	2.04
Arg7 NH...OC Val10	1.97	2.49
Arg7 H ^ζ ...OC Val10	–	3.15
Lys8 NH...OC Val10	2.83	2.99

* Для глобальной по энергии структуры, ** для α-спиральной структуры.

вую цепь лизина, полярную боковую цепь глутамина и отрицательный заряд на основной цепи терминального остатка валина, оказался лабильным и способен принимать практически любое конформационное состояние, что не оказывает ощутимого влияния на общую энергию молекулы. Отме-

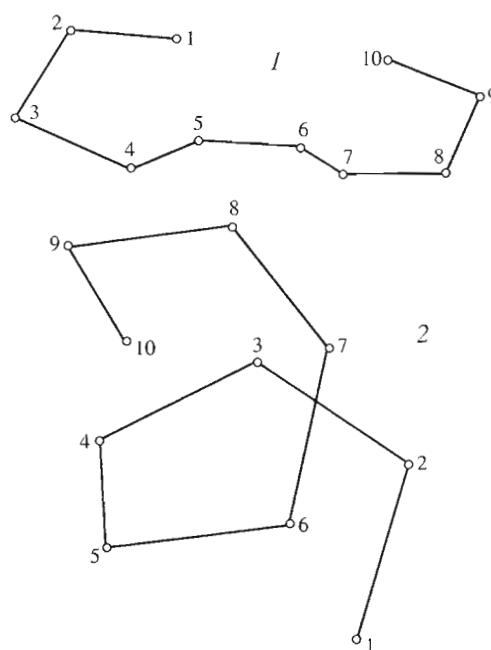


Рис. 3. Схематическое изображение структуры наиболее вероятных конформаций синтетического декапептида: 1 – f_3efe , 2 – f_9 .

Таблица 7. Минимизированные величины двугранных углов для декапептида, соответствующего последовательности 35–44, град

Остатки	Номер структуры*	Двугранные углы, град						
		φ	χ_1	χ_2	χ_3	χ_4	ψ	ω
Thr1	1	-33	54	-177	174	-	-69	-178
	2	-44	-58	178	174	-	-61	171
	3	-33	54	-177	174	-	-69	-179
	4	-34	54	-177	174	-	-69	-173
Ile2	1	-94	-59	-175	169	-178	-59	-172
	2	-81	-58	-170	174	-172	-64	159
	3	-94	-59	-176	169	-118	-59	171
	4	-95	-59	-175	169	-118	-59	-173
Glu3	1	-97	-60	179	90	-	-59	-174
	2	-106	179	178	89	-	-65	167
	3	-97	-60	179	90	-	-59	-174
	4	-94	-59	179	90	-	-55	-174
Asp4	1	-109	60	91	-	-	171	179
	2	-137	176	87	-	-	-66	-170
	3	-109	60	90	-	-	171	179
	4	-105	64	94	-	-	176	177
Ser5	1	-97	56	180	-	-	-78	176
	2	-105	53	179	-	-	-79	-177
	3	-98	57	180	-	-	-79	178
	4	-89	54	180	-	-	-65	179
Tyr6	1	-118	61	87	-	-	156	180
	2	-103	-69	94	-	-	-75	177
	3	-116	60	89	-	-	158	180
	4	-110	175	73	-	-	-59	172
Arg7	1	-118	-61	180	180	180	-60	177
	2	-144	-75	180	-179	179	-80	174
	3	-122	-60	180	180	180	100	-178
	4	-139	-75	-178	-178	178	144	-178
Lys8	1	-86	-60	180	180	179	-100	167
	2	-137	-70	-176	178	-179	-83	178
	3	-103	-176	179	179	180	84	179
	4	-57	-62	179	180	179	-29	-179
Glu9	1	-101	-178	178	100	-	-40	-178
	2	-75	-177	-178	100	-	-59	-177
	3	-100	-172	-175	104	-	-56	-176
	4	-49	-178	178	100	-	-40	-178
Val10	1	-121	-57	-	-	-	-13	-
	2	-107	-175	-	-	-	-31	-
	3	-118	-55	-	-	-	-13	-
	4	-121	-57	-	-	-	-13	-

* В позициях 1–4 для каждого остатка представлены данные, соответствующие следующим структурам: 1 – f_3efef_3 ; 2 – f_9 ; 3 – f_3efef_3 ; 4 – $f_3ef_2ef_2$.

тим, однако, что независимо от строения участка 1–7, низкоэнергетические конформации C-концевого трипептида принадлежат шейпам *ff* и *ef*.

Глобальному минимуму полной энергии соответствует конформация $R_1R_3R_3B_1R_1B_1R_3R_3R_2R_3$, характеризующаяся наименьшим расстоянием между атомами C $^{\alpha}$ терминальных остатков (табл. 5), в результате чего энергия взаимодействия остатков треонина и валина составляет –3.7 ккал/моль. Положительно заряженная основная цепь треонина сближена с отрицательно заряженной боковой цепью аспарагиновой кислоты, при этом энергия контакта составляет –15.1 ккал/моль. Боковая цепь остатка аргинина, ориентированная вдоль полипептидного остова молекулы, сближена с боковой цепью аспарагиновой кислоты, вследствие чего между этими остатками образуется солевой мостик. Среди прочих межостаточных контактов, не включенных в табл. 5, отметим взаимодействия остатка валина с остатками аргинина и лизина, вклады которых составляют соответственно –8.3 и –4.8 ккал/моль. Так же как и в наиболее предпочтительной структуре фрагмента 34–46, в глобальной конформации синтетического декапептида ионизированные боковые цепи аминокислот расположены по разные стороны полипептидного остова, что потенциально может осложнить образование комплекса с рецепторными белками.

Конформация $R_3R_3R_2R_2R_1R_3R_3R_3R_2R_2$, наиболее предпочтительная среди спиральных структур, уступает глобальной всего 0.3 ккал/моль и по значениям двугранных углов практически идентична спиральной конформации участка 35–44 нативного p21 (табл. 7). Компактная укладка молекулярного скелета приводит к сближению боковых цепей всех ионизированных остатков, по направлению к которым вытянуты также боковые цепи валина, изолейцина и тирозина. Энергетические вклады контактов треонина с глутаминовой кислотой, аспарагиновой кислотой и тирозином составляют приблизительно –4.5 ккал/моль, а энергия взаимодействия валина с аргинином и лизином равна соответственно –12.9 и –4.6 ккал/моль, при этом перечисленные взаимодействия имеют главным образом кулоновскую природу. Для преимущественно невалентных контактов Thr1–Ser5, Ile2–Tyr6, Ser5–Glu9 и Tyr6–Val10, обусловленных спиральным строением молекулы, энергия взаимодействия составляет около –2.0 ккал/моль. Одновременно α -спиральная конформация основной цепи декапептида определяет пространственную сближенность разноименно заряженных боковых цепей: глутаминовой кислоты с остатком аргинина, а аспарагиновой кислоты с остатком лизина. При этом боковые цепи остатков лизина и глутаминовой кислоты оказываются направленными друг к другу, что приводит к образованию между ними солевого мостика.

Практически лишь боковая цепь остатка глутамина удалена от области плотной упаковки атомов и, будучи обращена в растворитель, не вносит ощутимого вклада в энергию межостаточных взаимодействий.

Анализ спектров низкоэнергетических конформационных состояний обоих исследованных пептидов позволяет сделать вывод о высокой степени их структурного сходства, обусловленного идентичностью аминокислотной последовательности. На участке нуклеации Glu–Asp–Ser–Tyr–Arg–Lys в случае фрагмента нативного p21 реализуются четыре шейпа: *fefee*, f_5 , *eefee* и *fefef*, а в случае свободной декапептидной молекулы – также четыре шейпа: *fefef*, f_5 , *fefee* и *feffe*. Таким образом, конформационные возможности исследованных пептидов весьма близки, что подтверждает гипотезу о сходном характере их действия.

Более детальный анализ пространственного строения и конформационных возможностей участка связывания p21 и предположения о вероятном характере взаимодействия онкобелка с клеточными рецепторами будут представлены в следующей статье, после того как будут изложены данные о структуре адресных фрагментов рецепторных онкобелков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мзареулов К.Д. // Биооргани. химия. 1992. Т. 18. С. 484–497.
2. Мзареулов К.Д. // Биооргани. химия. 1992. Т. 18. С. 474–483.
3. Gibbs J.B., Sigel I.S., Scolnick E.M. // Trends Biochem. Sci. 1985. V. 10. P. 350–353.
4. Wittinghofer F. // Lab. Prax. 1991. V. 15. P. 63–73.
5. Compere S.J., Baldocci P., Sharpe A.H., Thompson T., Land H., Jaenisch R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 2224–2228.
6. MacAuley A., Pawson T. // J. Virol. 1988. V. 62. P. 4712–4721.
7. Colman M.S., Ostrowsky M.C. // J. Cell. Biochem. 1992. Suppl. 16B. P. 236.
8. McCormick F., Martin G., Wong G., Polakis P., Clark R., Bollag G., Rubinfeld B., Yatani F., Brown A. // J. Cell. Biochem. 1992. Suppl. 16B. P. 170.
9. Gragnd R.J.A., Smith K.J., Gallimore P.H. // Oncogene. 1987. V. 1. P. 305–314.
10. Smith T.J., Hattori S., Clanton D.J., Ulsh L.S., Chen Zhang-gun, Lautenberger J.A., Papas T.S. // Gene Amplificat. and Anal. 1986. V. 4. P. 53–72.
11. Lacal J.C., Aaronson S.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 5400.
12. Sigel I.S., Gibbs J.B., D'Allonzo J.S., Scolnick E.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 4725–4729.
13. Чертов О.Ю., Хохлачев А.В., Дейчин В.И. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. С. 1157–1163.

14. De Clue J.E., Stone J.C., Blanchard R.A., Papageorge A., Martin P., Zhang Ke, Lowy D.R. // *Mol. and Cell. Biol.* 1991. V. 11. P. 3132–3138.
15. McCormick F. // *Current Opinion in Genetics and Development.* 1994. V. 4. P. 71–76.
16. Marshall C.J. // *Current Opinion in Cell Biology.* 1996. V. 8. P. 197–204.
17. Tong L., De Vos A.M., Milburn M.V., Jancarik J., Noguchi S., Nishimura S., Miura K., Ohtsuka E., Sung-Hou Kim. // *Nature.* 1989. V. 337. P. 90–93.
18. Tong L., De Vos A.M., Milburn M.V., Kim S.-H. // *J. Mol. Biol.* 1991. V. 217. P. 503–509.
19. Schlichting I., Almo S.C., Rapp G., Wilson K., Petratos K., Lentfer A., Wittinghofer A., Kobsh W., Pai E.F., Petsko G.A., Goody R.S. // *Nature.* 1990. V. 345. P. 309–315.
20. Pingoud A., Wehrmann M., Pieper U., Gast F., Urbanke C., Alves J., Feuerstein J., Wittinghofer A. // *Biochemistry.* 1988. V. 27. P. 4735–4740.
21. Casini T., Pelicci P.G. // *Oncogene.* 1999. V. 18. P. 3235–3243.
22. Bredel M., Pollack I.F. // *Brain Res Rev.* 1999. V. 29. P. 232–249.
23. Farrar C.T., Ma J., Singel D.J., Halkides C.J. // *Structure Fold Des.* 2000. V. 8. P. 1279–1287.
24. Ellis C.A., Clark G. // *Cell Signal.* 2000. V. 12. P. 425–434.
25. Hietanen S., Lain S., Krausz E., Blattner C., Lane D.P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. P. 8501–8506.
26. Мзареулов К.Д. // Тезисы респ. межвузовской конф. “Физика-93”. Баку. Изд-во БГУ, 1993. С. 76.
27. Попов Е.М. // *Молекулярн. биология.* 1975. Т. 9. С. 578–593.
28. Godjaev N.M., Akyuz S., Akhverdieva G. // *J. of Molecular Structure.* 1997. V. 403. P. 95–110.
29. Попов М.Е., Кашипаров И.В., Руми Л.Д., Попов Е.М. // *Биоорган. химия.* 1999. Т. 25. С. 423–434.
30. Годжаев Н.М., Агаева Г.А. // *Биофизика.* 2000. Т. 45. С. 581–585.

Conformational Aspects of Biological Activity of Functional Fragments of the p21ras Oncoproteins: 3. Fragment 34–46 of the Native Oncoprotein and the Decapeptide Corresponding to Its 35–44 Sequence

K. D. Mzareulov[#]

[#] E-mail: stegocefal@mail.ru

Baku State University, Moskovskii pr. 66–20, Baku, 370033 Azerbaijan

Theoretical conformational analysis was used to study the spatial structure of a putative binding site responsible for binding of p21 oncoproteins to other oncoproteins. Conformational properties of the isolated address sequence localized in fragment 34–46 of native p21 and of the decapeptide molecule corresponding to the 35–44 sequence in the primary structure of oncoproteins of this family were revealed. Our calculations demonstrated a similarity between the spatial structures of the peptides, which confirms the hypothesis on the identity of their biological functions. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: binding site, p21 oncoprotein, ras, spatial structure