

参 考 文 献

- 1 柯 杨, 宁 涛, 王 冰, 等. 人胃粘膜上皮细胞系 GES-1 的建立及其生物学特性. 中华肿瘤杂志, 1994, 16 (1): 7~10
Ke Y, Ning T, Wang B, *et al.* Chinese Journal of Oncology, 1994, 16 (1): 7~10
- 2 崔大祥, 闫小君, 苏成芝. 采用改进的差示 PCR 技术分离胃癌差异表达基因及其临床意义. 第四军医大学学报, 1998, 19 (6): 601~605
Cui D X, Yan X J, Su C Z. J Fourth Milit Med Univ, 1998, 19 (6): 601~605
- 3 崔大祥, 闫小君, 范清宇, 等. 骨骼肌肿瘤中 c-myc 癌基因的改变及其预后意义. 第四军医大学学报, 1997, 18 (4): 310~312
Cui D X, Yan X J, Fan Q Y, *et al.* J Fourth Milit Med Univ, 1997, 18 (4): 310~312
- 4 Shiao Y H, Palli D, Buzard G S, *et al.* Implications of p53 mutation spectrum for cancer etiology in gastric cancers of various histologic types from a high risk area of central Italy. Carcinogenesis, 1998, 19 (12): 2145~2149
- 5 Howe J R, Mitros F A, Summers R W. The risk of gastrointestinal carcinoma in familial juvenile polyposis. Ann Surg Oncol, 1998, 5 (8): 751~756
- 6 闫小君. 胃癌早期诊断及预警系统的建立. 世界华人消化杂志, 1999, 7 (2): 96~97
Yan X J. World Chinese Journal of Digestology, 1999, 7 (2): 96~97

Studies on Differentially Expressed Genes of Gastric Cancer by mRNA Differential Display. CUI Da-Xiang, YAN Xiao-Jun, WANG Feng, ZHAO Jir-Rong, SU Cheng-Zhi (*Institute of Genetic Diagnosis of the Fourth Military University, Xi'an 710033, China*).

Abstract In order to establish warning system of gastric cancer, using cell line GC7901 and GES-1 as targets, 8 cDNAs of differentially expressed genes between them were isolated by mRNA differential display, and then respectively named as GCYS-1 to GCYS-7, GCYS-20, and then were cloned into pGEM-T vector. These cDNA fragments were up-regulated in GC7901 and down-regulated in GES-1 as shown by Northern blot. DNA sequencing demonstrated that all of them were novel. These sequences have been assigned the database accession numbers in GenBank as below: AF054162, AF054163, AF054164, AF054165, AF054166, AF054167, AF054168, AF219140.

Key words gastric cancer, cell line, mRNA differential display, gene cloning, sequencing of DNA

p53 蛋白质 Gly249 和 Ser249 替换型三维结构的分子动力学研究

张 彦

昆明医学院生物学教研室, 昆明 650031
云南大学现代生物学中心, 昆明 650091

石秀凡 刘次全

中国科学院昆明动物研究所, 昆明 650223
云南大学现代生物学中心, 昆明 650091

摘要 利用 p53 蛋白质核心区晶体结构作分子动力学发现, 除了生化方面的稳定性之外, 该区还具有分子力学上的高度稳定性. 在此基础上作的 R249 残基替换分子动力学研究显示, p53 蛋白质核心区 249 位点精氨酸被其他残基替换后能引起 p53 蛋白质核心区 L2、L3 结构域间的密切联系趋于松散, 正常的空间构象发生改变并使整个核心区结构稳定性受到破坏. 这一研究从三维结构变化上, 直观地解释了 R249 残基替换造成的 p53 蛋白质免疫和生化特性改变的结构机制.

关键词 p53 蛋白质, 分子动力学, R249 残基替换

学科分类号 Q612

p53 蛋白质核心区 (core domain) 的结构由两个四股和五股反平行 β 片形成的一个三明治样的片层骨架结构, 一个环-片层-螺旋结构域 (loop-sheet-helix motif, LSH) 和两个大的环状结构

(L2、L3) 组成. 其立体构象主要是由两个反平行的 β 片层构成的基本框架支撑着由非邻接环和 α 螺

Tel: (0871) 5338827, E-mail: yanzhang@yhu.edu.cn

收稿日期: 1999-06-30, 修回日期: 1999-11-11

旋 (non-contiguous loops and helices) 构成的一个 DNA 临界面结构, 通过 L3 和 LSH 部分与 DNA 分子作特异性结合并发挥多种功能^[1]. 在人类各种肿瘤中发现的 p53 蛋白质热点突变的残基全部都集中在这个面上, 不发生突变或发生突变频率很低的残基一般来说都位于远离这个与 DNA 的接触部位^[2].

根据目前人们认识的 p53 蛋白质三维结构, 可以把分子生物学研究长期积累的, 大量而繁杂的 p53 突变按其所处的不同空间位置和结构或生物效应而分为三类. 第一类突变影响着 p53 蛋白质与 DNA 结合面上的残基 (诸如 Arg248 和 Arg273) 从而破坏 p53 蛋白质与 DNA 间的接触点. 第二类突变影响着在维持 p53 蛋白质与 DNA 结合面的正确方位和构象上起着关键作用的残基, 诸如 Arg175 和 Arg249, 他们起着 p53 蛋白质核心区的反平行 β 片层基本支架和蛋白质的 DNA 结合面之间连接的关键作用, 这类突变可能破坏 p53 蛋白质三维结构上的柔韧性和稳定性. 第三类突变是那些位于 p53 核心区的反平行 β 片层基本支架中, 可能造成支架和整个 DNA 结合区四聚体结构破坏的突变^[3]. 这种参照三维结构研究的突变性质分类, 与一些体外和活体的分子生物学研究所提供的证据相吻合, 而且, 这些实验还表明, p53 蛋白质突变的生物学特性还具有细胞类型的特异性^[4,5].

由于 p53 基因突变而使 Arg249 被其他氨基酸替换的现象, 见于多种肿瘤的 p53 突变报道, 其突变率占 p53 蛋白质突变检出率的 5.6%, 属于 p53 蛋白质 6 大突变热点之一^[6]. 大量临床和分子生物学研究调查表明, R249 位点的错义突变与黄曲霉素 B1 的食物污染和乙型肝炎病毒感染有着最直接的关联^[7,8]. 因而 Arg249 替换最常见于原发性肝癌, 其他还有肺癌、胰腺癌、乳腺癌、慢性髓样细胞白血病等. 常见的替换氨基酸就是丝氨酸, 其他还有甘氨酸、甲硫氨酸等^[7,9].

尽管实验生物学对 p53 突变作了大量研究和统计, 对突变后的蛋白质结构变化也作了许多间接推测, 但是, 这些突变热点的残基替换后, p53 蛋白质在三维结构上究竟会发生怎样的变化尚没有直接的研究报道. 因此, 我们利用从 PDB 数据库中调取的 p53 蛋白质核心区三维结构资料, 用 Insight II 软件在 SGFINDIGO² 工作站上, 对 Gly249 和 Ser249 两种替换型, 作分子动力学研究, 与同等条件下正常 p53 蛋白质核心区三维结构对照, 探索

该突变热点的氨基酸替换后对 p53 蛋白质核心区三维构象变化的影响, 从三维结构的角度的 p53 突变的生物学效应研究作一点有益的探索.

1 材料和方法

将由 PDB 库中调取的 p53 核心区三维结构数据 (1Trs) 在 SGFINDIGO² 工作站的 Insight II 软件中整理后 (1Trs 包含三个独立的 p53 核心区三维结构 A、B、C 及一段含有 21 个碱基对的 DNA 双螺旋三维结构), 取得一个完整的 Ser94 ~ Asn288 p53 核心区蛋白质晶体结构作为分子动力学的初始模型. 在此结构的基础上, 利用 Insight II/Discover 软件, 经过加氢、初步的能量优化及 12 ps 的分子动力学过程 (Amber 力场, NBCutoff= 5.00 nm, $T=300.00$ K, 记录 2000 步/次), 得到正常的 p53 蛋白质核心区分子动力学对照模型.

利用 p53 蛋白质核心区晶体结构, 在 SGFINDIGO² 工作站的 Insight II/BIOPOLIMER 程序中建立 p53 蛋白质 Gly249 和 Ser249 残基替换型的三维结构模型, 以此为初始构象, 在同样的力场环境条件下, 分别对 249 残基替换模型进行 12 ps 的分子动力学过程, 然后将其分子动力学过程中的三维构象变化与正常模型对照, 分析和讨论 249 位点精氨酸常见突变氨基酸替换后, p53 核心区整体构象和局部结构方面发生的不同改变, 以及 Arg249 残基替换后形成的异常生物学效应的三维构象基础.

2 结果和讨论

2.1 正常 p53 蛋白质核心区的动力学模型

从 p53 蛋白质晶体结构资料看, 位于 L3 结构域的 Arg249 邻接于与 DNA 分子小沟相连的 Arg248, 正常情况下的 Arg249 残基为 L2、L3 和组成 β 三明治骨架结构的第 3 股 β 片层 C 端的蛋白质结构包围. 该精氨酸残基侧链的 γ 碳原子以 van der Waals 键与 L2 上 His162 残基侧链相连, 其胍基部与第 3 股 β 片层上的 Tyr163 残基侧链紧密相连, 同时, 胍基部分别与 L3 的 Met246 碳骨架和 L3 的另外一个突变热点 Gly245 残基碳骨架形成氢键. 此外, Arg249 还与 L2 的 Glu171 形成盐桥. 这样, Arg249 以其复杂的与周边残基的相互作用, 在维系 p53 蛋白质核心区空间构象稳定性方面起着重要作用^[1].

在经历了 12 ps 的分子动力学过程之后, 从 L2 和 L3 局部残基之间的联系上看, 形成氢键的部位有一些变化: Arg249 胍基部与 L2 的 Glu171 以两个氢键相连并与 Asn247 以氢键相连. 此外, L3 结构域的 Gly245、Pro250、Arg213 (胍基部 2hb)、Met246、Asn235、Met237 等残基分别与 L2 结构域的 Arg174、Lys164、Thr170、Tyr163、Arg196、Leu194 和 His179 残基形成广泛的氢键联系. 位于 L2 结构域的 Arg175 胍基部以四个氢键分别与

Asp184 (3 个) 和 Arg196 (1 个) 相连; 同时, Arg175 还与 Gln192 和 Gln180 分别形成一个氢键. 但是, 整个 p53 蛋白质核心区的基本构象几乎没有发生改变, L2 和 L3 之间始终维持着密切而错杂的相互联系, 使 p53 蛋白质核心区的基本构象保持稳定. 从分子生物学资料和分子动力学研究过程来看, R249 和 L2 结构域的 R175 在维持 p53 蛋白质核心区结构稳定性和方位正确性上确实起着关键作用 (图 1a, 图 2).

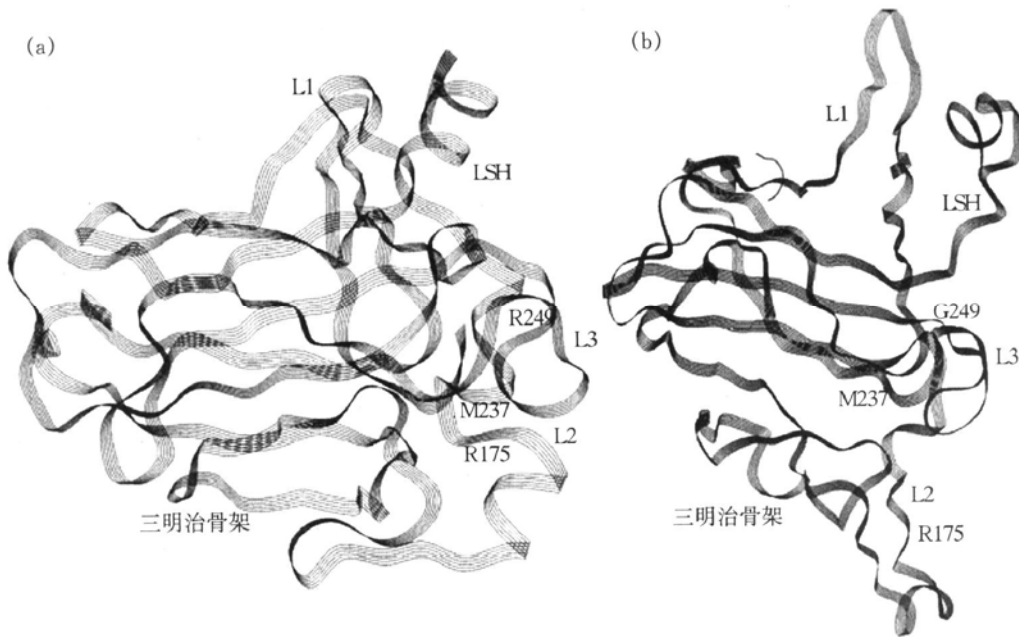


图 1 p53 蛋白质核心区分子动力学三维结构主链模型
(a) 正常模型; (b) G249 残基替换型模型.

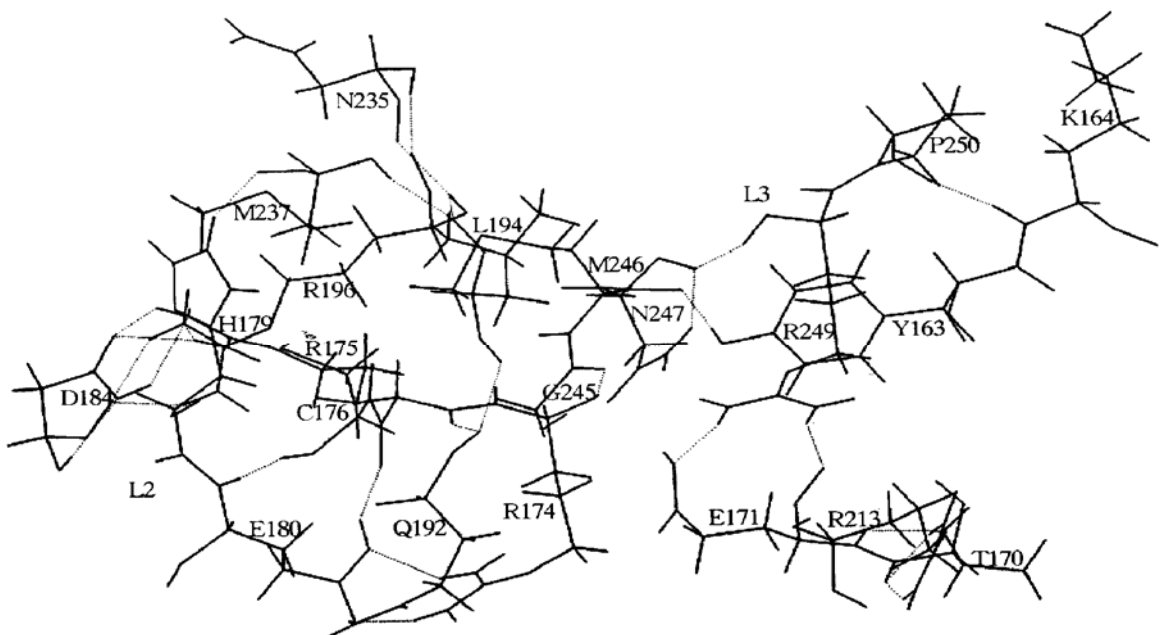


图 2 p53 蛋白质核心区动力学模型 175 和 249 区域氢键关系

2.2 Gly249 和 Ser249 替换型的分子动力学研究

在晶体三维结构基础上建立的 Gly249 替换型经历 1 000 步能量优化 (Amber 力场, NBCutoff=5.00 nm) 以后, 249 位点周围残基的关系因 Arg 被 Gly 替换而有所改变: 由于 Gly 残基只有 H α , 而 Arg 残基则有能提供质子的胍基, 因而 249 位点的 Arg 被 Gly 替换后, 失去了原先与 L2 结构域 Ile162、Tyr163、Glu171 残基的氢键联系, 仅有 Gly249 的骨架部分与 Met246 形成氢键. 这时 L2 和 L3 结构域间的氢键联系主要存在于 Arg175 胍基部与 Met237 (2hb)、Leu194 与 Met237、His179 与 Cys238/Asn239 以及 Tyr163 与 Gly245 等残基或其主链之间.

尽管 Gly249 替换型在能量优化过程中仍然维持了 p53 蛋白质核心区正常状态下的基本构象, 但经历 4 ps 分子动力学过程以后 249 位点残基替换造成的影响便显现出来: L2 和 L3 间的关系开始松散, 两者间的氢键联系减少, 但在 Arg196 与

Asn235, Leu194 与 Met237, Tyr163 与 Asn247, Thr170 与 Arg213 以及 Glu171 与 Met246 等残基间仍有氢键相连. 这时的 Gly249 与其他残基间没有氢键联系, 而 L2 的 Arg175 仅与其结构域内的残基形成氢键. 6 ps 时, Gly249 与 L3 结构域的 Asn247 和 Ile251 形成氢键, 受其影响, Arg175 与其他残基广泛的氢键联系也仅限于 L2 结构域内: Arg174、His179、Ser183、His193 等. L2 和 L3 间仅有 Arg196 与 Asn235 形成氢键. L3 结构域中具有标记意义的 Met237 这时也明显脱离了与其空间关系密切的 Arg175 和 Leu194. 8 ps 时, Gly249 和 Arg175 分别仅在 L3 和 L2 中维持氢键, 两个结构域间的关系进一步松散. 12 ps 步以后, L2 和 L3 间没有氢键联系. Met237 与 Arg175 间, 以及原先与 249 位点关系密切的 Ile162、Tyr163 和 Glu171 也都进一步拉开了距离. 这种局部变化使得 p53 蛋白质核心区 DNA 接触面的整体三维构象发生了明显改变 (图 1b, 图 3).

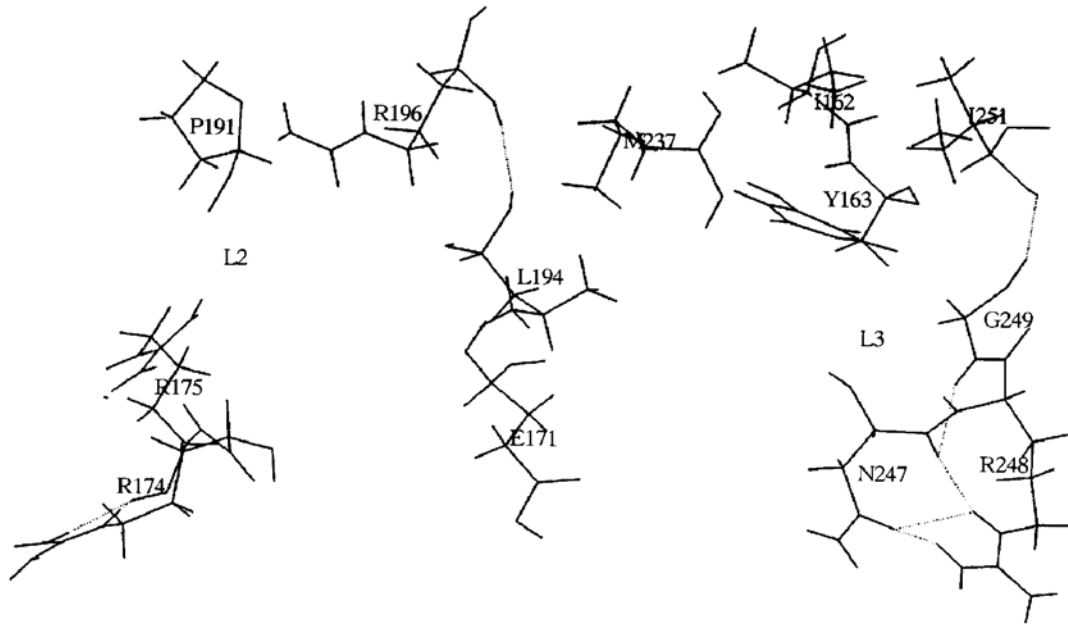


图 3 p53 蛋白质核心区 G249 残基替换型局部氢键关系

Ser249 替换型的分子动力学造成的 p53 核心区三维构象变化过程与 Gly249 替换型的变化大致相似. 与 249 位点原先的残基 Arg 相比, 替换残基 Ser 的侧链仅有一个碳原子和羟基, 这种替换使 249 位点丧失了原先与 L2 结构域残基的广泛联系. Ser249 替换型能量优化 1 000 步后的三维结构细节显示, Ser249 与 L2 结构域的任何残基都没有氢键联系. 这时在 L2 和 L3 间维持氢键联系的残基主

要有: Arg175/Gln192/Leu194 与 Met237, Lys164 与 Pro250, Arg196 与 Asn235 (2H-b), 以及 Cys176/His179 与 Cys238 等.

经历 12ps 分子动力学过程以后, L2、L3 结构域之间的氢键联系消失, 原先与 249 位点关系密切的 Ile162、Tyr163 和 Glu171 等残基都远离 L3 结构域. 同时, 由于 Arg249 被 Ser 替换的影响, 也使 Arg175 维系 L2、L3 空间联系的作用遭到破坏,

并使 Arg175 远离 L3 结构域, 最显著的标记便是 Arg175 与 Met237 拉开的距离. 由分子动力学的模拟而知, 249 和 175 位点的 Arg 被其他残基替换都能引起 L2 和 L3 空间联系方面的改变, 但仅仅 Arg175 残基被替换后, Arg249 仍然在 L3 和 L2 的局部联系方面起着重要作用 (另有专文讨论). 因此, 在维系 L2、L3 整体空间构象关系方面, Arg247 比 Arg175 起着更为重要的作用.

免疫学试验发现, Arg249 的突变使 p53 蛋白质被抗体 Pab240 识别而不为抗体 Pab1620 结合, 而野生型 p53 蛋白质被 Pab1620 识别, 不被 Pab240 识别^[10, 11]. 因而推测, Arg249 残基替换引起 p53 核心区的蛋白质构象发生改变, 使正常的抗原决定簇破坏, 而原先深藏于结构内部的部分暴露, 形成新的抗原决定簇, 造成与不同抗体的亲和性改变. 249 位点的 Ser 和 Gly 残基替换分子动力学试验结果与过去的实验结论是一致的, 而且直观地显示了残基替换引起结构变化的过程. 两种替换型都造成了 L2、L3 和 LSH 结构域间正常的改变, 使原先核心区紧密的空间结构关系由于这一个关键氨基酸的替换而遭到破坏, 形成了比较松散的结构, 从形态结构方面解释了野生型 p53 蛋白质能抗蛋白酶消化, 而 Arg249 突变型极易被蛋白酶彻底分解的原因.

参 考 文 献

- 1 Cho Y, Gorina S, Jeffrey P D, *et al.* Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*, 1994, **265** (5170): 346~ 355
- 2 Soussi T, May P S. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *J Mol Biol*, 1996, **260** (5): 623 ~ 637
- 3 Hainaut P, Soussi T, Shomer B, *et al.* Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospect. *Nucleic Acid Res*, 1997, **25** (1): 151~ 157
- 4 Ory K, Legros Y, Auguin C, *et al.* Analysis of the most representative tumour-derived p53 mutants reveals that changes in protein conformation are not correlated with loss of transactivation or inhibition of cell proliferation. *EMBO J*, 1994, **13** (15): 3496~ 3504
- 5 Forrester K, Lupold S E, Ott V L, *et al.* Effects of p53 mutants on wild-type p53-mediated transactivation are cell type dependent. *Oncogene*, 1995, **10** (11): 2103~ 2111

- 6 Hollstein M, Shomer B, Greenblatt M, *et al.* Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Res*, 1996, **24** (1): 141~ 146
- 7 Hollstein M C, Wild C P, Bleicher F, *et al.* p53 mutations and aflatoxin B1 exposure in hepatocellular carcinoma patients from Thailand. *Int J Cancer*, 1993, **53** (1): 51~ 55
- 8 Hsu I C, Tokiwa T, Bennett W, *et al.* p53 gene mutation and integrated hepatitis B viral DNA sequences in human liver cancer cell lines. *Carcinogenesis*, 1993, **14** (5): 987~ 992
- 9 Volkmann M, Hofmann W J, Muller M, *et al.* p53 overexpression is frequent in European hepatocellular carcinoma and largely independent of the codon 249 hot spot mutation. *Oncogene*, 1994, **9** (1): 195~ 204
- 10 Bartek J, Iggo R, Gannon J, *et al.* Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines. *Oncogene*, 1990, **5** (6): 893~ 899
- 11 Gannon J V, Greaves R, Iggo R, *et al.* Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J*, 1990, **9** (5): 1595 ~ 1602

Molecular Dynamics Research of G249 and S249 Substitutions of p53 Protein. ZHANG Yan (*Department of Biology, Kunming Medical College, Kunming 650031, China*); SHI Xiu-Fan, LIU Ci-Quan (*Kunming Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China*).

Abstract The molecular dynamics research of the core domain of p53 protein crystal structure shows that besides the stability in biochemistry this domain also shows a high stability in molecular mechanics. Based on that work, the residue R249 was substituted with amino acids Gly and Ser respectively, and molecular dynamics researches were performed separately. The results show that these substitutions cause a relax tendency between loop2 and 3 domains, leading to an alteration of the whole conformation of p53 core domain and ruining its stability. The results visually explains the mechanism of p53 changes in immunological and biochemical reactions, which are caused by 249 residue substitutions from 3-D structure variations.

Key words p53 protein, molecular dynamics, 249 residue substitution