



УДК 577.175.322.08

**ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИИ НАТИВНОГО
И ИММОБИЛИЗОВАННОГО СОМАТОТРОПИНА ЧЕЛОВЕКА
С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА***Варейкис Э. Й., Лобачев В. М., Юодка Б. А.**Вильнюсский государственный университет им. В. Капсукаса*

Исследована конформация соматотропина (гормона роста) человека в мономерном и агрегированном состоянии, а также препаратов, полученных присоединением белка к растворимой полисахаридной матрице. Установлено, что при иммобилизации содержание α -спирали уменьшается на 10% при одновременном изменении конформационной подвижности боковых групп ароматических аминокислот. В то же время иммобилизация не приводит к изменению биологической активности, что позволяет предположить, что отмеченные конформационные изменения не затрагивают функционально важных участков пространственной структуры гормона.

Соматотропин (гормон роста) человека представляет собой белок, состоящий из 191 аминокислотного остатка [1]. Нативный соматотропин, выделяемый из гипофиза и циркулирующий в плазме крови, существует как в виде мономера, обладающего высокой биологической активностью, так и в виде агрегатов, биологическая роль которых пока не выяснена. Агрегаты состоят из ковалентно и нековалентно связанных друг с другом мономеров соматотропина [2]. Мономер соматотропина содержит две внутримолекулярные дисульфидные связи: Cys⁵³-Cys¹⁶⁵ и Cys¹⁸²-Cys¹⁸⁹ [1]. В агрегированных формах соматотропина для нековалентно связанных молекул белка положение дисульфидных связей сохраняется неизменным, в то время как в ковалентно связанных молекулах появляются межмолекулярные дисульфидные связи [3, 4]. Пространственное строение соматотропина не изучено. По данным спектроскопии кругового дихроизма (КД), мономерная форма белка содержит ~50% α -спирали при значительном содержании β -структуры [6].

Соматотропин является сравнительно гидрофобным, труднорастворимым белком, причем в плазме крови гормон подвергается быстрой инактивации под действием протеиназ. Ранее с целью пролонгации циркуляции гормона в крови мономер и агрегат соматотропина были присоединены к растворимой полисахаридной матрице, не уменьшающей активности гормона, но повышающей его растворимость и устойчивость к протеиназам плазмы крови [5].

Целью настоящей работы является изучение конформации мономера и агрегата соматотропина в нативном и иммобилизованном виде методом спектроскопии КД, а также определение влияния изменений конформации при иммобилизации гормона на его биологическую активность.

По данным спектров КД в пептидной области (200–250 нм), содержащие α -спирали в нативном мономере и агрегате соматотропина практически не различаются и составляет ~50% (рис. 1, 2). Полученный результат соответствует теоретическим расчетам процентного содержания α -спирали (45–51%), проведенным разными методами [7]. Уменьшение количества α -спиральной конформации белка и в мономере, и в агрегате при их иммобилизации свидетельствует, по-видимому, о некоторых структурных изменениях гормона при присоединении к полимерной матрице.

Анализ спектров КД соматотропина в ароматической области (250–310 нм) (не приведены) затруднен вследствие содержания в молекуле белка большого числа ароматических хромофоров (8 остатков тирозина, 13 — фенилаланина, 1 — триптофана). Исследования модельных соедине-

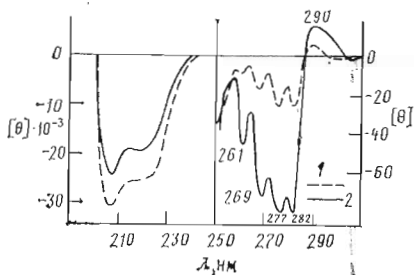


Рис. 1. Спектры КД водных растворов (рН 8,4) нативного (1) и иммобилизованного (2) мономера соматотропина

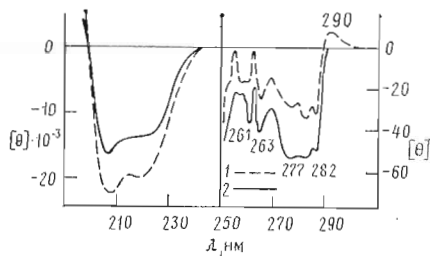


Рис. 2. Спектры КД водных растворов (рН 8,4) нативного (1) и иммобилизованного (2) агрегата соматотропина

ний [8] позволяет предположить, что максимум ~ 290 нм обусловлен остатком триптофана (Trp^{76}), а полосы ~ 277 и ~ 282 нм соответствуют остаткам тирозина. Максимумы ~ 261 и ~ 263 нм в свою очередь отвечают остаткам фенилаланина. В случае агрегата интенсивность пиков больше, чем в мономере. Это может быть следствием уменьшения конформационной лабильности боковых радикалов аминокислот при образовании межмолекулярных дисульфидных связей. Как для мономера, так и для агрегата иммобилизация ведет к сильному возрастанию дихроичной активности, что тоже может быть отнесено за счет уменьшения конформационной лабильности молекулы.

Иммобилизованные образцы соматотропина сохраняют в значительной мере свою ростстимулирующую активность по тибиа-тесту (результаты не представлены), хотя наши данные о пространственной структуре этих веществ указывают на уменьшение процентного содержания α -спирали и конформационной лабильности молекул. По всей видимости, сохранение строго определенной пространственной структуры не является необходимым фактором для проявления биологической активности гормона роста человека.

Экспериментальная часть

Соматотропин человека получен по методике Рабена из ацетонового порошка гипофизов [9] и разделен на мономерную и агрегированную фракцию гель-фильтрацией на сефадексе G-100. Конечные продукты содержат $\sim 90\%$ мономера и $\sim 95\%$ агрегата соответственно. Агрегат с межмолекулярными дисульфидными связями получен путем разделения ковалентно и нековалентно связанных агрегатов [10]. Иммобилизованные формы соматотропина получены путем ковалентного присоединения олигосахарида по аминокруппам белка [5].

Спектры КД образцов получены при комнатной температуре в буфере $0,01 \text{ M NH}_4\text{HCO}_3$ (рН 8,4) на дихрографе Mark-III (Jobin-Yvon, Франция). Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при $\lambda 277$ нм ($\epsilon_{277}^{0,1\%} = 0,931$). Спектры КД представлены в виде средней эллиптичности на остаток в град·см²·дмоль⁻¹. Средняя эллиптичность рассчитана по формуле

$$[\theta] = \frac{1000 \cdot 33 \cdot S \cdot L}{l \cdot C} \cdot \frac{M}{100},$$

где $M=115$, L — величина эффекта (мм), C — концентрация раствора (мг/мл), S — шкала чувствительности прибора, l — длина оптического пути (дм).

Количество α -спирали в белке определяли по формуле [0]

$$\% \alpha = \frac{[\theta]_{222} + 4800}{45400},$$

где $[\theta]_{222}$ — средняя эллиптичность на остаток при $\lambda 222$ нм.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Li Chon Hao* // Hormonal proteins and peptides/Ed. Choh Hao Li. N. Y., San Francisco, London: Acad. Press, 1975. V. 3. P. 1-40.
2. *Лашас Л., Лашене Д.* Соматотропин человека. Вильнюс: Моклас, 1981.
3. *Soman V., Goodman A. D., Marsh P.* // J. Clin. Endocrinol. and Metabol. 1977. V. 44. № 3. P. 569-581.
4. *Варейкис Э. Й., Лашас Л. В., Панков Ю. А.* // Тезисы докл. VI Всесоюзн. симп. Химия белков и пептидов. Рига, 1983. С. 144-145.
5. *Варейкис Э. Й., Мацулявичюс В. А., Мацюлявичюс Й. Й., Лашас Л. В., Таратина Т. М., Москвичев Б. В., Панков Ю. А.* Способ получения соматотропина человека. А. с. № 1341766 (СССР) // Б. И. 1987. № 36.
6. *Bewley T. A., Yang Jen Tsi* // Hormonal proteins and peptides/Ed. Choh Hao Li. N. Y., London, Toronto, Sydney, San Francisco: Acad. Press, 1980. V. 9. P. 175-238.
7. *Holladay L. A., Hammonds R. G., Puett D.* // Biochemistry. 1974. V. 17. № 3. P. 550-556.
8. *Strickland E. H.* // CRC Crit. Rev. Biochem. 1974. V. 2. P. 113-175.
9. *Raben M. S.* // Recent Progr. Horm. Res. 1959. V. 15. P. 71-79.
10. *Лашас Л. В., Варейкис Э. Й., Мацулявичюс В. А.* Способ выделения мономера соматотропина человека. А. с. № 1103395 (СССР) // Б. И. 1984. № 26.

Поступила в редакцию
16.V.1988

INVESTIGATION OF THE CONFORMATION OF NATIVE AND IMMOBILIZED HUMAN GROWTH HORMONE USING CIRCULAR DICHROISM METHOD

VAREIKIS E. J., LOBACHEV V. M., JUODKA B. A.

V. Kapsukas State University, Vilnius

The conformation of human growth hormone (hGH) as monomer and aggregate as well as of those immobilized in the soluble polysaccharide matrix was investigated. The immobilization resulted in ten per cent decrease of the amount of α -helix and in the conformational mobility change of aromatic amino acid side groups. It did not, however, influenced the biological activity of the hormone, thus suggesting that the above conformational variations did not affect functionally important portions of the molecule.