



УДК 577.1+547.963.04

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В КОМПЛЕКСЕ
ТРАНСКОРТИН — СТЕРОИД*Ахрем А. А., Свиридов О. В., Стрельченко О. А.**Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск**Прищепов А. С.**Институт физики Академии наук БССР, Минск**Дешко Т. Н.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина Академии наук СССР, Москва*

Проведено детальное исследование причин изменений в спектрах КД и УФ транскортина плазмы крови человека при комплексообразовании с кортизолом, кортикостероном, прогестероном и тестостероном. Незапрещенные полосы КД в области 290–330 нм и широкие положительные полосы с максимумами в районе 310–315 нм в дифференциальных УФ-спектрах комплексов транскортина — стероид вызваны возмущением электронных переходов $A-L_a$ остатка триптофана. Значительное увеличение каттон-эффекта в области 255 нм и интенсивная отрицательная полоса при 260 нм в дифференциальных УФ-спектрах указывают на возмущение $\pi \rightarrow \pi^*$ -перехода $C=C-C=O$ -хромофора стероида. Сопоставление КД и УФ-спектров комплексов транскортина — стероид выявило различия в локальных конформационных изменениях транскортина вблизи остатка триптофана, находящегося в стероидсвязывающем центре. Большие изменения величин оптической активности при взаимодействии транскортина со стероидами, сдвиги, наблюдаемые в спектрах поглощения связанных стероидов, значительное сужение (на 2–5 нм) полос $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходов и гипохромизм в поглощении связанного стероида дают основание считать, что в комплексе реализуются сильные диполь-дипольные взаимодействия. Взаимодействия транскортина со стероидами в каждом отдельном случае строго специфичны.

Систематические исследования последних лет позволили выделить и частично охарактеризовать ряд белков плазмы крови человека, ответственных за связывание определенных классов стероидных гормонов [1]. Особое место среди стероидсвязывающих белков занимает специфический гликопротеин плазмы — транскортин. Этот белок с высоким сродством связывает кортикостероидные гормоны и прогестерон. В связи с этим выяснение молекулярных основ высокого, специфического сродства транскортина важно для понимания механизмов транспорта и гормонального действия стероидов.

Предложенная Розвером [2] эффективная процедура выделения транскортина способствовала интенсивному изучению физико-химических характеристик белка [3] и его стероидсвязывающих свойств [4, 5]. Применение аффинных меток при исследовании стероидсвязывающего центра транскортина [6, 7] позволило выявить отдельные аминокислотные остатки, вовлеченные во взаимодействие со стероидами. Однако весьма информативные спектральные методы изучения стероид-белковых взаимодействий [8] применялись к транскортину лишь эпизодически [9].

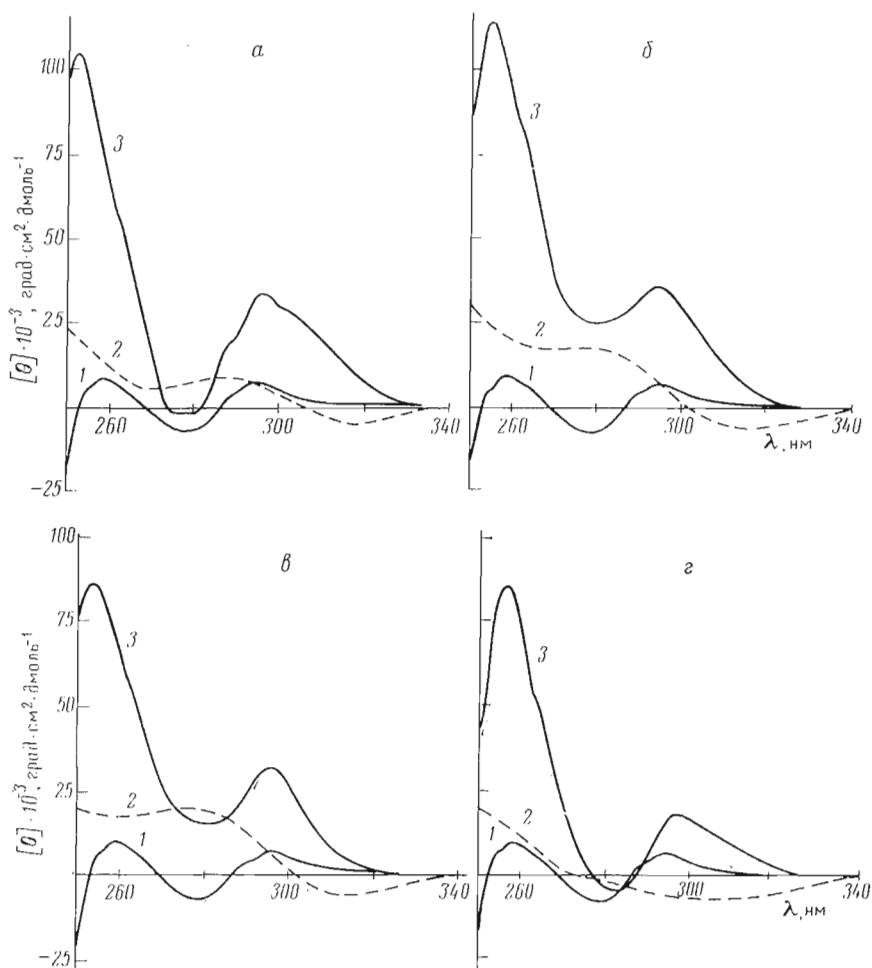


Рис. 1. Спектры КД эквимольных комплексов транскортина с кортизолом (а), кортикостероном (б), прогестероном (в), тестостероном (г) и компонентов этих комплексов: 1 — транскортин, 2 — стероид, 3 — комплекс транскортин — стероид

В предыдущем сообщении [10] мы показали, что при связывании транскортином стероидов происходят конформационные изменения белка и гормонов. Целью настоящей работы явилось детальное исследование причин изменений в спектрах КД и УФ белка при связывании кортизола, кортикостерона, прогестерона и тестостерона.

На рис. 1а—г представлены спектры КД транскортина, стероидов и эквимольных комплексов транскортин — стероид. Известно, что спектр КД белка в области 250—350 нм формируется оптически активными переходами боковых цепей ароматических аминокислот и дисульфидных связей [11]. В спектре КД транскортина наблюдаются две широкие неразрешенные полосы с положительными силами вращения (максимумы полос лежат при длинах волн 257 и 296 нм) и одна широкая отрицательная полоса с максимумом при 278 нм. Исследование модельных систем и некоторых белков [12, 13] позволяет соотнести полосы в области 290—330 нм с оптически активными электронными переходами остатков триптофана транскортина. Так как в спектре КД транскортина отсутствует вклад, вносимый дисульфидными связями [3], а сила вращения остатков фенилаланина в нативных белках мала [14], можно сказать, что в область 250—290 нм вносят вклад остатки триптофана и тирозина [15]. При образо-

вании комплексов транскортин — стероид наблюдается значительное увеличение оптической активности переходов в областях 250–270 и 290–330 нм. При этом электронные переходы индольного хромофора $'A-L_a$ и $'A-L_b$ [16] могут испытывать спектральные сдвиги с изменением дипольных и вращательных сил. Переходы $'A-L_a$ более чувствительны к возмущению [17]. Это дает основание полагать, что неразрешенные полосы КД в области 300–330 нм обусловлены $'A-L_a$ -переходами, испытывающими при возмущении батохромный сдвиг. Вместе с тем изменение оптической активности электронных переходов, ответственных за появление длинноволнового плеча в основной полосе КД комплексов, и изменение амплитуды катон-эффекта в области 270–290 нм указывают на вклад возмущенных индольных и фенольных хромофоров в этой области спектра при формировании спектров КД комплексов [14, 15].

Интересно, что в спектре КД комплекса транскортин — кортизол хорошо выражены три полосы в области 290–330 нм, которые слабо выражены в спектрах КД остальных комплексов. Частичное разрешение спектральных полос КД комплекса транскортин — кортизол может быть связано с более жесткой упаковкой молекулы кортизола в стероидсвязывающем центре белка, что должно привести к замораживанию внутреннего движения молекулы белка и гормона в центре связывания. Это в свою очередь может вызвать увеличение оптической активности электронных переходов остатка триптофана [12], так как остаток триптофана белка участвует в связывании стероидных гормонов [18].

В районе 280 нм основной вклад в формирование спектров КД комплексов транскортина с кортизолом, кортикостероном и прогестероном вносит $n \rightarrow \pi^*$ -переход карбонильной группы стероида у $C_{(20)}$, которая, на наш взгляд, претерпевает возмущение при взаимодействии с белком. Оптически активные переходы ароматических аминокислот, по-видимому, не испытывают сильных возмущений, так как инверсия знака полос этих переходов маловероятна. Амплитуды полос оптически активных электронных переходов остатка триптофана белка в спектрах КД комплексов с максимумами 296 и 305 нм с учетом аддитивности вклада электронных переходов стероидов имеют малые различия. По-видимому, форма и полуширина полос индивидуальных электронных переходов остатка триптофана существенно не меняются при его возмущении. В соответствии с этим силы вращения этих переходов могут быть приблизительно одинаковы. Положительные полосы КД комплексов в области 290–330 нм, очевидно, связаны с особенностями строения белковой молекулы, так как они отмечены в спектре КД транскортина. Кроме того, маловероятно, что образование комплекса может привести к инверсии знака оптической активности $n \rightarrow \pi^*$ -перехода стероида [19].

Появление большой оптической активности в области 255 нм связано с возмущением $C=C=O$ -хромофора стероида, $\pi \rightarrow \pi^*$ -переход которого находится вблизи 250 нм. Об этом свидетельствует уменьшение поглощательной способности связанного транскортином стероида, что следует из сопоставления спектров поглощения свободного и связанного стероида (рис. 2, таблица). Возможным вкладом ароматических хромофоров белка в область 237–255 нм можно пренебречь, так как в обоих спектрах наблюдается хорошая симметрия, идентичность формы полос поглощения и лишь

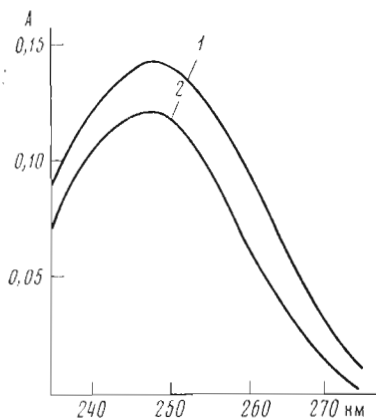


Рис. 2. Абсорбционные спектры свободного (1) и связанного транскортином (2) кортизола. Концентрация стероида 9,1 мкМ, длина оптического пути 1 см

Спектральные и энергетические характеристики свободных и связанных транскортином стероидов

Стероид	$K_{ac}^* \cdot 10^{-3},$ M^{-1}	λ_{max}, nm		$\epsilon_{max}, M^{-1}cm^{-1}$		δ^{**}, nm		$D^{***} \cdot 10^{-36},$ $erg \cdot cm^3$		$D_{своб.}/D_{связ.}$
		своб.	связ.	своб.	связ.	своб.	связ.	своб.	связ.	
Кортизол	1,5	247,5	247,0	15900	13500	29,0	25,5	18,2	13,6	1,34
Кортикостерон	1,8	248,0	247,5	15800	12200	29,0	26,5	18,1	12,8	1,47
Прогестерон	2,0	247,0	246,0	16500	12800	31,0	26,5	20,2	13,5	1,50
Тестостерон	0,4	248,0	247,5	15900	12400	30,0	25,5	18,9	12,5	1,51

* Константы ассоциации транскортина со стероидами определены при 23° [5].

** δ — полуширина полосы поглощения стероида.

*** D — силы дипольных электронных переходов стероидов рассчитаны в предположении гауссовой формы полос поглощения.

незначительные различия в положении максимумов. Узкая положительная полоса в области 255 нм в спектрах КД комплексов транскортина — стероид (рис. 1) обусловлена вычитанием из положительной полосы КД $\pi \rightarrow \pi^*$ -перехода стероидного хромофора сильной отрицательной полосы амидного хромофора белка.

Спектры КД существенно дополняются спектрами поглощения изучаемых комплексов транскортина — стероид. Абсорбционные изменения компонентов комплекса, возникающие в результате взаимодействия, отчетливо проявляются в дифференциальных УФ-спектрах. На рис. 3 представлены дифференциальные УФ-спектры эквивалентных комплексов транскортина — стероид. В этих спектрах присутствуют широкие положительные полосы с максимумами в районе 310–315 нм (рис. 3а–г) и интенсивная отрицательная полоса с четко выраженным минимумом при 260 нм (рис. 3д). На длинноволновом крыле основной отрицательной полосы проявляются полосы с минимумами при 293–294, 290–291 и 282–283 нм. Неразрешенные длинноволновые положительные полосы комплексов транскортина — стероид вызваны, по-видимому, возмущением $A-L_a$ -электронных переходов индольного хромофора [20], которые чувствительны к локальному окружению остатка триптофана в стероидсвязывающем центре транскортина. Увеличение сил диполей этих полос, очевидно, обусловлено увеличением величин дипольных моментов переходов остатка триптофана при локальных конформационных изменениях в области стероидсвязывающего центра транскортина. Интенсивный отрицательный сигнал при 260 нм связан с изменением абсорбционных свойств Δ^4 -3-кетохромофора стероида [21]. Точное отнесение дифференциальных минимумов в области 280–295 нм затруднительно в связи с перекрытием абсорбционных полос хромофоров ароматических аминокислот с интенсивными полосами поглощения возмущенных $C=C-O$ -групп стероидов. Однако на основании спектральных характеристик остатков триптофана и тирозина в белках [22] плечо при 293–294 нм и минимум при 282–283 нм в дифференциальных спектрах комплексов транскортина — стероид можно, по-видимому, отнести к возмущению электронных переходов остатка триптофана, а минимум при 290–291 нм — к возмущению электронных переходов остатка тирозина, вовлеченных во взаимодействие транскортина со стероидами.

Качественно картина дифференциальных УФ-спектров для всех изученных комплексов сходна. Различие в интенсивности дифференциальных сигналов обусловлено степенью возмущения электронных переходов ароматических хромофоров белка и Δ^4 -3-кетогрупп стероидов, ответственных за формирование спектров поглощения комплексов. Это возмущение может выражаться как сдвигом полос электронных переходов, так и изменением вероятности переходов на соответствующие возбужденные уровни.

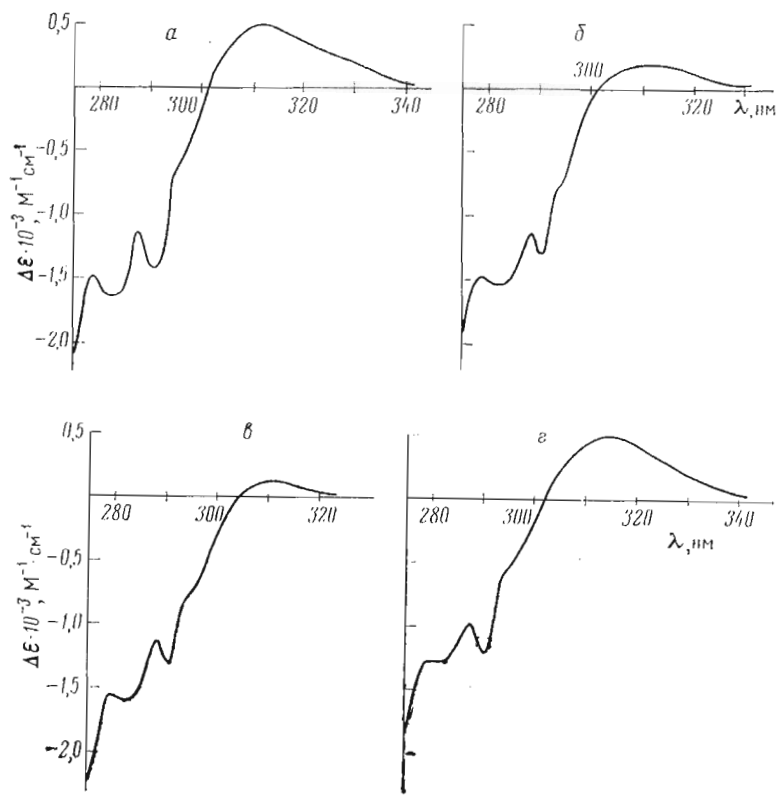
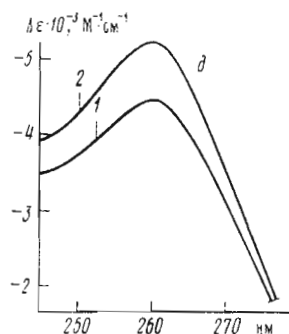


Рис. 3. Дифференциальные УФ-спектры эквимольных комплексов транс-кортина со стероидами. *a* – *г* – область ароматических хромофоров комплексов транс-кортина с кортизолом (*a*), кортикостероном (*б*), прогестероном (*в*) и тестостероном (*г*), *д* – область Δ^4 -3-кетохромофора на примере комплексов белка с кортизолом (1) и прогестероном (2)



С целью выявления различий в локальных конформационных изменениях транс-кортина вблизи остатка триптофана стероидсвязывающего центра при связывании стероидов различной структуры целесообразно сопоставить спектры КД и поглощения комплексов. Из приведенных спектров следует, что изменения величин эллиптичностей в спектрах КД комплексов спектрально аналогичны изменениям величин молярных коэффициентов экстинкции в спектрах поглощения этих комплексов. Различие сил диполей электронных переходов в длинноволновой области УФ-спектра различных комплексов и приблизительно одинаковые силы вращения для этих комплексов в той же области спектра свидетельствуют о том, что при взаимодействии транс-кортина со стероидами происходят одновременные изменения электрического и магнитного дипольных моментов переходов остатка триптофана белка. Причем увеличению дипольных электрических моментов переходов $'A-L_a$ может соответствовать уменьшение величин магнитных дипольных моментов этих переходов или же увеличение угла

между дипольными моментами. В области возмущенного $\pi \rightarrow \pi^*$ -перехода стероида картина изменения дипольных моментов переходов противоположная. Найти закономерность в изменении оптической активности в полосах электронных переходов $C=C-C=O$ -хромофоров стероидов и величиной их возмущения невозможно в силу того, что эти переходы при возмущении могут претерпевать как спектральные сдвиги, так и изменение дипольных и вращательных сил. Тем не менее сопоставление КД- и УФ-спектров изученных комплексов транспортин — стероид позволяет говорить о том, что при взаимодействии происходят различные конформационные изменения стероидов и различные локальные конформационные изменения вблизи остатка триптофана стероидсвязывающего центра белка. Это утверждение может найти объяснение в молекулярной теории поляризуемостей Кирквуда — Куна, которая предполагает локализацию взаимодействующих электрических дипольных моментов на связях или группах связей в молекуле [23]. При этом оптическая активность молекулы зависит от поляризуемостей связей, величин дипольных моментов и их взаимной ориентации. Наблюдаемые нами изменения оптической активности при взаимодействии молекул в комплексе могут быть вызваны изменением всех упомянутых факторов.

При титровании транспортин кортизолом регистрировался прирост разностного дихроичного поглощения при 255 и 305 нм и увеличение амплитуды сигналов в дифференциальных спектрах при 260 и 290 нм после прибавления аликвот раствора стероида к раствору транспортин. При титровании происходило симбатное увеличение кругового дихроизма и дифференциального поглощения в указанных длинах волн вплоть до эквимолярного соотношения белка и стероида. Дальнейшее прибавление кортизола практически не приводило к изменению спектральных характеристик оптической активности и поглощения с учетом аддитивности избыточного стероида. Аналогичные зависимости получены при титровании транспортин кортикостероном, прогестероном и тестостероном. Важно отметить, что при титровании транспортин стероидами не наблюдалось смещения полос КД и УФ-поглощения или появления новых сигналов. Это свидетельствует о том, что в условиях нашего эксперимента реализуется один тип комплекса со своим специфическим межмолекулярным взаимодействием.

Регистрация изменений кругового дихроизма и УФ-поглощения при титровании белка стероидами позволяет определять концентрацию стероидсвязывающих центров транспортин в растворе. В наших опытах число стероидсвязывающих центров транспортин, определенное при титровании белка различными стероидами, оказалось одинаковым — $0,91 \pm 0,06$ на моль белка.

Ранее [18] для комплекса транспортин с кортизолом нами было рассчитано критическое расстояние безызлучательного переноса энергии от возбужденного остатка триптофана транспортин на сильно тушащий флуоресценцию белка кортизол в рамках индуктивно-резонансного механизма Фёрстера. Этот механизм предполагает слабое диполь-дипольное взаимодействие молекул донора и акцептора ($R_0 = 12,7 \text{ \AA}$). При таком взаимодействии в спектрах поглощения и КД не наблюдается сужения полос электронных переходов, их сдвигов, а также изменения молярных коэффициентов экстинкции линейно и циркулярно влево и вправо поляризованного света.

Настоящее исследование позволило выявить небольшие сдвиги (0,5—1 нм), наблюдаемые в спектрах поглощения связанных стероидов, значительное сужение (на 2—5 нм) полос $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходов стероидов в комплексах. В таблице для сравнения приведены полуширины полос поглощения свободных и связанных белком стероидов. Истинные полуширины полос связанных стероидов получены путем расчета контура всей полосы поглощения, исходя из ее контура в области 237—255 нм. Такой расчет позволил исключить вклад отрицательных сигналов ароматических хромофоров

в область 255—275 нм абсорбционной полосы связанного стероида. В той же таблице приведены положения максимумов полос поглощения свободных и связанных белком стероидов, а также соотношения их максимальных молярных коэффициентов экстинкции и дипольных сил электронных переходов стероидных хромофоров. Следует также отметить, что при образовании комплексов белка со стероидами наблюдается гипохромизм в поглощении связанного стероида. Это дает основание полагать, что в нашем случае имеет место более сильное, чем Фёрстеровское, взаимодействие между дипольными моментами переходов остатка триптофана белка и молекулы стероида, близкое по своему характеру к экситонному. Экситонный механизм переноса возбуждения предполагает вырожденность энергетических уровней системы идентичных молекул. При этом в спектрах поглощения и КД должно проявляться расщепление и сужение полос, изменение сил диполей и сил вращения [24, 25]. На наш взгляд, большие изменения величин оптической активности при образовании комплексов транскортина со стероидами можно объяснить в рамках теории сильного индуктивно-резонансного взаимодействия между дипольными моментами переходов неидентичных молекул с перекрывающимися полосами поглощения [26, 27]. Согласно этой теории, силы вращения электронных переходов взаимодействующих молекул определяются величиной и взаимной ориентацией дипольных моментов переходов и расстоянием между их центрами. Увеличение сил вращения электронных переходов взаимодействующих молекул свидетельствует о том, что векторы дипольных электрических моментов переходов в хромофорах и вектор расстояния, соединяющий центры этих дипольных моментов, не лежат в одной плоскости, причем дипольные моменты переходов остатка триптофана транскортина и Δ^4 -3-кетогруппы стероидов расположены под углом друг к другу. На основании этого можно сказать, что использованный нами ранее фактор взаимной ориентации взаимодействующих диполей наиболее близок к истинному. По-видимому, критическое расстояние переноса энергии между молекулами в комплексе транскортина — кортизол, оцененное по теории Фёрстера, является верхней границей расстояния между донором и акцептором энергии возбуждения.

Известно, что $n \rightarrow \pi^*$ -переходы карбонильных групп в молекулах стероидов имеют малые молярные коэффициенты экстинкции ($\epsilon \ll 100$) [19]. Поэтому объяснить увеличение оптической активности при связывании транскортином стероидов в области 290—330 нм сильным диполь-дипольным индуктивно-резонансным механизмом не представляется возможным, так как этот механизм пригоден лишь в случае взаимодействия сильных электронных переходов ($\epsilon > 1000$) [28]. Оптическая активность стероидов в этой области значительна. Поэтому не исключена возможность взаимодействия магнитных дипольных $n \rightarrow \pi^*$ -переходов стероидов с дипольными электрическими моментами переходов остатка триптофана белка, которое описывается теорией Вуди и Тиноко [29].

Предложенные нами объяснения наблюдаемых спектральных изменений при образовании комплексов транскортина со стероидами не являются альтернативными, а взаимно дополняют друг друга. Внедрение гормона в стероидсвязывающий центр транскортина обуславливает взаимные конформационные изменения белка и стероида. Эти изменения определяются структурой молекулы стероида. Общие, а также локальные, специфические конформационные изменения транскортина в области связывающего центра определяют геометрию каждого комплекса транскортина — гормон, близость и жесткая ориентация взаимодействующих групп в котором создает возможность для реализации сильных диполь-дипольных взаимодействий.

При изучении взаимодействия специфического прогестеронсвязывающего белка с прогестероном Вестфаль [8] не наблюдал оптической активности для комплекса белок — гормон в области ароматических хромофоров

белка. В то же время наблюдалось сужение спектральных полос связанных стероидов, а также гиперхромный абсорбционный эффект в полосе поглощения стероидов [30]. Явление исчезновения оптической активности для комплекса белка с прогестероном можно объяснить тем, что векторы дипольных моментов переходов взаимодействующих групп и вектор, соединяющий центры этих дипольных моментов, лежат в одной плоскости. Таким образом, изучение связывания стероидных гормонов специфическими белками — транскортином и прогестеронсвязывающим глобулином — указывает на первостепенную важность относительной ориентации взаимодействующих групп белка и стероида, что следует из данных КД и УФ-спектров.

Таким образом, приведенные в настоящей работе и опубликованные ранее [10] данные позволяют утверждать, что общая конформация молекулы транскортина и молекулы стероида изменяется при взаимодействии. Локальные конформационные изменения белка в области стероидсвязывающего центра специфичны по отношению к структуре и конформации связанного стероида.

Ранее [31] уже отмечалась высокая избирательность стероидсвязывающего центра белка, предусматривающая жесткие структурные требования к молекуле стероида. Необходимым условием высокого сродства к транскортину является наличие Δ^4 -3-кетогруппы в молекуле стероида. Отсутствие в стероидном скелете прегнановой боковой цепи приводит к значительному снижению сродства стероида к белку. Предложенная нами возможность реализации сильных индуктивно-резонансных взаимодействий в системе транскортин — стероид согласуется с указанными выше структурными требованиями к молекуле стероида и предполагает взаимодействия между остатком триптофана и Δ^4 -3-кетогруппой стероида наиболее важными при специфическом связывании.

Гайяр [6] провел исследование стероидсвязывающего центра транскортина с использованием бромацетильных производных прогестерона и тестостерона. Были сделаны выводы, что 11β -гидроксильная группа стероидов образует водородную связь с остатком метионина, а карбонильная группа у $C_{(20)}$ — с остатком гистидина в стероидсвязывающем центре транскортина. Доказательством этому общему утверждению служили факты понижения константы ассоциации транскортина с кортикостероидами, в молекулах которых отсутствовала 11β -гидроксильная группа [32] и наблюдался различный акцепторный характер карбонильной группы у $C_{(20)}$ в зависимости от присутствия гидроксильных групп у $C_{(17)}$ или $C_{(20)}$ [33].

Ранее [5] мы установили структурную зависимость сродства стероидов к транскортину методом тушения флуоресценции с использованием гомогенного белка, лишённого природного лиганда (кортизола). Константы ассоциации транскортина с прогестероном, 11 -дезоксикортизолом и дезоксикортикостероном выше константы ассоциации для комплекса транскортин — кортизол. Мы склонны считать, что при взаимодействии транскортина со стероидами происходят сильные индуктивно-резонансные взаимодействия в системе, при которых важнейшим фактором является взаимная ориентация дипольных моментов переходов остатка триптофана белка и Δ^4 -3-кетогруппы стероида. Взаимодействия транскортина со стероидами в каждом отдельном случае строго специфичны. Эти выводы находятся в согласии с результатами Вестфаля [30], полученными при исследовании специфического прогестеронсвязывающего белка.

Экспериментальная часть

Транскортин, не содержащий связанный кортизол, выделяли из сыворотки ретроплацентарной крови человека методом аффинной хроматографии [18, 34] и использовали в работе в тот же день. Кратковременное хранение белка (в течение ночи) ухудшало результаты вследствие частич-

ной инактивации транскортина. Эффективность удаления кортизола из комплекса транскортин—кортизол составляла не менее 96%. В работе использовали 0,005 М натрий-фосфатный буфер (рН 6,8), приготовленный на дважды перегнанной в стеклянной аппаратуре и деионизованной воде. Концентрацию белка в буфере измеряли спектрофотометрически по определенному нами коэффициенту экстинкции $E_{280}^{1\%} = 6,9$. Концентрацию связывающих центров транскортина измеряли методом тушения флуоресценции при титровании белка кортизолом [5]. В работе использовали растворы стероидов (Germed, ГДР) в 50% этаноле. Концентрацию стероидов контролировали на спектрофотометре Cary 15 (США). Перед спектральными измерениями используемые растворы фильтровали через мембранный фильтр Сипор-4 (СССР). Все спектральные измерения проводили при 23°.

Дифференциальные УФ-спектры комплексов транскортина с кортизолом, кортикостероном, прогестероном и тестостероном регистрировали на спектрофотометре Acta MVI (США), при чувствительности 0–0,5 ед. на шкалу и в диапазоне длин волны 240–350 нм. Для записи дифференциальных спектров использовали тандемы термостатированных кварцевых кювет с длиной оптического пути 1 см в опытном и сравнительном отделениях прибора. В начале опыта кюветы в каждом отделении содержали раствор транскортина (0,5 мг/мл) и буфер. Для фиксированного расположения тандемов кювет зашпывали базовую линию. Затем равные аликвоты (1 мкл) растворов стероидов (2,5 мМ) с помощью микрошприца добавляли в опытную кювету, содержащую раствор транскортина, и в кювету сравнения с буфером. Такое же количество растворителя вносили в кювету сравнения с белком и в опытную с буфером. В конце титрования концентрация спирта не превышала 0,4%.

Спектры поглощения связанных транскортином стероидов регистрировали на спектрофотометре Acta MVI, используя идентичные растворы транскортина (0,4 мг/мл) в опытном и сравнительном отделениях прибора. При чувствительности 0–0,5 ед. на шкалу записывали базовую линию. Затем равные аликвоты раствора стероида (2,5 мМ), необходимые для насыщения связывающих центров транскортина, и 50% этанола были добавлены в опытную и сравнительную кюветы соответственно. Спектры поглощения стероидов против буфера регистрировали при чувствительности 0–0,5 ед. на шкалу.

Спектры КД снимали на дихрографе III фирмы Jobin Yvon в диапазоне длин волны 250–350 нм. Спектры КД стероидов получены в смеси вода—этанол (4:1 по объему). Титрование транскортина кортизолом, кортикостероном, прогестероном и тестостероном (2,5 мМ) проводили добавлением аликвот стероида (1 мкл) к 2 мл белкового раствора (0,4 мг/мл). В конце титрования концентрация спирта не превышала 0,4%. Молярную эллиптичность $[\theta]$ рассчитывали по мольной концентрации белка (комплекса) в буфере.

ЛИТЕРАТУРА

1. Burton R. M., Westphal U. (1972) *Metab.*, **21**, 253–276.
2. Rosner W., Bradlow H. L. (1971) *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **33**, 193–198.
3. Gaillard F., Han K.-K., Dautrevaux M. (1975) *Biochimie*, **57**, 559–568.
4. Chan D. W., Slaunwhite W. R. (1977) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **182**, 437–442.
5. Ахрем А. А., Свиридов О. В., Стрельченко О. А. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 1275–1277.
6. Gaillard F., Dautrevaux M. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, **495**, 312–323.
7. Khan M. S., Rosner W. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 1895–1900.
8. Westphal U., Stroupe S. D., Cheng S.-L. (1977) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **286**, 10–27.
9. Gaillard F., Aubert J. P., Dautrevaux M., Loucheux-Lefebvre M. H. (1976) *FEBS Lett.*, **64**, 278–284.
10. Ахрем А. А., Свиридов О. В., Стрельченко О. А. (1978) *Докл. АН СССР*, **241**, 1207–1209.
11. Adler A. J., Greenfield N. J., Fasman G. D. (1973) *Meth. in Enzymol.*, **27**, part D, 675–735.

12. Strickland E. H., Horwitz J., Billups C. (1969) *Biochemistry*, **8**, 3205-3213.
13. Horwitz J., Strickland E. H., Billups C. (1970) *J. Amer. Chem. Soc.*, **92**, 2119-2129.
14. Beychok S. (1967) in: *Poly- α -amino Acids* (Fasman G. D., ed.), pp. 293-337.
15. Strickland E. H. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 1233-1238.
16. Strickland E. H., Horwitz J., Kay E., Shannon L. M., Wilchek M., Billups C. (1971) *Biochemistry*, **10**, 2631-2638.
17. Andrews L. J., Forster L. S. (1972) *Biochemistry*, **11**, 1875-1879.
18. Ахрем А. А., Аввакумов Г. В., Кукушкина И. И., Прищепов А. С., Свиридов О. В., Стрельченко О. А. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 421-423.
19. Велюз Л., Лерган М., Гротан М. (1967) *Оптический круговой дихроизм*, с. 110-112, 173-183, «Мир», М.
20. Strickland E. H., Billups C., Kay E. (1972) *Biochemistry*, **11**, 3657-3662.
21. Ryan M. T. (1968) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **126**, 407-417.
22. Herskovits T. T., Sorensen S. M. (1968) *Biochemistry*, **7**, 2533-2542.
23. Kirkwood J. G. (1937) *J. Chem. Phys.*, **5**, 479-484.
24. Tinoco I. (1963) *Rad. Res.*, **20**, 133-139.
25. Kasha M. (1963) *Rad. Res.*, **20**, 55-70.
26. Морозов В. А. (1974) *Оптика и спектроскопия*, **37**, 1094-1096.
27. Морозов В. А. (1975) *Оптика и спектроскопия*, **38**, 972-979.
28. Shellman J. A. (1968) *Accounts Chem. Res.*, **1**, 144-151.
29. Woody R. W., Tinoco I. (1967) *J. Chem. Phys.*, **46**, 4927-4945.
30. Stroupe S. D., Westphal U. (1978) *Biochemistry*, **17**, 882-887.
31. Ахрем А. А., Аввакумов Г. В., Кукушкина И. И., Свиридов О. В., Стрельченко О. А., Чащин В. Л. (1978) *Изв. АН БССР. Сер. хим.*, 122-125.
32. Daughaday W. H., Kozak I. (1958) *J. Clin. Invest.*, **37**, 511-518.
33. Eger C. H., Greiner M. J., Norton D. A. (1971) *Steroids*, **18**, 231-249.
34. 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.*, 111-115.

Поступила в редакцию
10.VII.1978

После доработки
31.X.1978

SPECIFIC INTERACTIONS IN TRANSCORTIN-STEROID COMPLEX

AKHREM A. A., SVIRIDOV O. V., STREL'CHYONOK O. A.,
PRISHCHEPOV A. S., DESHKO T. N.

*Institute of Bioorganic Chemistry and Institute of Physics,
Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk;
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

A study was made of changes in CD and UV spectra which accompany the complex formation between human plasma transcortin and cortisol, corticosterone, progesterone, and testosterone. Unresolved CD bands in 290-330 nm region and broad positive bands with maximum at 310-315 nm in UV difference spectra are caused by perturbation of tryptophan $'A-L_a$ electronic transitions. The significant enhancement of the Cotton effect near 255 nm the large negative band at 260 nm in UV difference spectra are indicative of the perturbation of $\pi \rightarrow \pi^*$ transition of the steroid C=C-C=O chromophore. Analysis of the spectral data for transcortin-steroid complexes revealed different local conformational changes near a tryptophan residue belonging to the steroid-binding site. The $\pi \rightarrow \pi^*$ absorption band of the steroid bound to transcortin sharpened significantly, decreased in intensity and underwent a small blue shift. The observed alterations in absorption and optical activity accompanying steroid binding to transcortin suggest strong dipole-dipole interactions in the complex. The interaction of transcortin with steroids seems to be strictly specific for each steroid.