



УДК 547.962:541.68

© 1992 г. *К. Д. Мзареулов***КОНФОРМАЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ФРАГМЕНТОВ ОНКОБЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА****p21ras****1. ФРАГМЕНТЫ 1—11 И 9—16 ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ***Бакинский государственный университет*

Методом теоретического конформационного анализа исследовано пространственное строение N-концевого ундекапептида, общего для всех модификаций p21, а также октапептида 9—16 ряда активных и пассивных аналогов. Полученные результаты указывают на существование значительных структурных различий между наиболее энергетически предпочтительными формами полипептидных цепей активных и пассивных модификаций онкобелка.

Одним из наиболее впечатляющих достижений молекулярной биологии последних лет стало открытие онкобелков. Установлено, что мутации в нуклеотидной последовательности, приводящие к точечным заменам аминокислот в определенных позициях полипептидных цепей, придают мутантным онкобелкам способность к злокачественной трансформации клеток живого организма. Превращение протоонкобелка в активный онкобелок сопровождается, как правило, фосфорилированием аминокислотных остатков, содержащих гидроксильную группу [1—4]. К числу объектов, привлекающих пристальное внимание исследователей, относятся, в частности, онкобелки семейства p21ras, обнаруженные в 10—20% неоплазий человека [5—7]. В первичной структуре p21 выделено несколько доменов, ответственных за различные стадии функционирования онкобелка.

Так, предполагается, что эффекторным является N-концевой фрагмент онкобелка p21 [7, 8]. Результаты многочисленных экспериментов свидетельствуют, что белки данного семейства приобретают трансформирующую способность вследствие точечных мутаций, приводящих к замене остатка Gly12 на серин, цистеин, аланин, валин, аргинин, лизин, аспарагиновую кислоту [9—12]. Зеебург с сотр. [13] сконструировали 20 мутантных генов p21, кодирующих в 12-м положении все возможные аминокислотные остатки. При этом все гены, кроме кодирующих Gly12 (природный протоонкоген) и Pro12, обладали трансформирующей активностью. Данные компьютерного анализа вторичной структуры онкобелка позволили исследователям выдвинуть предположение о том, что N-концевой домен p21 включает в себя два спиральных сегмента, разделенных участком нерегулярной структуры, в которую входит и 12-й остаток, причем замена глицина-12 на любой другой остаток, за исключением пролина, изменяет протяженность спиральных участков цепи, что и приводит к активизации онкобелка. Сантос, Редди и др. [12], изучавшие строение данного онкобелка при помощи различных методов предсказания вторичной структуры, пришли к аналогичным выводам: в пассивном аналоге [Gly12-Gly13] спирализованными являются фрагменты 1—10 и 19—32, а в трансформирующем [Asp12-Gly13] — 1—13 и 17—32.

Виглер и др. [14] показали, что активизация белка p21 осуществляется также путем замены Gly13 на другие аминокислотные остатки: аргинин, серин, глутаминовую и аспарагиновую кислоты, однако в этих случаях онкогенная активность белка значительно ниже, чем при заменах в 12-й позиции [14–16].

Другая фаза активизации онкобелков семейства p21ras обусловлена заменой остатка Gln61 на лейцин, лизин, аргинин [8, 10, 17], а также заменой Ala59 на треонин с последующим фосфорилированием последнего [18, 19]. Фосфорная группа PO₄ на гидроксильную группу остатка Thr59 переносится с гуаниновых нуклеотидов, с которыми p21 образует специфические невалентные комплексы. Предполагается, что областью связывания GTP и GDP служит участок 110–120 аминокислотной последовательности p21, причем остаток Asn116 непосредственно взаимодействует с пиримидиновым кольцом гуанина [7, 20]. Согласно данным Дер Чаннинга и др. [21], мутации по остаткам Asn116, Lys117, Asp119 понижают GTP-связывающую активность p21 *in vitro* в 10–5000 раз, хотя трансформирующая активность онкобелка при этом сохраняется.

Установлено также, что активизирующие трансформирующую активность замены в цепях ДНК могут происходить, в частности, под воздействием таких давно известных мутагенных факторов, как табачный дым и ультрафиолетовое излучение [22].

В работе Чертова и др. [23] высказано предположение о том, что фрагмент 35–44 онкобелков p21ras является участком связывания с мембранными онкобелками. Авторами выдвинута гипотеза, согласно которой сцепление между адресными фрагментами осуществляется благодаря наличию в первичной структуре онкобелков *src*, *yes*, *fgf* и *fps* участков, имеющих зеркальное по отношению к указанному фрагменту p21 расположение ионизированных остатков.

Таким образом, вся совокупность экспериментальных данных, собранных на протяжении последнего десятилетия, указывает на то, что активизация онкобелков семейства p21ras осуществляется в результате последовательности аминокислотных замен, причем трансформирующая способность приобретает вне зависимости от таких физико-химических свойств замещающего остатка, как знак заряда и полярность боковой цепи. Поэтому можно предположить, что основным следствием мутаций является формирование некоторой пространственной структуры пептидного скелета p21, необходимой для реализации трансформирующего действия. В пользу данной гипотезы свидетельствует и тот факт, что пассивные модификации онкобелка содержат в 12-м положении глицин или пролин, резко отличающиеся от прочих аминокислотных остатков именно по своим конформационным свойствам. Известно, что пролин, а также дипептид Gly-Gly обладают способностью разрушать спиральные структуры [24].

К сожалению, в настоящее время не имеется надежных экспериментальных данных о пространственном строении p21. Рентгеноструктурный анализ фрагментов 1-171 модификаций [Gly12-Gly13] и [Val12-Gly13], выполненный с разрешением 2,7 Å, показал, что трехмерные структуры обоих белков очень близки и складываются из 4 α -спиральных и 6 β -участков, причем N-концевой фрагмент молекулы имеет β -форму [25, 26]. В дальнейшем был осуществлен рентгеноструктурный анализ полных молекул указанных аналогов в комплексе с GTP при разрешении 2,2 Å [27]. Установлено, что одним из основных структурных различий между активным p21 и протоонкогенным природным белком [Gly12-Gly13] является увеличенная в трансформирующем онкобелке петля, связывающая β -фосфат гуанинового нуклеотида. Следует отметить, что ввиду недостаточно высокого разрешения, достигнутого в эксперименте, исследователям удалось определить главным образом лишь ход остова пептидной цепи,

в то время как детальная конформация онкобелка осталась практически неизвестной.

К иным выводам пришли Сантос и др. [12], изучавшие распределение регулярных участков вторичной структуры активных и пассивных аналогов р21 при помощи различных вычислительных методов. Согласно данным компьютерного анализа, в протоонкобелках [Gly12-Gly13] спирализованные фрагменты 1—10 и 19—32 разделены неупорядоченным участком, петлеобразное строение которого стимулирует стерическое сближение N-концевого α -спирального сегмента с основной поверхностью белковой молекулы. Замена Gly12 на валин или аспарагиновую кислоту приводит к увеличению протяженности участков α -спиральной структуры, которые охватывают в случае трансформирующего онкобелка фрагменты 1—13 и 17—32. В результате этих конформационных перестроек спиральный участок 1—13 заметно удаляется от основной массы атомов белковой молекулы.

С целью более детального изучения структурных аспектов аминокислотных замен был осуществлен априорный расчет пространственного строения функциональных доменов ряда модификаций р21. В настоящей работе приведены основные результаты конформационного анализа ундекапептида 1—11, общего для всех аналогов, а также фрагмента 9—16 как пассивных ([Gly12-Gly13] и [Pro12-Gly13]), как и активных [Val12-Gly13], [Asp12-Gly13] и [Gly12-Asp13] форм онкобелка.

Метод исследования

Вычисления проводились на основе предложенного Поповым [28] поэтапного подхода, основанного на последовательной минимизации полной энергии постепенно усложняющихся отрезков молекулы с переходом на заключительном этапе к исследованию структуры всей аминокислотной последовательности изучаемого пептида. Была использована написанная на алгоритмическом языке ФОРТРАН программа, разработанная в научно-исследовательской лаборатории молекулярной биофизики Бакинского государственного университета [29]. Эта программа позволяет осуществлять поиск оптимальных структур биологических полимеров путем минимизации энергии молекулы при вариации двугранных углов и постоянных длинах химических связей. Полная конформационная энергия вычисляется как сумма энергий невалентных и электростатических взаимодействий, а также энергий торсионных барьеров и водородных связей.

Величина вклада энергий невалентных контактов определяется при помощи потенциалов «6—12» Ленарда—Джонса с параметризацией Скотта и Шераги [30]. Использование параметров Момани и др. [31] было признано нецелесообразным, поскольку это приводит к более резкому отклонению в энергиях различных структур коротких фрагментов. Это может привести, ввиду специфики поэтапного подхода, к неоправданной отбраковке тех структур, предпочтительность которых определяется дальними взаимодействиями.

Энергия электростатических контактов вычисляется в монополярном приближении по закону Кулона. Поскольку эксперименты с пептидно-белковыми молекулами проводятся, как правило, в водном окружении, эффективное значение диэлектрической постоянной полярной среды было принято равным $\epsilon_{\text{эфф}}=10$, как это рекомендовано в работе Липкина и др. [32] для оптимального совпадения расчетных и экспериментальных данных. Следует отметить, что речь идет не о диэлектрической проницаемости воды ($\epsilon=80$), а об усредненном параметре, описывающем взаимодействие заряженных групп в органической среде, находящихся в непосредственном контакте с молекулами растворителя, в том числе и гидратными. Энер-

гия водородных связей оценивалась при расчетах с помощью потенциалов типа Морзе, а величины торсионных барьеров для различных химических связей взяты из работы Момани и др. [33].

При изложении результатов использована введенная Поповым [34] классификация пептидных структур на конформации, формы и шейки. Конформационное состояние каждого аминокислотного остатка полностью определяется (при заданных валентных углах и длинах связей) значениями двугранных углов φ и ψ основной цепи и углов $\chi_1, \chi_2, \dots$ боковой цепи, что позволяет представлять 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 ($\varphi = 0-180^\circ, \psi = -180-0^\circ$), 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, BR, LL, LP, PR, PB — свернутую структуру (шейп f). Таким образом, шейки вида ffffff... описывают спиральное строение основной цепи молекулы, а eeeeeee — участки β -структуры. Допускается сокращенная запись: eeeee = e_e или ffffff = f_f . 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 $\approx 180^\circ$. Так, например, в случае лизина или метионина записи $B_{1,3}$ и $B_{1,3,2,2}$ эквивалентны.

Исходным приближением для расчетов послужили известные значения двугранных углов, соответствующие низкоэнергетическим состояниям монопептидов. Аминокислотные остатки рассматривались в формах B, R, L, кроме пролина, не имеющего L-состояния, а для глицина учитывалось также состояние P. При этом боковым углам χ_1, χ_2 метионина, глутаминовой кислоты, лизина и лейцина, а также углам χ_1 треонина, тирозина и валина были приданы значения $60, 180$ и -60° . Углы χ_2 тирозина и аспарагиновой кислоты, а также угол χ_3 глутаминовой кислоты имели равновесную величину 90° . Поскольку вариации углов χ_3, χ_4, χ_5 метионина, лизина, лейцина и аргинина не сопровождаются заметным изменением конформационной энергии, эти углы имели значение 180° .

Результаты расчетов

Начальная стадия работы была посвящена изучению конформационных возможностей трипептидных фрагментов, перекрывающих всю аминокислотную последовательность ундекапептида 1—11. Схема поэтапного расчета приведена на рис. 1. Наиболее предпочтительные конформации трипептидов 1—3, 3—5, 5—7 и 7—9 были использованы для исследования пространственного строения участков Met1—Lys5 и Lys5—Val9.

Данные, полученные в результате расчетов, свидетельствуют о конформационной жесткости трехмерной структуры обоих пентапептидов. Для фрагмента 1—5 наиболее предпочтительными оказались шейки efec ($E_{отн} = 0,0$ ккал/моль), e_e (1,2), eefe (4,0), effe (4,1) и ffee (4,3), а для фрагмента 5—9 — ef_3 (0,0), effe (1,5), f_e (1,7). Все прочие шейки данных пентапептидов имеют относительную энергию, превышающую 5 ккал/моль.

Минимизированные значения двугранных углов низкоэнергетических конформаций указанных пентапептидных фрагментов послужили начальным приближением при составлении исходных вариантов для расчета нонапептида 1—9. Расчеты показали резкую предпочтительность структур, соответствующих развернутому строению основной цепи участка 1—4, и предпочтительность спиральных форм на участке 5—9. Глобальная кон-

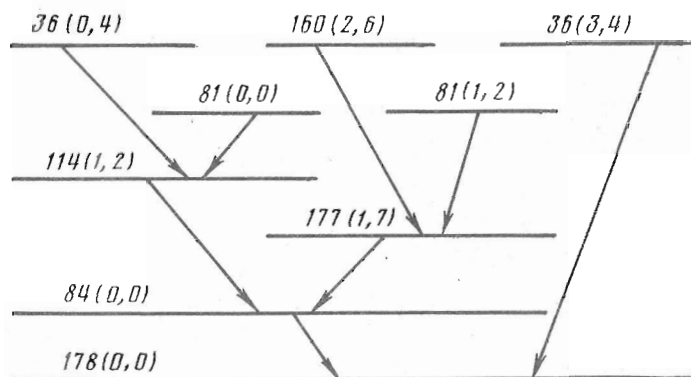


Рис. 1. Схема поэтапного расчета фрагмента 1—11. Для каждого фрагмента указаны число рассчитанных структурных вариантов и относительная энергия конформационного состояния (в скобках, ккал/моль), соответствующего геометрии глобальной структуры ундекапептида

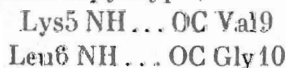
формация данного пептида принадлежит шейпу e_1f_1 , далее, в порядке возрастания относительных энергий, следуют fe_2f_1 (4,0 ккал/моль), $eeef_1$ (4,9) и e_2f_2 (4,9), fe_1f_2 (6,2), ffe_2f_2 (6,9), fe_1fe (7,7), e_2 (9,1).

В то же время для конформаций, обладающих на участке 5—9 строением, соответствующим структурным типам $eeef$ и $eeef$, а также для большинства форм, указанный фрагмент которых соответствует структурным типам e_1 и e_2f , относительная энергия превышает 13 ккал/моль, что делает крайне маловероятной возможность реализации подобных форм в нативном белке. Отметим также, что в глобальной конформации пептида спиральная структура участка 5—9 приводит к образованию характерной водородной связи $Tyr_4 \cdots NH \cdots OC \text{ Val8}$, длина которой равна 2,04 Å.

На завершающем этапе работы исследовались конформационные возможности и пространственное строение всего ундекапептидного фрагмента 1—11. Результаты вычислений, приведенные в табл. 1, подтверждают сделанный ранее вывод о предпочтительности для данной последовательности структурных типов, отвечающих полностью свернутому строению основной цепи на участке 5—9. При этом глобальная конформация соответствует наиболее компактной упаковке ундекапептида, т.е. характеризуется минимальным расстоянием между α -атомами углерода 1-го и 11-го остатков. Строение основной цепи наиболее предпочтительных конформаций ундекапептида изображено в наиболее наглядных проекциях на рис. 2.

Развернутая структура e_1 N-концевого тетрапептида в оптимальных конформациях стабилизируется сильным взаимодействием отрицательно заряженной боковой цепи глутаминовой кислоты с положительно заряженными группами метионина (вклад этого контакта достигает -10 ккал/моль) и лизина (-14 ккал/моль). Взаимодействия лизина с тирозином и Val8, лейцина с глицином, Val9 с глутаминовой кислотой, лизином, аланином и Val8 дают вклад около -2,5 ккал/моль для подавляющего большинства низкоэнергетических конформаций, а кулоновское отталкивание одноименно заряженных групп боковой цепи лизина и основной цепи метионина характеризуются энергетическим вкладом около 3—4 ккал/моль.

Для форм основной цепи BBRLRRRRRRR, содержащих наиболее протяженный участок спиральной структуры, возникают водородные связи:



Относительная энергия, величины невалентных, электростатических и торсионных вкладов (ккал/моль) и линейные размеры (Å) наиболее предпочтительных конформаций фрагмента 1–11

Шейпы	Формы основной цепи	$E_{\text{отн}}$	$E_{\text{нев}}$	$E_{\text{эл}}$	$E_{\text{торс}}$	$R (C_1 - C_{11})$
$e_1 f_4 e f$	BBRLRRRRRPR	0,0	-51,8	6,3	4,6	10,1
$e_1 f_4 e_2$	BBRLRRRRBBR	2,6	-48,3	5,8	4,3	10,9
$e_1 f_6$	BBRLRRRRRRR	3,1	-50,3	7,1	5,4	12,2
$f e_3 f_4 e f$	LLRLRRRRRPR	3,6	-48,6	6,7	4,6	10,3
$e_5 f_5$	BBRLBRRRBPR	4,0	-47,8	4,4	6,5	16,5
$e_5 f_3 e_2$	BBRLBRRRBBR	5,7	-47,1	5,9	6,0	16,2
$e_5 f_3 e f$	BBRLBRRRBPR	6,6	-46,9	6,6	6,0	13,9
$f e_4 f_3 e_2$	LLRLBRRRBBR	6,9	-46,1	5,9	6,3	16,1
$f e_4 f_3 e f$	LLRLBRRRPR	7,9	-45,7	6,5	6,2	14,0
$e f e_3 f_2 e f_2$	BRBBBRRBBPR	8,3	-48,8	6,6	9,6	15,6
e_{10}	BBRLBBBBBBB	12,8	-38,0	4,5	5,5	23,8
$e_8 f e$	BBRLBBBBRBR	12,9	-37,9	4,6	5,4	26,3

соответствующие α -спирали, а в случае формы BBRLBRRRBPR складываются водородные связи

Lys5 NH ... OC Gly10

Leu6 NH ... OC Ala11

характерные для π -спирального типа полипептидной цепи.

Проведенное исследование показало, что трехмерное строение фрагмента 1–11, общего для всех модификаций онкобелков p21, определяется конформационным равновесием ограниченного набора структурных типов, обеспечивающих плотную укладку основной и боковых цепей молекулы. Конформационная жесткость ундекапептида определяется стабилизирующими контактами между остатками, которые делают предпочтительными крайне небольшое количество шейпов и форм основной цепи данного участка белковой молекулы.

Затем исследовались особенности строения различных модификаций участка 9–16, на котором происходят активизирующие аминокислотные замены. Вначале были изучены конформационные возможности двух сходных по первичной структуре трипептидов: Val9-Gly10-Ala11 и Val14-Gly15-Lys16, для каждого из которых рассчитано по 36 конформационных вариантов. Наиболее предпочтительные формы обоих фрагментов принадлежат шейпам ff, ee и ef.

На следующем этапе исследовались конформационные возможности тетрапептида 11–14 пяти аналогов p21. Было рассмотрено 16 структурных вариантов для модификации [Pro12-Gly13], по 48 вариантов для [Gly12-Gly13] и [Gly12-Asp13], по 72 для аналогов [Val12-Gly13] и [Asp13-Gly13]. Результаты вычислений указывают на существенные различия в строении основной цепи активных и пассивных аналогов. Для активных форм [Val12-Gly13] и [Asp12-Gly13] в число низкоэнергетических попадают представители спирального шейпа f_3 , в то время как в пассивных формах спиральная структура участка 11–14 либо соответствует исключительно высокой величине относительной энергии (случай природного протонкогенного белка), либо вовсе не реализуется (пролиновый аналог). Для модификации онкобелка [Gly12-Asp13] оптимальным оказался структурный тип eff, а шейп f_3 имеет относительную энергию, равную 4,2 ккал/моль.

На основе минимизированных двугранных углов оптимальных конформаций фрагментов 9–11 и 11–14 было составлено 66 структурных вариан-

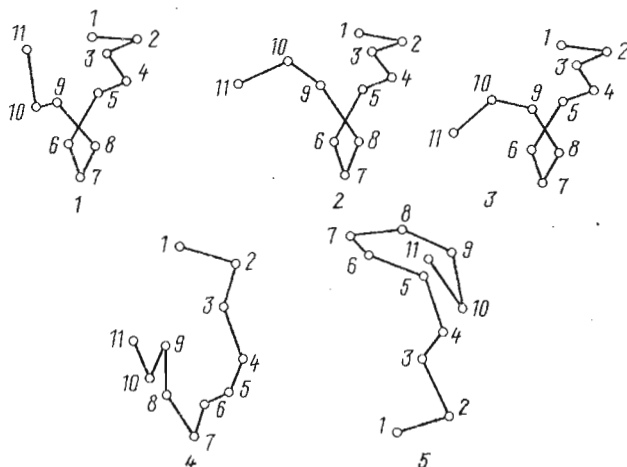


Рис. 2. Наиболее предпочтительные структуры фрагмента 1-11. 1 — e_1f_1ef , 2 — $e_1f_1e_2$, 3 — $e_1f_1e_3$, 4 — fe_3f_1ef , 5 — e_3f_1

тов для гексапептида 9-14 аналога [Gly12-Gly13], 64 варианта аналога [Pro12-Gly13], 175 вариантов [Val12-Gly13], 114 — [Asp12-Gly13] и 96 вариантов аналога [Gly12-Asp13]. Проведенные расчеты свидетельствуют о возможных различиях в пространственном строении активных и пассивных модификаций. Если для глицин-глициновой и пролин-глициновой форм фрагмента энергетически выгодны лишь конформации с преимущественно развернутой структурой участка 11-12, то глобальные конформации активных аналогов [Val12-Gly13] и [Asp12-Gly13] принадлежат полностью свернутому шейпу f_3 . Отметим также, что наиболее предпочтительный представитель данного шейпа в случае [Gly12-Gly13] характеризуется относительной энергией, превышающей 30 ккал/моль, вследствие чего реализация полностью свернутых форм основной цепи на участке 9-14 молекулы протоонкобелка становится в высшей степени проблематичной. В то же время для аналога [Gly12-Asp13] глобальная конформация принадлежит шейпу $ffef$, тогда как оптимальная спиральная конформация обладает относительной энергией, равной 4,0 ккал/моль.

Заключительная стадия исследований была посвящена конформационному анализу октапептида 9-16. Исходным приближением для расчетов послужили наиболее предпочтительные структуры фрагментов 9-14 и 14-16. Основные результаты вычислений суммированы в табл. 2.

Согласно данным, полученным в итоге вычислений, для обеих активных модификаций фрагмента характерна резко выраженная энергетическая предпочтительность спиральной формы основной цепи (шейп f_1). С другой стороны, данный структурный тип оказался невыгодным для обеих пассивных аналогов и характеризуется довольно высокими значениями энергии для онкобелковой модификации [Gly12-Asp13], имеющей пониженную трансформирующую активность. Спирализованные конформации активных аналогов отвечают плотной упаковке основной и боковых цепей полипептидного фрагмента, а также стабилизированы сильными взаимодействиями между остатками, в том числе большим количеством сильных водородных связей между удаленными по цепи аминокислотными остатками.

Следует обратить внимание на то, что для активных аналогов данного фрагмента наиболее предпочтительны полностью свернутые формы основной цепи, которые не относятся к α -спиральному структурному типу. Как

Таблица 2

Относительные энергии (ккал/моль) наиболее предпочтительных конформаций фрагментов 9–16 активных и пассивных аналогов

Шейпы	Val12-Gly13	Asp12-Gly13	Gly12-Asp13	Gly12-Gly13	Prot2-Gly13
f_7	0,0	0,6	8,3	*	—
f_{se}	6,2	0,0	*	—	—
f_{seff}	1,9	—	3,2	3,2	—
e_2f_5	2,3	4,3	—	8,0	—
f_{se_2}	2,3	2,4	6,9	11,2	—
$efeffe$	3,4	1,0	1,0	4,7	—
$efeffee$	3,6	—	2,2	0,0	—
e_3f_{se}	3,9	3,4	—	2,8	—
$f_{se_4}f$	4,2	—	—	5,5	2,1
$ffefefe$	4,4	—	—	3,7	5,1
$ffefeef$	—	—	—	3,8	2,0
efe_5	—	—	—	—	0,1
$efefe_3$	—	—	—	3,4	0,0
$efefeef$	—	—	—	3,1	2,5
f_{se_5}	6,1	—	—	5,5	0,7
$efef_3$	6,6	7,0	6,1	2,3	—
$f_{se_2}f_3$	9,4	—	8,7	3,0	—
$effeefe$	—	—	0,0	—	—
$eeffeeef$	—	7,0	3,0	5,0	—
$feeffee$	4,9	5,1	—	—	—
$feefe_3$	5,3	5,7	—	—	—
$feeffeeef$	7,0	8,2	—	—	—
$feeffef$	7,2	7,3	—	—	—
Количество рассчитанных конформаций	117	108	138	172	65

Примечание. Звездочкой обозначены энергии, превышающие 100 ккал/моль, прочерк (—) означает, что подобные структуры для данного аналога не рассматривались.

Таблица 3

Относительные энергии, величины невалентных, электростатических и торсионных вкладов для наиболее предпочтительных конформаций шейпа f_7 фрагмента 9–16 активных аналогов p21 (ккал/моль)

Аналог	Конформация	$E_{отн}$	$E_{нев}$	$E_{эл}$	$E_{торс}$
Val12-Gly12	$B_1PRB_2PB_3PR_3$	0,0	–28,4	8,4	4,0
	$B_3PRB_2PR_2RR_3$	0,6	–27,8	8,7	3,7
	$R_2RRR_2RR_2RR_3$	2,2	–25,5	9,5	2,2
Asp12-Gly13	$B_1PRB_3PB_1PR_3$	0,6	–28,9	7,3	4,5
	$B_1PRB_3PR_1RR_3$	1,2	–27,0	6,1	4,3
	$R_2RRR_2RR_2RR_3$	3,0	–26,4	8,7	2,9
Gly12-Asp13	$R_2RRRR_2R_2RR_3$	8,3	–19,4	9,1	1,7
	$R_2RRRR_2B_1PR_3$	8,5	–19,8	8,8	2,5
	$B_1PBPR_{32}B_2PR_3$	13,8	–18,6	9,0	6,5

видно из табл. 3, в случае модификаций [Val12-Gly13] и [Asp12-Gly13] оптимальные спиральные формы относятся к л-спирали, для которой характерно чередование конформационных звеньев типа BPR..., в то время как α -спиральные формы RRRRR... имеют сравнительно высокие значения относительной энергии.

Резюмируя итоги данного этапа конформационного анализа, можно высказать предположение, что активизирующие замены 12-го и, хоть и в меньшей степени, 13-го остатков сопровождаются существенной пере-

стройкой пептидного скелета молекулы на участках, прилегающих к точке замены, приводящей к спирализации всего фрагмента 9—16. Данный вывод хорошо согласуется с результатами статистического анализа вторичных структур р21, опубликованными в работах [12, 14].

Результаты, полученные в процессе исследования фрагментов 1—11 и 9—16, являются необходимой предпосылкой для изучения пространственного строения и конформационных возможностей N-концевого домена различных модификаций онкобелков семейства р21. Наиболее предпочтительные конформации изученных участков послужили исходным приближением при составлении структурных вариантов гексадекапептидов 1—16 активных и пассивных аналогов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bishop J. M. // *Adv. Cancer Res.* 1982. V. 37. P. 1—32.
2. Bishop J. M. // *Ann. Rev. Biochem.* 1983. V. 52. P. 301—354.
3. Киселев Л. Л. // *Молекуляр. биология.* 1985. Т. 19. № 2. С. 309—332.
4. Молекулярная онкология. М.: Медицина, 1986. 352 с.
5. Lowy D. R., Williams B. M. // *Cancer. Surv.* 1986. V. 5. № 2. P. 275—289.
6. Carney W. R., Pettit D., Hamer P., Der C. J., Finkel T., Cooper G. M., Lefebvre M., Moblaker H., Delellis R., Tischler A. S., Dayal Y., Wolfe H., Rabin H. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1986. V. 83. № 19. P. 7485—7489.
7. Shih T. Y., Hattori S., Clanton D. J., Ulsh L. S., Chen Zhang-an, Lauenberger J. A., Papas T. S. // *Gene Amplificat. and Anal.* V. 4. N. Y. e. a. 1986. P. 53—72.
8. Фаворова О. О., Фролова Л. Ю., Прасолов В. С. // *Журн. Всес. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева.* 1986. Т. 31. № 3. С. 278—285.
9. Gibbs J. R., Sigal I. S., Scolnick E. M. // *Trends Biochem. Sci.* 1985. V. 10. № 9. P. 350—353.
10. O'Hara B. M., Oskarsson M., Tainsky M. A., Blair D. G. // *Cancer Res.* 1986. V. 46. № 9. P. 4695—4700.
11. Greanhalgh D. A., Kinsella A. R. // *Cancerogenesis.* 1985. V. 6. № 10. P. 1533—1535.
12. Santos E., Reddy E. P., Pulciany S., Feldmann R. J. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1983. V. 80. № 15. P. 4679—4683.
13. Seeburg P. H., Colby W. W., Capon D. J., Goeddel D. V., Levinson A. D. // *Nature.* 1984. V. 312. № 5989. P. 71—75.
14. Wigler M., Fasaro O., Taparowsky E., Powas S., Kataoka T., Birnbaum D., Shimizu K., Goldfarb M. // *Cancer Cells.* 1984. № 2. P. 419—423.
15. Kozma S. C., Bogaard M. E., Buser K., Saurer S. M., Fos J. L., Groner B., Hyman N. E. // *Nucl. Acids Res.* 1987. V. 15. № 15. P. 5963—5971.
16. Nishida J., Kobayashi Y., Hirai H., Takaku F. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1987. V. 146. № 1. P. 247—252.
17. Pos J. L., Verlaan-de-Vries M., Marshall C. J., Veeneman G. H., Boom J. H., Eb A. J. // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. № 3. P. 1209—1217.
18. Gibbs J. R., Ellis R. W., Scolnick E. M. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1984. V. 81. № 9. P. 2674—2678.
19. Issel J. C., Aaronson S. A. // *Mol. and Cell. Biol.* 1986. V. 12. № 12. P. 4214—4220.
20. Walter M., Clark S. G., Levinson A. D. // *Science.* 1986. V. 233. № 4764. P. 649—652.
21. Der Channing J., Pan Bin-Tao, Cooper G. M. // *Mol. and Cell. Biol.* 1986. V. 6. № 9. P. 3291—3294.
22. Pos J. L. // *J. Cell. Biochem.* 1989. Suppl. № 13E. P. 271.
23. Чертыс О. Ю., Хозлачев А. В., Дейчин В. И. // *Биооргани. химия.* 1986. Т. 12. № 9. С. 1157—1163.
24. Шильд Г., Ширмер Р. Принципы структурной организации белков. М.: Мир, 1982. 356 с.
25. Jancarik J., Miura K., Noguchi S., de Vos A., Ohtsuka E., Nishimura S., Kim Sung-Hov // *J. Mol. Biol.* 1988. V. 200. № 1. P. 205—207.
26. De Vos A. M., Tong L., Milburn M. V., Matias P. M., Jancarik J., Noguchi S., Nishimura S., Miura K., Ohtsuka E., Kim S.-H. // *Science.* 1988. V. 239. № 4842. P. 888—893.
27. Tong L., de Vos A. M., Milburn M. V., Jancarik J., Noguchi S., Nishimura S., Miura K., Ohtsuka E., Kim S.-H. // *Nature.* 1989. V. 337. № 6202. P. 90—93.
28. Понев Е. М. // *Молекуляр. биология.* 1975. Т. 9. № 4. С. 578—593.
29. Гаджаев Н. М., Максумов И. С. // *Научн. тр. Минвуза АзССР.* 1979. № 5. С. 157—162.
30. Scott R., Scheraga H. // *J. Phys. Chem.* 1966. V. 70. P. 2091—2101.
31. Momany F. A., Corbridge L. M., McGuire R. F., Scheraga H. A. // *J. Phys. Chem.* 1974. V. 78. P. 1595—1620.

32. Липкин Г. М., Архипова С. Ф., Попов Е. М. // Журн. структур. химии. 1970. Т. 11. № 1. С. 121–126.
33. Momany F., McGuire R., Burgess A., Scheraga H. // J. Phys. Chem. 1975. V. 79. P. 2361–2381.
34. Попов Е. М. // Физика макромолекул. Киев: Наукова думка, 1980. Т. 8. С. 69–113.

Поступила в редакцию
17.VII.1990

После доработки
19.II.1991

K. D. MZAREULOV

**CONFORMATIONAL ASPECTS OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF
FUNCTIONAL FRAGMENTS OF THE p21ras ONCOPROTEIN FAMILY.
1. FRAGMENTS 1–11 AND 9–16 OF THE POLYPEPTIDE CHAIN**

Baku State University, Baku

Using theoretical conformational analysis, spatial structures of the N-terminal undeka-peptide, common to all p21 modifications, and of the 9–16 fragments of the protein's active and passive analogues have been investigated. The data obtained reveal an essential differences between the predominant backbone forms of the active and passive modifications of the oncoprotein.