



УДК 577.112.088.3:577.175.322.088

## ИЗУЧЕНИЕ МЕТАЛЛСВЯЗЫВАЮЩЕГО УЧАСТКА В ГОРМОНЕ РОСТА ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ МЕТАЛЛ-ХЕЛАТНОГО АФФИННОГО ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

© 2001 г. М. В. Анисимова, А. А. Шульга\*, И. В. Левичкин\*, М. П. Кирпичников\*,  
К. М. Поляков\*\*, К. Г. Скрябин, М. А. Виджаялакшми\*\*\*, В. П. Варламов#

Центр "Биоинженерия" РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия Октября, 711;

\* Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва;

\*\* Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН, Москва;

\*\*\* Технологический университет, Компьень, Франция

Поступила в редакцию 26.07.2000 г. Принята к печати 11.09.2000 г.

При помощи метода металл-хелатного аффинного гель-электрофореза изучено связывание рекомбинантного гормона роста человека и двух его мутантных вариантов "14–33" и "14–95" с иммобилизованными ионами цинка. В мутантных гормонах, составленных из участков полипептидных цепей гормона роста человека и свиньи, отсутствовал остаток His18, который, вероятно, критичен для связывания интактного гормона с ионами переходных металлов. Введение мутаций не повлияло на сродство гормона роста человека к иммобилизованным ионам цинка, а структурный анализ позволил предположить, что молекула гормона роста человека содержит два потенциальных сайта сорбции на IDA-Zn(II), образованных аминокислотными остатками (His21, Asp171 и Glu174) и/или остатками (His18 и Glu174).

*Ключевые слова:* гормон роста человека; мутагенез; металл-хелатный аффинный гель-электрофорез; ионы цинка.

### ВВЕДЕНИЕ

Гормон роста (соматотропин, GH) имеет полипептидную природу и участвует в регуляции многих сторон жизнедеятельности организма, проявляя ростстимулирующую, инсулиноподобную и диабетогенную активности [1]. Биологическая активность GH обусловлена его взаимодействием со специфическими клеточными рецепторами. hGH в отличие от GH животных обладает способностью связываться с рецептором пролактина и тем самым проявлять лактогенную активность. Как было показано Каннингемом и др. [2], сродство hGH к рецептору пролактина значительно (более чем в 10000 раз) увеличивается в присутствии ионов цинка. В структуре комплекса hGH и внеклеточного домена рецептора пролактина человека, определенной с разрешением 2.9 Å [3], участок связывания цинка формируется двумя аминокислотными остатками в рецепторе (Asp<sub>R</sub>187 и His188) и двумя в гормоне (His18 и Glu174) (рис. 1).

His21 (hGH) не принимает непосредственного участия в связывании Zn(II), но он, вероятно, поддерживает правильную ориентацию боковой цепи Glu174 (hGH).

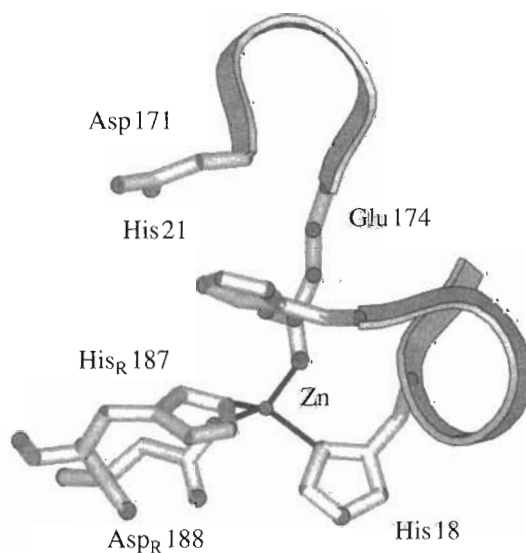


Рис. 1. Участок координирования иона цинка в интерфейсе комплекса hGH–рецептор пролактина. Остатки рецептора обозначены индексом R.

Сокращения: МХАХ – металл-хелатная аффинная хроматография; МХАГЭ – металл-хелатный аффинный гель-электрофорез; IDA – иминодиуксусная кислота; MPEG – метоксиполиэтиленгликоль 5000; GH – гормон роста; hGH – гормон роста человека; pGH – гормон роста свиньи.

# Автор для переписки (тел.: (095) 135-65-56; e-mail: varlamov@biengi.ac.ru).

Координация с ионами металлов осуществляется за счет наличия на поверхности белков свободных групп – доноров электронов. Для количественной оценки данного типа взаимодействий был предложен метод металл-хелатного аффинного гель-электрофореза (МХАГЭ) [4, 5], позволяющий определять константы диссоциации комплексов белок–лиганд. В данной работе изучено связывание hGH и двух его гибридных аналогов “14–33” и “14–95” с иммобилизованными ионами цинка при помощи метода МХАГЭ. Интерес к этим гибридным белкам объясняется тем, что в их полипептидной цепи отсутствует один из остатков (His18), который, как полагают, особенно важен для взаимодействия с ионами переходных металлов. Гибридные белки были получены путем замещения аминокислотных последовательностей hGH различной длины гомологичными последовательностями рGH [6]. В обозначениях гибридов числа соответствуют номерам остатков, ограничивающих последовательность рGH; нумерация остатков дана по последовательности природного hGH. Гибридные белки отличаются от hGH следующими заменами: “14–33” = hGH (M14V, H18Q, R19H, F25A, Q29K, E33R); “14–95” = hGH (M14V, H18Q, R19H, F25A, Q29K, E33R, K38E, E39G, K41R, ΔF44, P48A, T50A, S51A, L52F, S57T, T60A, S62T, N63G, R64K, E65D, T67A, K70R, N72D, L73V, I78F, E88G, R94S, S95R).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как было показано ранее, метод металл-хелатного аффинного гель-электрофореза может быть с успехом применен для изучения металл-связывающих участков в нативных и модифицированных белках [7, 8]. Связывание белков с иммобилизованными ионами переходных металлов осуществляется за счет наличия на их поверхности свободных электронодонорных групп. В условиях МХАХ (нейтральные значения рН, высокие концентрации соли) в качестве потенциальных лигандов в белке могут выступать имидазольная группа гистидина ( $pK \sim 6.7$ ), тиольная группа цистеина ( $pK \sim 8.5$ ) и индольная группа триптофана ( $pK \sim 9.41$ ). В определенных условиях в подобных взаимодействиях могут принимать участие С-концевые аминокислоты ( $pK \sim 7.7$ ), а также остатки аспарагиновой и глутаминовой кислот ( $pK \sim 3.9$ ). По прочности образуемых комплексов эти аминокислоты располагаются в ряду [9]: His, Cys > Asp, Glu  $\gg$  другие аминокислоты.

кислоты располагаются в ряду [9]: His, Cys > Asp, Glu  $\gg$  другие аминокислоты.

Работы Сулковского [10, 11] с использованием модельных белков позволили установить основные закономерности сорбции белков ионами переходных металлов, хелатированными на сорбенте группировками иминодиуксусной кислоты. Было показано, что наличие одного остатка гистидина на поверхности белковой молекулы является необходимым и достаточным условием для сорбции последнего на хелате IDA-Cu(II). Сорбция на IDA-Zn(II) требует наличия двух близко расположенных остатков гистидина, которые могут быть сближены как в первичной, так и в третичной структуре. Окружение остатков гистидина является дополнительным фактором, влияющим на координирование белка хелатированными ионами металлов. Вследствие того, что величина  $pK$  гистидина зависит в значительной степени от заряда соседних аминокислотных остатков, некоторые другие остатки (Tyr, Arg, Phe, Lys) могут усиливать первичную сорбцию белков, обусловленную благоприятным расположением и доступностью остатков гистидина [12].

Исследования металлсвязывающих участков в молекуле hGH методами молекулярного моделирования и МХАХ показали, что сорбция на иммобилизованных ионах меди происходит с участием His18, His21 и His151 [9]. По силе связывания хелатированных ионов эти остатки располагаются в ряду: His18 > His151  $\gg$  His21. Таким образом, His18 наиболее доступен для участия в подобных взаимодействиях.

В обоих мутантных вариантах hGH (“14–33”, “14–95”) His21 и His151 остались на прежних местах, а His18 в результате двойной мутации (H18Q, R19H) сместился в положение 19 полипептидной цепи, оказавшись таким образом на гидрофобной стороне первой спирали, что сделало невозможным его участие в координировании ионов металла. Вследствие этого, гибридные гормоны являются привлекательными объектами для изучения роли, которую играет остаток His18 в связывании ионов металлов.

На рис. 2 представлена миграция белков в системе полиакриламид/МРЕG-IDA-Zn(II). Очевидно, что скорость миграции всех трех белков замедляется по мере увеличения концентрации аффинного лиганда (0–10 мМ). Серии экспериментов по МХАГЭ показали, что оба гибридных варианта сорбировались на IDA-Zn(II). Рассчитанные константы диссоциации комплексов лиганд–белок представлены в таблице. Значения констант диссоциации для гибридных гормонов были меньше, чем в случае hGH, что указывает на более высокую аффинность. Таким образом, смещение гистидина из 18 в 19 положение в обоих

Константы диссоциации комплексов белок–IDA-Zn(II)

Белок	$K_d$ , мМ
hGH	$20.89 \pm 1.57$
Гибрид “14–33”	$6.35 \pm 0.44$
Гибрид “14–95”	$10.32 \pm 0.43$



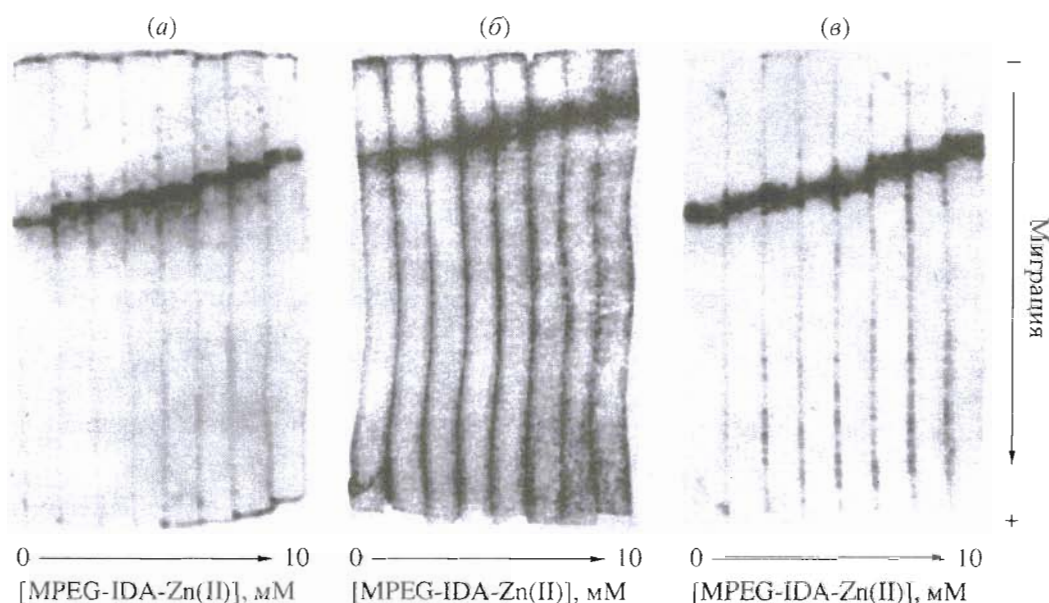


Рис. 2. Металл-хелатный аффинный гель-электрофорез hGH (а), гибрида "14-33" (б), гибрида "14-95" (в) в системе полиакриламид/MPEG-IDA-Zn(II). Концентрации лиганда: 0, 0,5, 1, 2, 3, 5, 7 и 10 мМ. Время: 6 ч.

вариантах "14-33" и "14-95" не вызвало потерю сродства к иммобилизованным ионам Zn(II).

Используя данные рентгеноструктурного анализа hGH (PDB Id. 1HGU) и комплекса hGH-рецептор пролактина (PDB Id. 1BP3), а также модельные структуры мутантных гормонов, мы провели поиск потенциальных мест связывания хелатированных ионов Zn(II) в молекулах гормонов с помощью программы FRODO [13]. Было проанализировано взаимное расположение и доступность остатков гистидина, а также их окружение. Расстояние между парами His151-His18, His151-His19 и His151-His21 в кристалле составляет около 20 Å и, следовательно, эти пары не могут служить потенциальными лигандами для координирования IDA-Zn(II). Пары остатков His19-His21 и His18-His21, хотя и располагаются в непосредственной близости друг от друга, не могут связывать атом цинка в силу стерических причин: остатки His19 и His21 находятся на противоположных сторонах первой  $\alpha$ -спирали, а боковые цепи остатков His18 и His21 имеют ограниченную подвижность. В ближайшем окружении His19 и His151 не выявлено потенциальных лигандов для координирования Zn(II).

Как было отмечено выше, His18 и Glu174 hGH вовлечены в построение кластера связывания Zn(II) в комплексе с рецептором пролактина (рис. 1). Компьютерное моделирование показывает, что эти же остатки могут формировать потенциальный центр связывания IDA-Zn(II) (рис. 3). Возможно, такой центр связывания в hGH действительно существует. Однако в мутантных гормонах, которые сохраняют сродство к IDA-Zn(II),

остаток His18 отсутствует. Это означает, что должен существовать альтернативный механизм связывания гормонов (как мутантных, так и природного) с хелатированными ионами цинка. Нам удалось обнаружить возможное место связывания IDA-Zn(II) в районе остатка His21 (рис. 4). Лигандами для координирования Zn(II) в этом районе выступают остатки His21, Glu174 и Asp171. В комплексе с IDA-Zn(II) остаток His21 сохраняет свою конфигурацию, боковая цепь Asp171 поворачива-

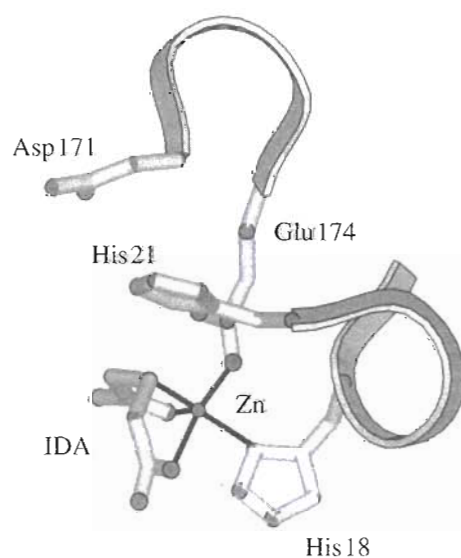


Рис. 3. Комплекс IDA-Zn(II)-hGH. В координировании цинка участвуют His18 и Glu174.

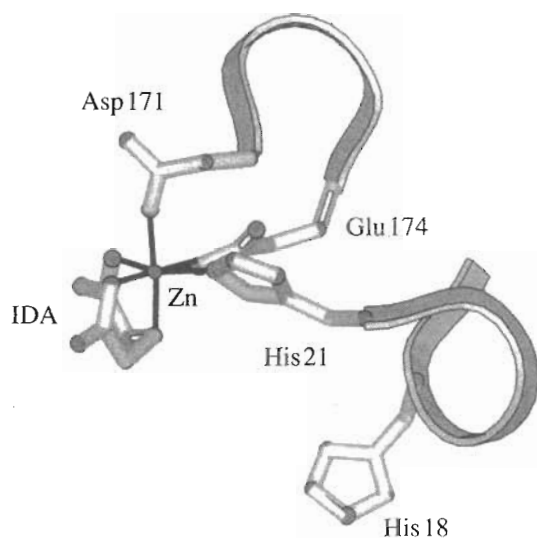


Рис. 4. Комплекс IDA-Zn(II)-hGH. В координировании цинка участвуют His21, Glu174 и Asp171.

ется на  $60^\circ$  относительно связи  $C^\beta-C^\gamma$  и боковая цепь Glu174 смещается в сторону иона цинка (рис. 4). Комплекс имеет форму октаэдра и является, по-видимому, достаточно стабильным. Как природный hGH, так и оба гибрида могут связывать ионы металла в соответствии с этим механизмом.

Таким образом, рекомбинантный hGH и оба гибрида “14–33” и “14–95” проявляют схожую аффинность по отношению к иммобилизованным ионам цинка в условиях металл-хелатного аффинного гель-электрофореза. Структурный анализ показывает, что hGH имеет, возможно, два потенциальных центра связывания IDA-Zn(II), образованных остатками (His21, Glu174 и Asp171) и/или остатками (His18 и Glu174).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Экспрессия генов.** Гены гибридных гормонов были получены при помощи метода рекомбинации гомологов [6]. Экспрессионные векторы были сконструированы путем замены гена 10 бактериофага T7 в плазмиде pGEMEX1 (Promega) генами GH [14]. Нуклеотидная последовательность генов в составе экспрессионных векторов была прочитана по двум цепям ДНК. Гены кодируют белковый продукт, первыми аминокислотами которого являются fMet-Pro, а не Phe-Pro, как в природном hGH. Как было показано в работе [15], fMet, предшествующий Pro, эффективно удаляется бактериальной N-концевой аминопептидазой. Поэтому изучаемые гормоны были лишены первой аминокислоты (Phe1) природного hGH.

**Очистка белков.** Белки выделяли из клеток штамма *E. coli* BL21(DE3), несущего соответству-

ющий экспрессионный вектор. Выращивание бактериальных культур и индукцию IPTG проводили как описано в работе [14]. Собранные клетки разрушали при помощи ультразвукового дезинтегратора. Нуклеиновые кислоты осаждали прибавлением полиэтиленмина до конечной концентрации 0.04%. Белки осветленного лизата последовательно фракционировали на хроматографических колонках, заполненных Q-Sepharose FF и Phenyl Superose HR 10/10 (Pharmacia, Швеция) и затем диализовали. Окончательную очистку GH проводили на колонке Mono Q HR10/10 (Pharmacia, Швеция). Фракции, содержащие GH, объединяли, тщательно диализовали против 10 мкМ EDTA, pH 7.5, и лиофилизовали.

Чистоту и аутентичность препаратов GH анализировали при помощи метода масс-спектрометрии на установке Finnigan MAT SSQ 710 (Finnigan, США), оборудованной простым квадрупольным масс-анализатором и электрораспыляющей приставкой (Analytica of Branford, США). Измеренные молекулярные массы hGH (21977 Да), гибрида “14–33” (21866 Да) и гибрида “14–95” (21485 Да) соответствовали с высокой степенью точности их расчетным массам – 21978, 21869 и 21486. При расчете молекулярных масс учитывали делецию N-концевого Phe1, а также наличие двух дисульфидных связей между остатками Cys53, Cys165 и Cys182, Cys189. Последнее подтверждали путем анализа электрофоретической подвижности белков в денатурирующем ПААГ-электрофорезе в присутствии  $\beta$ -меркаптоэтанола и без него. Чистота препаратов белков по результатам масс-спектрометрии составляла не менее 95%.

**Металл-хелатный аффинный гель-электрофорез (МХАГЭ).** Синтез лиганда MPEG-IDA-Zn(II) и эксперименты по МХАГЭ были осуществлены по ранее описанному методу [5]. Аффинный электрофорез в полиакриламидном геле ( $T = 7.5\%$ ,  $C = 3\%$ ) проводили в расположенных вертикально стеклянных трубках с внутренним диаметром 0.5 см и длиной 10 см на приборе, сконструированном в лаборатории. Электрофоретические условия были подобны описанным в работе [5], включая время миграции (6 ч при  $20^\circ\text{C}$ ). Бромфеноловый голубой был использован в качестве лидирующего красителя. После электрофореза гели удаляли из трубок, окрашивали в течение 10 мин 0.5% Coomassie Brilliant Blue G-250, приготовленном в растворе А (метанол-уксусная кислота-вода (4 : 1 : 5)), и затем отмывали в течение 16 ч в растворе А. Для определения констант диссоциации по экспериментальным данным были построены изотермы адсорбции с помощью программы MINIM 3.0 (R.D. Purves, University of Otago, Новая Зеландия).

Значения констант диссоциации были определены в соответствии с процедурой Бог-Хансена и Таеко [16] с использованием зависимости:

$$\frac{d_0 - d}{d_0} = \frac{L}{(L + K_d)},$$

где  $d$  – расстояние, пройденное белком при концентрации лиганда  $L$ , мМ;  $d_0$  – расстояние, пройденное белком в отсутствие лиганда ( $L = 0$  мМ), и  $K_d$  – константа диссоциации комплекса белок–лиганд, мМ.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ № 98-04-49057).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wells J.A., Cunnigham B.C., Fuh G., Lowman H.B., Bass S.H., Mulkerin M.G., Ultsch M., De Vos A.M. // *Recent Prog. Horm. Res.* 1993. V. 48. P. 253–275.
2. Cunnigham B.C., Bass S., Fuh G., Wells J.A. // *Science.* 1990. V. 250. P. 1709–1712.
3. Somers W., Ultsch M., De Vos A.M., Kossiakoff A.A. // *Nature.* 1994. V. 372. P. 478–481.
4. Goubran-Botros H., Vijayalakshmi M.A. // *Electrophoresis.* 1991. V. 12. P. 1028–1032.
5. Baek W.-O., Haupt K., Colin C., Vijayalakshmi M.A. // *Electrophoresis.* 1996. V. 17. P. 489–492.
6. Schulga A.A., Levichkin I.V., Kurbanov F.T., Okorokov A.L., Pozmogova G.E., Kirpichnikov M.P. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. P. 3808–3810.
7. Baek W.-O., Vijayalakshmi M.A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1997. V. 1336. P. 394–402.
8. Анисимова М.В., Варламов В.П., Виджаялакшми М.А. // *Молекуляр. биология.* 1998. Т. 32. С. 360–361.
9. Haymore B.L., Bild G.S., Salsgiver W.J., Staten N.R., Krivi G.G. // *Methods: A Companion to Methods in Enzymology.* 1992. V. 4. P. 25–40.
10. Sulkowski E. // *Trends in Biotechnology.* 1989. V. 53. P. 1–7.
11. Sulkowski E. // *BioEssays.* 1989. V. 10. P. 170–175.
12. Arnold F.H. // *Biotechnology.* 1991. V. 9. P. 151–156.
13. Jones T.A. // *Meth. Enzymol.* 1985. V. 115. P. 157–171.
14. Левичкин И.В., Арсеньева Д.А., Шульга А.А. // *Молекуляр. биология.* 1998. Т. 32. С. 317–322.
15. Skryabin K.G., Rubtsov P.M., Gorbulev V.G., Schulga A.A., Parsadarian A.Sh., Kirpichnikov M.P., Baev A.A., Pavlovskii A.G., Borisova S.N., Vainstein B.K., Bulgotov A.A. // *Protein Structure and Engineering. Series A: Life Sciences / Ed. Jardetzky O.* New York: Plenum Press, 1990. V. 183. P. 309–324.
16. Bog-Hansen T.C., Takeo K. // *Electrophoresis.* 1980. V. 1. P. 67–71.

## The Study of the Metal-Binding Region in Human Growth Hormone Using Immobilized Metal Ion Affinity Gel-Electrophoresis

M. V. Anisimova\*, A. A. Shulga\*\*, I. V. Levichkin\*\*, M. P. Kirpichnikov\*\*, K. M. Polyakov\*\*\*, K. G. Skryabin\*, M. A. Vijayalakshmi\*\*\*\*, and V. P. Varlamov\*#

\*Bioengineering Center, Russian Academy of Sciences, pr. 60-letya Otkryabrya 7/1, Moscow, 117312 Russia;

\*\*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia;

\*\*\*Shubnikov Institute of Crystallography, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117333 Russia;

\*\*\*\*Université de Technologie de Compiègne, BP 649/60206 Compiègne Cedex, France

The zinc(II)-binding affinities of recombinant human growth hormone and two its mutants, 14–33 and 14–95, were studied using Immobilized Metal Ion Affinity Gel-electrophoresis (IMAG). The mutant hormones, composed of polypeptide chain segments of the human and porcine growth hormones, lacked His 18, which may be crucial for binding of the intact hormone to the transition metal ions. The mutations did not affect the affinity of human growth hormone to immobilized zinc ions; the structural analysis implied that the human growth hormone contains two IDA–Zn(II) potential sorption sites formed by amino acid residues His21, Asp171, and Glu174 and/or His18 and Glu174.

*Key words:* human growth hormone, mutagenesis, immobilized metal ion affinity gel-electrophoresis, zinc ions

# To whom correspondence should be addressed; phone +7 (095) 135-6556; e-mail: varlamov@biengi.ac.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 1. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.