

И. Э. ЛАЛАЯНЦ

О ВАЛИНОВОЙ ЗАМЕНЕ В ПРОДУКТАХ ОНКОГЕНОВ
И ПРИ СЕРПОВИДНОКЛЕТОЧНОЙ АНЕМИИ

Проведен анализ литературных данных, касающихся аминокислотных последовательностей нормальных белков и белковых продуктов онкогенов. Выявлена определенная закономерность в виде валиновой замены в последних. Валиновзая замена была обнаружена в бета-цепи гемоглобина при серповидно-клеточной анемии, которая, возможно, является генетическим механизмом защиты от малярии. Это позволяет проводить определенную связь на молекулярном уровне между некоторыми формами рака и малярией.

Исследование активации онкогенов семейства *gas* показало, что для приобретения ими трансформирующих свойств в культуре фибробластов достаточно точковой мутации в 12 кодоне, что приводит к замене глицина на валин в 12 положении от N-конца белковой цепи. Моноаминокислотная валиновая замена в белке *p 21-gas*, продукте онкогенов семейства *gas*, приводит к потере данным белком ГТФ-азной активности, в результате чего нормальный белок приобретает трансформирующие свойства [1, 2, 14, 17, 19, 20]. Известно, что моноаминокислотные замены в определенном сайте полипептидной цепи могут существенно изменять свойства белка [1, 4, 11, 18, 21].

Замена на валин обнаруживается и в продуктах некоторых других онкогенов (табл. 1), однако пока неясно, имеет ли она значение для приобретения трансформирующих свойств продуктами онкогенов *p 74 egv-B* и *p 28 sis* [1, 2]. Замена на валин известна относительно давно при серповидно-клеточной анемии, которая, возможно, является генетическим механизмом защиты от малярии [1].

В настоящее время выявлен клеточный механизм этой связи. Показано, что при малярийной атаке развивается иммуносупрессия вследствие резкого снижения количества субпопуляции Т-хелперов [1]. После излечения малярии число Т-хелперов возвращается к норме. Валиновая замена в бета-цепи гемоглобина является одним из действенных механизмов снижения паразитемии. В настоящее время высказано положение, согласно которому постулируется роль гидроксильной группы -ОН глютаминовой кислоты в 6 положении бета-цепи, которая принимает участие в связывании кислорода гемом [1]. Как известно, при замене на валин уменьшается сродство гемоглобина к кислороду, что и определяется этой заменой. В свою очередь, уменьшение сродства к кислороду может влиять на способность плазмодия к пенетрации мембраны эритроцита и, тем самым, снижение паразитемии.

Влияние замены глицина на валин в белке *p 21*, продукте онкогенов семейства *gas*, на функцию данного белка может объясняться различием природы этих двух аминокислот. Известно, что глицин участвует в образовании изгибов белковой цепи. Так, глицин в 5,5 раз чаще встречается в изгибах, чем валин, и в три раза реже в альфа-спирали [3]. Показано, что при замене глицина на валин в 12 положении белка *p 21* нарушается изгиб первого домена в районе 12 и 13 глициновых остатков, при этом угол отклонения составляет 25° [1, 14].

При компьютерном анализе было также показано, что аминокислоты делятся на два класса по их способности к изгибу в районе С-альфа атома: R: A L H V Y I F C W M F: K S G P D E Q T N R

Как видно из состава групп, валин (V) относится к ригидным или «жестким» аминокислотам, а глицин (G) к аминокислотам с меньшей жесткостью (F) [8]. Таким образом, можно считать установленным то, что для осуществления функции белка р 21 очень важен изгиб первого домена в районе 12 и 13 глициновых остатков. Замена этих глицинов ведет к приобретению белком р 21 трансформирующих свойств [1, 2].

Известно, что белок р 21 и некоторые другие gas-родственные белки, например трансдуцин-альфа, мембранный белок палочек сетчатки глаза человека, обладают ГТФ-азной активностью, которая теряется при замене глицина в 12 положении на валин [1, 19, 20, 23]. Моноклональные антитела, специфичные к глицину в 12 положении, подавляют связывание белком р 21 ГТФ [4]. В то же время замена на валин не влияет на связывание ГТФ [11], оно может даже увеличиваться. Это говорит о том, что аминокислоты в 12 и 13 положениях непосредственно не участвуют в связывании ГТФ.

Таблица 1

Замена на валин в продуктах онкогенов и в гемоглобине

1	p ²¹ H-gas	12:	Mteyklvvvga	<u>G</u>	Gvgksaltqlieh
	p ²¹ КМП	12:	Mteyklvvvga	<u>V</u>	Gvgksaltqlieh
2	p ²¹ H-gas	13:	Mteyklvvvgag	<u>G</u>	Vgksaltqlieh
	p ²¹ ОМЛ	13:	Mteyklvvvgag	<u>V</u>	Vgksaltqlieh
3	РЭФР	691:	Lrlketefkk	<u>I</u>	Kvlg-Sgafgtvykgl
	p ⁷⁴ erb-B	136:	Lrlketefkk	<u>V</u>	Kvlg-Sgafgtiykgl
	РЭФР	902:	Ydgipassels	<u>I</u>	Lekgerlpqpicti
	p ⁷⁴	347:	Ydgipassels	<u>V</u>	Lekgerlpqpicti
	РЭФР	994:	Mddvvdadeyl	<u>I</u>	Pqqgffspstrstp
	p ⁷⁴	439:	Medivdadeyl	<u>V</u>	Phqgffspstrstp
4	ТФР	7:	Slgslt	<u>I</u>	Aepamiaecktrtev
	p ²⁸ end	7:	Slgsht	<u>I</u>	Aepamiaecktrtev
	p ²⁸ sis	73:	Slgsis	<u>V</u>	Aepamiaecktrtev
5	Hb A	6:	Vhltp	<u>E</u>	Eksavtalwgkvnvd
	Hb S СКА	6:	Vhltp	<u>V</u>	Eksavtalwgkvnvd

Примечание: Р²¹ H-gas—белковый продукт клеточного гена c-H-gas. p²¹ КМП—продукт онкогена семейства gas при карциноме мочевого пузыря человека. p²¹ ОМЛ—то же при острой миелоидной лейкемии. РЭФР—аминокислотная последовательность рецептора эпидермального фактора роста человека. p⁷⁴ erb-B—продукт онкогена erb-B вируса эритроblastоза птиц АЕV. ТФР—аминокислотная последовательность тромбоцитарного фактора роста человека. p²⁸end—ТФР, вырабатываемый эндотелиальными клетками сосудов человека. p²⁸sis—продукт онкогена sis вируса саркомы обезьян SSV. HbA—бета-цепь гемоглобина здорового взрослого. HbS—гемоглобин больного серповидно-клеточной анемией.

Цифры показывают положение, в котором произошла замена на валин (V).

Изгиб в районе 12 и 13 глицинов белка р 21 служит для фиксации гамма-фосфата гуанозинтрифосфата (ГТФ), который вследствие этого

может атаковаться нуклеофильным агентом, например, атомами азота и кислорода $-NH_2$ и $-OH$ групп глутамина и глутаминовой кислоты в 61 и 63 положениях соответственно. Анализ количественных данных по снижению ГТФ-азной активности при аминокислотных заменах в белке р 21 показывает, что если при валиновой замене в 12 положении активность падает в 10 раз, то при замене глутамина (Q) на лейцин (L) в 61 положении она снижается в 50 раз [19, 20].

Таблица 2

Консервативность некоторых аминокислот в gas-родственных белках различных организмов

	N _____ C						
	12	13	16	59	61	63	186
Человек p ²¹ gas	G	G	K	A	Q	E	C
Грызуны p ²¹ gas	G	G	K	A	Q	E	C
Дрозофила	G	G	K	A	Q	E	C
Дрожжи	G	G	K	A	Q	E	C
Гриб-слизевик	G	G	K	A	Q	E	C
Улитка p ²¹ rho	G	A	K	A	Q	D	C
Человек ген-rho				A	Q	D	C
Трансдуцин-альфа	G	E	K	M	T	Q	C

Примечание. Человек p²¹ gas—продукт клеточного гена c-H-gas человека. Грызуны p²¹ gas—то же крысы и мыши. Дрозофила—продукт gas-родственного гена дрозофилы. Дрожжи—то же дрожжей разных видов. Гриб-слизевик—то же гриба диктиостеллиума. Улитка p²¹rho-gas—гомологичный белок морской улитки аплизин. Человек ген-rho—аминокислотная последовательность, кодируемая геном rho человек. Трансдуцин-альфа—gas родственный белок из мембраны наружного членика палочки сетчатки быка, обладающий ГТФ-азной активностью, как и белок p²¹. Аминокислоты: G—глицин, A—аланин, Q—глутамин, E—глутаминовая кислота, C—цистеин, D—аспарагиновая кислота, M—метионин, T—треонин, K—лизин; N—азотный конец белковой цепи, C—углеродный. Цифры показывают положение аминокислот в белке p²¹ c-H-gas.

Кроме 12, 13 и 61 положений, замены еще в трех положениях белка р 21 ведут к нарушению его биологических функций (табл. 2) [1, 10, 13, 15, 16, 22]. Лизин в 16 положении (K) участвует в связывании ГТФ, и цистеин в 186 способствует ассоциации белка р 21 в нижнем слое клеточной мембраны. А замена аланина (A) на треонин в 59 положении показана при некоторых опухолях. Данная замена ведет к аутофосфорилированию белка р 21 и нарушению его нормальной функции [19]. Все приведенные данные позволяют дать схему организации активного центра белка р 21, в котором в результате нуклеофильной атаки происходит гидролиз гамма-фосфата ГТФ (рис.).

В последнее время приведенная на рисунке схема получила качественное и количественное подтверждение. В работах, посвященных анализу пространственной архитектуры белка р 21 и родственных ему по функции белков, было показано наличие изгиба первого домена в районе, соответствующем 12 глицину [6, 7]. При компьютерном анализе пространственного положения изгиба в районе 12 и 13 глицинов белка

р 21 выявлено расположение 12 глицина напротив глутамина в 61 положении, что видно на схеме [12].

Экспериментально показано, что замена лизина в 16 положении белка р 21 ведет к уменьшению связывания ГТФ в 100 раз. Показана консервативность лизина (К) в РЭФР и продуктах некоторых онкогенов, в частности белке р 60 вируса саркомы Рауса [21]. Возможно, что консервативность лизина позволяет как-то связывать белки р 21 и РЭФР, а также продукты некоторых онкогенов.

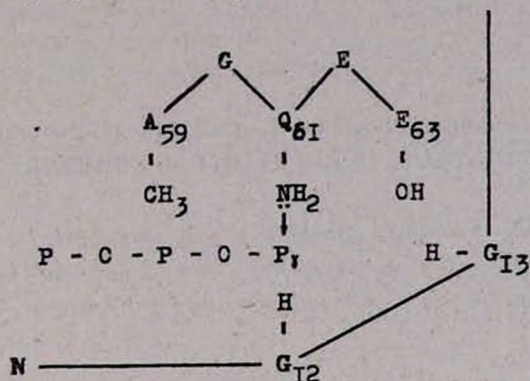


Рис. Пространственная организация активного центра белка р 21, в котором осуществляется гидролиз гамма-фосфата ГТФ. Обозначения: А—аланин, Q—глутамин, Е—глутаминовая кислота, G—глицин, $\text{CH}_3\text{NH}_2\text{OH}$ —концевые группы боковых радикалов аминокислот, N—азотный конец белковой цепи, H—водород бокового радикала глицина, P_γ —гамма-фосфат ГТФ.

Экспериментально также показано, что степень нарушения изгиба влияет на фосфорилирование белка р 21 по треонину в 59 положении [19]. При наличии в 12 положении глицина, то есть аминокислоты, относящейся к классу аминокислот с меньшей ригидностью [8], фосфорилированию подвергается 14% белка р 21, а при наличии ригидного валина в 12 положении фосфорилируется 50% белка. Это говорит о том, что при замене глицина на валин изгиб первого домена белка р 21 уменьшается и угол отклонения увеличивается, что «открывает» активный центр, в результате чего фосфорилирование треонина (Т) в 59 положении увеличивается.

Если вместо ригидного валина в 12 положении оказывается не глицин, а аргинин, который также относится к аминокислотам с меньшей ригидностью, то фосфорилирование треонина достигает всего 24%. Все эти данные хорошо объяснимы, если принять во внимание наличие изгиба первого домена белка р 21 в районе 12 и 13 глициновых остатков.

Анализ данных позволяет провести определенную связь на молекулярном уровне между некоторыми формами рака и малярией, которая уже обсуждалась в литературе [1]. Исходя из предположения о большой биологической значимости валиновой замены в определенных сайтах для функции белков, можно прийти к выводу о возможных механизмах нарушения функции белка р 21 при заменах аминокислот в эволюционно-консервативных сайтах, в частности 12, 13, 59, 61 и 63.

То, что функция белка р 21 нарушается при заменах в 59, 61 и 63 положениях, то есть через одну аминокислоту, позволяет предположить наличие в этом районе бета-структуры, что было подтверждено при компьютерном анализе [12]. Понимание организации активного центра белка р 21 приведет к более быстрому раскрытию функции этого ракового белка.

Институт нейрохирургии
им. Н. Н. Бурденко АМН СССР

Поступила 20/XI 1985 г.

Ի. Է. ԼԱԼԱՅԱՆՏ

ՎԱԼԻՆԻ ՓՈՆԱՐԻՆՈՒՄԸ ՕՆԿՈԳԵՆՆԵՐԻ ՆՅՈՒԹԵՐՈՒՄ
ԵՎ ՄԱՆԳԱՂԱԶԵՎ ԱՆԵՄԻԱՅԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

Բերված է ժամանակակից գրականության տվյալների վերլուծությունը, կապված վալինի փոխարինման հետ որոշ սպիտակուցների մեջ: Հաստատված է կապ բաղեցկեղի որոշ ձևերի և մալարիայի միջև մոլեկուլյար մակարդակի վրա:

I. E. LALAYANTS

ON THE VALINE SUBSTITUTION IN THE ONCOGENES PRODUCTS
AND IN SICKLE-CELL ANEMIA

The modern literature on the valine substitution in some proteins has been analyzed. The interaction between some forms of cancer and malaria on molecular level is observed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Лалаянц И. Э. Гематол. и трансфузиол., 1985, т. XXX, II, с. 49.
2. Bos J., Toksoz D. Nature, 1985, 315, 6022, 726.
3. Chou P., Fasman G. Biochemistry, 1974, 13, 2, 222.
4. Clark R., Wong G., Aruheim N. PNAS, 1985, 82, 16, 5280.
5. Cour T., Nyborg J., Thirup S. EMBO J., 1985, 4, 9, 2385.
6. Fry D., Kaby S., Mildvan A. PNAS, 1986, 83, 4, 907.
7. Jurnak F. Science, 1985, 230, 4721, 26.
8. Karplus P., Schultz G. Naturwissenschaft, 1985, 72, 4, 212.
9. Lev Z., Kimchile Z. Molecular Cellular Biology, 1985, 5, 6, 1540.
10. Madaule P., Axel R. Cell, 1985, 41, 1, 31.
11. Manne V., Bekesi E., Kunf H. PNAS, 1985, 82, 2, 376.
12. Mc Cormic F., Clark B., Cour T. Science, 1985, 230, 4721, 78.
13. Neuman F., Schejter E. Cell, 1984, 37, 3, 1027.
14. Pinkus M., Brandt P. PNAS, 1985, 82, 11, 3596.
15. Powers S., Kataoka T., Fasano O. Cell, 1984, 36, 3, 607.
16. Reymond C., Gomer R., Mehdy M. Cell, 1985, 39, 1, 141.
17. Seeburg P., Colby W. Nature, 1984, 312, 5989, 71.
18. Sigal I., Gibbs J. PNAS, 1986, 83, 4, 952.
19. Sweet R., Yokoyama S., Kamata T. Nature, 1984, 311, 5983, 273.
20. Temeles G., Gibbs J., Alonso J. Nature, 1985, 313, 6004, 700.
21. Weinmaster G., Zoller M., Pawson T. EMBO J., 1986, 5, 1, 69.
22. Yamanaka G., Eckstein F., Stryer L. Biochemistry, 1985, 24, 27, 8094.
23. Yatsunami K., Khorana H. PNAS, 1985, 82, 13, 4316.