



УДК 577.1 : 547.963

## ТРИПТОФАН В СТЕРОИДСВЯЗЫВАЮЩЕМ ЦЕНТРЕ ТРАНСКОРТИНА

*Ахрем А. А., Аввакумов Г. В., Кукушкина И. И.,  
Прищепов А. С., Свиридов О. В., Стрельченко О. А.*

*Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск;*

*Институт физики Академии наук БССР, Минск*

Для понимания механизма связывания стероидных гормонов белками важно знать структурную организацию центров связывания, и в первую очередь природу входящих в них аминокислотных остатков.

Известно [1], что при взаимодействии стероидов различной структуры с белками крови, такими, как альбумин, орозомукоид, прогестеронсвязывающий глобулин, важную роль играют остатки триптофана. Наиболее надежным доказательством этого является тушение флуоресценции белка в области 340 нм при титровании стероидом [2].

Для применения метода тушения флуоресценции необходимо иметь белок, свободный от стероида. Однако безрезультатность прежних попыток удаления кортизола из комплекса транскортина — кортизол без потери транскортином связывающей способности привела исследователей к выводу [3, 4], что этот белок может быть получен только в виде комплекса с кортизолом.

В настоящей работе описывается получение гомогенного, свободного от природного лиганда транскортина с сохранением его активности и приводится прямое доказательство локализации триптофана в стероидсвязывающем центре на основании тушения флуоресценции при титровании транскортина кортизолом.

Транскортин выделяли из сыворотки ретроплацентарной крови человека методом аффинной хроматографии [5]. Белковый элюат после аффинной колонки, содержащий ~ 30% транскортина, освобождали от избытка кортизола гель-фильтрацией на сефадексе G-25 в 0,05 М натрий-фосфатном буфере, рН 7,4 · 10<sup>-3</sup> М по дитиотреиту (стандартный буфер). Связанный стероид удаляли путем инкубации белкового раствора с 2% суспензией активированного угля, покрытого декстраном (37°, 30 мин). При этом полнота удаления кортизола составляла 96%. Гомогенный белок получали хроматографией на колонке с гидроксипатитом. Активность белка проверяли по связыванию кортизола методом равновесного диализа [6]. Параметры связывания соответствовали нативному белку.

На рис. 1 приведены спектральные характеристики комплекса транскортина — кортизол и его компонентов, полученные на спектрофлуориметре Fica-55 и спектрофотометре Unicam SP-800. Для исключения тривиальной реабсорбции во всех люминесцентных измерениях оптическая плотность исследуемых белковых растворов при 280 нм поддерживалась ниже 0,03. Квантовый выход люминесценции белка в буфере определялся относительно триптофана и оказался равным 0,105.

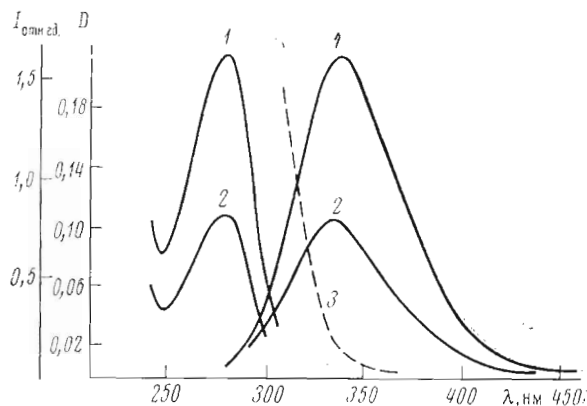


Рис. 1. Спектры возбуждения и люминесценции транскортина (1) и комплекса транскортин — кортизол (2); спектр поглощения кортизола (3). Спектры измерены в стандартном буфере

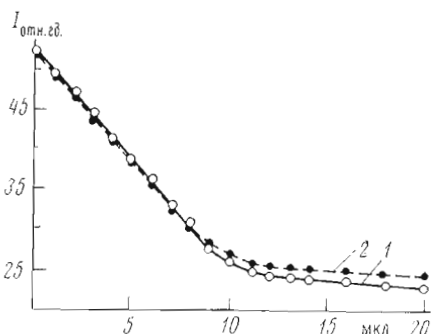


Рис. 2. Кривые тушения люминесценции при титровании транскортина кортизолом в стандартном буфере (1) и в том же буфере, содержащем 20% сахарозы (2). Концентрация кортизола в точке эквивалентности  $5 \cdot 10^{-7}$  M

На рис. 2 представлены результаты изучения тушения люминесценции белка кортизолом при  $4^\circ$  (кривая 1). Возбуждение и регистрация люминесценции проводились в длинах волн 280 и 337 нм соответственно. Тушение люминесценции при титровании белка кортизолом связано с образованием комплекса белок — кортизол, квантовый выход люминесценции которого составляет 48% от квантового выхода белка. На основании кривой титрования рассчитана [7] константа связывания, равная  $6,3 \cdot 10^8$  M<sup>-1</sup>.

Перенос энергии возбуждения между молекулами в комплексе, как известно [8], может осуществляться как не зависящим от вязкости среды индуктивно-резонансным, так и контролируемым диффузией обменно-резонансным способом.

Полагая, что основным механизмом миграции энергии возбуждения от донора к акцептору является индуктивный резонанс [8], можно рассчитать критическое расстояние переноса, исходя из теории Ферстера [9]. Для пары транскортин — кортизол рассчитанный нами интеграл перекрытия равен  $4,2 \cdot 10^{-19}$  см<sup>6</sup> · ммоль<sup>-1</sup>, показатель преломления буфера в ультрафиолетовой области спектра принят равным 1,5 [10]. Ориентационный фактор был принят равным  $2/3$  для случайного углового распределения дипольных моментов переходов для донорно-акцепторной пары. Расчет критического расстояния переноса энергии между молекулами в комплексе, исходя из этих данных, дает значение, равное  $12,7 \pm 0,5$  Å.

Необходимо отметить, что кривые титрования транскортина кортизолом, полученные в стандартном буфере, содержащем 20% сахарозы, имеют

некоторые различия (рис. 2). Небольшое уменьшение глубины тушения может быть вызвано вкладом обменно-резонансного механизма переноса энергии возбуждения. Этот вклад можно окончательно оценить из измерений времен жизни люминесценции белка и комплекса.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Westphal U. (1971) *Steroid-Protein Interactions*, pp. 133—163, 306—314, 375—433, Springer-Verlag, New York.
2. Kute T., Westphal U. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **420**, 195—213.
3. Muldoon T. G., Westphal U. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 5636—5643.
4. Le Gaillard F., Aubert J. P., Dautrevaux M., Loucheux-Lefebvre M. H. (1976) *FEBS Lett.*, **64**, 278—284.
5. Ахрем А. А., Аввакумов Г. В., Кукушкина И. И., Свиридов О. В., Стрельченко О. А., Сурвило Л. И., Чащин В. Л. (1977) *Изв. АН БССР. Сер. хим. н.*, № 6, 111—115.
6. Westphal U. (1969) *Meth. Enzymol.*, **15**, 761—796.
7. Attallah N. A., Lata G. F. (1968) *Biochim. et biophys. acta*, **168**, 321—333.
8. Stroupe S. D., Cheng S.-L., Westphal U. (1975) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **168**, 473—482.
9. Förster Th. (1959) *Discuss. Faraday Soc.*, **27**, 7—14.
10. Eisinger J., Feuer B., Lamola A. A. (1969) *Biochemistry*, **8**, 3908—3915.

Поступило в редакцию  
24.X.1977

#### TRYPTOPHAN RESIDUE IN THE CORTISOL-BINDING SITE OF TRANSCORTIN

AKHREM A. A., AVVAKUMOV G. V., KUKUSHKINA I. I.,  
PRISHCHEPOV A. S., SVIRIDOV O. V., STREL'CHYONOK O. A.

*Institute of Bioorganic Chemistry and Institute of Physics, Academy of Sciences  
of the Byelorussian SSR, Minsk*

Active transcortin from human retroperitoneal plasma has been prepared in a homogeneous form free of cortisol, its naturally occurring ligand. The fluorescence quenching observed on transcortin titration with cortisol indicated the involvement of a tryptophan residue in the binding site. Critical distance of the excitation energy transfer calculated upon the assumption of a resonance transfer mechanism was calculated to be  $12.7 \pm 0.5 \text{ \AA}$ .

Технический редактор *Е. С. Кузьмишина*

Сдано в набор 20/XII—1977 г. Т-00330 Подписано к печати 27/I-1978 г. Тираж 845 экз.  
Зак. 3178 Формат бумаги 70×108<sup>1/16</sup> Усл. печ. л. 12,6. Бум. л. 4,5 Уч.-изд. л. 12,7

2-я типография издательства «Наука», Москва, Шубинский пер., 10