



УДК 577.1+547.963

ИССЛЕДОВАНИЕ СТЕРОИДСВЯЗЫВАЮЩЕГО ЦЕНТРА  
ТРАНСКОРТИНА ЧЕЛОВЕКА  
ТРИПТОФАН-СПЕЦИФИЧНЫМИ РЕАГЕНТАМИ

*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*

Взаимодействие 2-окси-5-нитробензилбромида (ОНb-бромид) при pH 7,0 и N-бромсукцинимида при pH 5,2 с чистым транскортином человека приводит к селективной модификации остатков триптофана. При 10–20-кратном избытке ОНb-бромида и эквивалентном соотношении белка и N-бромсукцинимида в реакцию вступают поверхностные группы транскортина, которые не защищены лигандом (кортизолом) от действия модификаторов и не вносят вклад в индуцированные кортизолом эффекты Коттона. При 3-кратном молярном избытке N-бромсукцинимида или 40-кратном избытке ОНb-бромида в реакции участвует менее доступный остаток триптофана, модификация которого сопровождается инактивацией части стероидсвязывающих центров белка и соответствующим уменьшением кругового дихроизма комплекса транскортин–стероид в области электронных переходов индольного хромофора. Связанный белком стероид практически полностью ингибирует реакции алкилирования и окисления этого остатка. Дальнейшее увеличение концентрации N-бромсукцинимида и ОНb-бромида приводит к существенной инактивации белка вследствие модификации остатка триптофана третьего типа, по-видимому участвующего в подержании нативной конформации белковой глобулы.

В предыдущих работах [1–6] мы сообщали о результатах исследования стероидсвязывающего центра транскортина человека методами оптической спектроскопии. Гашение триптофановой флуоресценции транскортина при взаимодействии с гормоном [1], эффекты Коттона [2, 5, 6] и дифференциальные сигналы поглощения [3–5], индуцированные стероидом в длинах волн электронных переходов индольного хромофора белка, дали возможность предположить, что остаток триптофана вовлечен во взаимодействие с лигандом.

В данной работе для изучения стероидсвязывающего центра транскортина нами использован метод химической модификации остатков триптофана селективными реагентами 2-окси-5-нитробензилбромидом (ОНb-бромид) и N-бромсукцинимидом.

По данным аминокислотного анализа, транскортин содержит 3 остатка триптофана и 9 остатков тирозина [7]. Известно, что остатки триптофана гликопротеидов частично разрушаются уже в условиях мягкого кислотного гидролиза при отщеплении сахаров [8]. Поэтому на начальном этапе работы для определения суммарного содержания остатков триптофана в транскортине мы применили спектрофотометрический метод [9], позволяющий одновременно определить и содержание тирозина в белке. По на-

шим данным, число остатков триптофана и тирозина на 1 моль белка составляет 4 и 10 соответственно. Сумма коэффициентов экстинкции этих остатков очень близка к известному молярному коэффициенту экстинкции транскортина [7].

В кислых и нейтральных средах ONb-бромид является высокоспецифичным реагентом на остатки триптофана в белках, не содержащих тиольные группы [10]. В нативном транскортине SH-группа не доступна даже для специфических тиольных реагентов [7, 11], и это определило строгую направленность действия ONb-бромида на остатки триптофана. Известно также, что включенная в белок ONb-группа весьма чувствительна к химическому окружению и может быть использована в качестве «репортера» [10].

Модификацию транскортина проводили в натрий-фосфатном буфере (рН 7,0) 10–80-кратными избытками ONb-бромида. Так как использовались довольно большие избытки реагента, то важным моментом эксперимента явилось удаление не вступившего в реакцию модификатора. Для разделения ONb-бромида и модифицированного транскортина мы применили твердофазную адсорбцию. Были подобраны такие условия адсорбции активированным углем, покрытым декстраном, при которых практически полное (98–100%) удаление избытка ONb-бромида сопровождалось лишь незначительной (10–15%) потерей белка.

Концентрацию белка до и после модификации удобно определять спектрофотометрически. Реагент в этом случае следует вносить в растворителе, не поглощающем при 280 нм, например в диоксане. При расчете концентрации модифицированного белка (если требуется большая точность, чем простой учет 10–15% потерь) из общего поглощения, предполагая аддитивность, следует вычесть абсорбцию ONb-бромида при 280 нм. Мы определили  $\epsilon_{280}$  3100 м<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> для ONb-бромида при рН 7,0. Вся процедура модификации транскортина (до 8 проб одновременно) занимала не более 1 ч, включая время протекания реакции и стадию удаления не вступившего в реакцию ONb-бромида.

Использованный в нашем эксперименте транскортин содержал 82% активных стероидсвязывающих участков (флуориметрическое титрование). Частичная инактивация белка объясняется, по-видимому, отсутствием дитиотрепта в буфере [7].

Стероидсвязывающая емкость белка (*n*) падает с возрастанием степени модификации остатков триптофана, причем константа ассоциации ( $K_{асс}$ ) уменьшается при этом незначительно (табл. 1). При небольших избытках ONb-бромида (10–20-кратных) количество модифицированных остатков триптофана практически одинаково для транскортина и комплекса транскортин–стероид и не превышает суммарно 0,5 остатка на 1 моль белка. Очевидно, в этих условиях в первую очередь модификации подвергаются поверхностные остатки триптофана. При использовании 40-кратных мольных избытков реагента число модифицированных групп транскортина резко возрастает и суммарно равно 1,28 остатка на 1 моль белка, тогда как для комплекса транскортин–кортизол – 0,74 остатка на 1 моль белка. Налицо защита остатков триптофана стероидом. Число связывающих центров транскортина составляет 26%, а  $K_{асс}$  практически остается неизменной. В случае комплекса транскортин–кортизол параметры ассоциации практически не изменялись вплоть до 80-кратных избытков ONb-бромида по отношению к белку. Дальнейшее увеличение концентрации реагента увеличивало число модифицированных групп транскортина и комплекса. Относительное уменьшение защитного действия стероида связано, по-видимому, со структурными изменениями в белке, вызванными более глубокой модификацией.

При образовании комплекса транскортин–стероид в спектре КД наблюдается значительное увеличение интенсивности полос в области 290–330 нм. Частично разрешенные полосы в спектре КД природного

Модификация ONb-бромидом транскортина и его комплекса с кортизолом

ONb-бромид/белок, моль/моль	Транскортин			Комплекс транскортин — кортизол		
	$\frac{\text{ONb-белок}}{\text{остаток/моль}}$	$n^*$	$K_{\text{асс}} \cdot 10^{-8}$ , л/моль	$\frac{\text{ONb-белок}}{\text{остаток/моль}}$	$n^*$	$K_{\text{асс}} \cdot 10^{-8}$ , л/моль
0	0,00	1,00	2,0	0,00	1,00	1,3
10	0,31	0,96	2,2	0,33	1,00	1,3
20	0,51	0,93	2,1	0,48	0,94	1,0
40	1,28	0,74	1,9	0,74	0,92	1,2
80	1,62	0,52	0,8	1,38	0,66	0,9

\* Для удобства сравнения экспериментальная величина  $n$  0,82 нативного белка принята за 1.

Таблица 2

Модификация N-бромсукцинимидом транскортина и его комплекса с кортизолом

Реагент/белок, моль/моль	Транскортин			Комплекс транскортин — кортизол		
	$\Delta\text{Trp}^*$ , моль	$n^{**}$	$K_{\text{асс}} \cdot 10^{-8}$ , л/моль	$-\Delta\text{Trp}^*$ , моль	$n^{**}$	$K_{\text{асс}} \cdot 10^{-8}$ , л/моль
0	0,00	1,00	2,0	0,00	1,00	1,3
1	0,31	0,93	1,6	0,26	0,98	1,1
3	0,90	0,59	0,5	0,54	0,92	1,1
8	1,78	0,11	<0,01	1,68	0,18	0,2

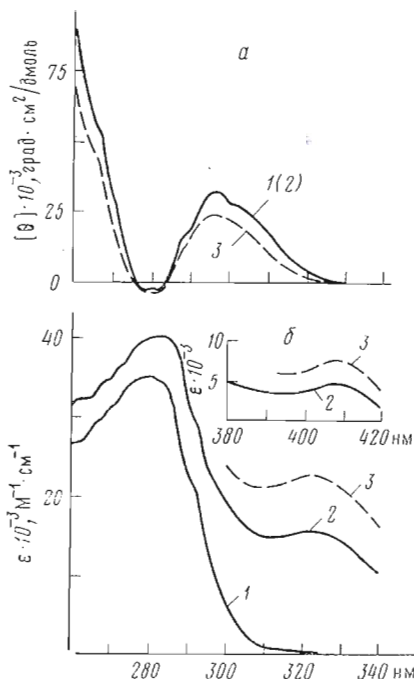
\* Убыль количества остатков триптофана.

\*\* Для удобства сравнения экспериментальная величина  $n$  0,82 нативного белка принята за 1.

эквивалентного комплекса транскортин — кортизол с максимумами при 290, 296 и 305 нм, по-видимому, обусловлены остатками триптофана белка (см. рис. 1, кривая 1) [5]. Характер выявленных в процессе химической модификации закономерностей четко прослеживается в спектрах КД. Так, амплитуда эффектов Коттона в области 290–330 нм для комплекса транскортин — кортизол остается практически неизменной после модификации белка 10–40-кратными избытками ONb-бромида и удаления избытков реагента (и кортизола) адсорбцией на холоду (см. рис. 1, кривые 1 и 2 совпадают). В спектре КД, который регистрировался после прибавления эквивалентного количества кортизола к транскортину, содержащему 1,28 моль связанных ONb-групп на 1 моль белка, тонкая структура в области 290–330 нм полностью исчезает (см. рис. 1, кривая 3). Молекулярная эллиптичность при 305 нм в этом случае падает на 27%. По данным флуориметрического титрования, модификация приводит к потере 26% участков связывания (см. табл. 1). По всей вероятности, это не простое совпадение цифр, и можно считать, что такая доля молекул транскортина становится неактивной вследствие модификации остатка триптофана, принадлежащего стероидсвязывающему центру транскортина. Другая часть молекул белка содержится в активном центре незатронутый остаток триптофана и имеет высокую  $K_{\text{асс}}$  со стероидом (см. табл. 1).

Соответствующие спектрам КД спектры поглощения эквивалентного комплекса транскортин — кортизол до и после модификации (кривые 1 и 2) и комплекса, полученного добавлением кортизола к модифицирован-

Рис. 1. Спектры КД (а) и УФ-поглощения (б) комплексов транскортина — кортизол при модификации ONb-бромидом. Комплексы получали прибавлением к белку после модификации эквимольного количества кортизола (1, 3) или удалением избытка стероида, добавленного перед модификацией для защиты остатков триптофана (2). Были взяты следующие количества реагента (на 1 моль белка): 0,10 или 20 моль ONb-бромида (1), 5 моль кортизола + 40 моль ONb-бромида (2), 40 моль ONb-бромида (3)



ному транскортину (кривая 3), различаются по интенсивности абсорбционных полос при 320 и 410 нм. Эти сигналы обусловлены недиссоциированной формой ONb-группы и фенокси-ионом соответственно. Большая амплитуда полос соответствует большей степени модификации нативного транскортина по сравнению с его модификацией в комплексе со стероидом.

Поглощение ONb-транскортина при 320 нм выше, чем абсорбция модифицированного белка при 410 нм. В спектре 2-окси-5-нитробензилового спирта, растворенного в натрий-фосфатном буфере (рН 7,0), наоборот, поглощение при 410 нм выше, чем при 320 нм. Очевидно, в белке ONb-группы мало диссоциированы.

N-Бромсукцинимид является менее селективным реагентом, чем ONb-бромид, но при кислых рН и небольших избытках он преимущественно атакует остатки триптофана, превращая их главным образом в производные оксиндола [12].

Реакцию транскортина с N-бромсукцинимидом проводили в натрий-ацетатном буфере (рН 5,2), используя 1–8-кратные избытки реагента по отношению к белку. Кратковременное выдерживание нативного транскортина при рН 5,2 с последующим установлением рН 7,4 не приводило к его инаktivации. Использование кислых рН обеспечило модификацию только остатков триптофана даже при 8-кратном мольном избытке N-бромсукцинимида. Об этом можно было судить по аминокислотному анализу белка до и после модификации: содержание цистеина, метионина, тирозина и гистидина в окисленном транскортине не изменялось по сравнению с нативным белком. Для контроля за степенью модификации транскортина мы использовали спектрофотометрический метод количественного определения остатков триптофана белка в 6 М растворе гуанидин-хлоридрата. [9].

Перед спектрофотометрированием необходимо удалять избыток N-бромсукцинимида, чтобы предупредить возможное окисление дополнительных групп белка в денатурирующих условиях.

Для этой цели мы вновь применили активированный уголь, покрытый декстраном. Поскольку концентрация N-бромсукцинимида в реакцион-

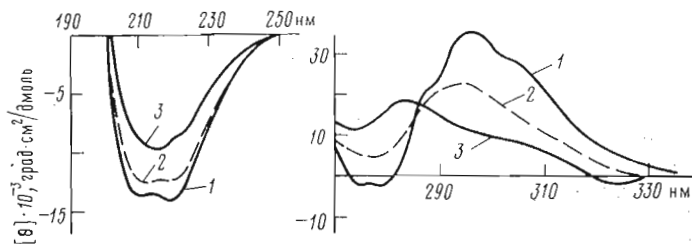


Рис. 2. Спектры КД комплексов транскортина — кортизол при модификации N-бромсукцинимидом. Комплексы получали прибавлением к белку после модификации эквимольного количества кортизола (1—3) или удалением избытка стероида, добавленного перед модификацией для защиты остатков триптофана (1). Были взяты следующие количества реагента (на 1 моль белка): 0—1 моль N-бромсукцинимида или 5 моль кортизола + 3 моль N-бромсукцинимида (1), 3 моль N-бромсукцинимида (2), 8 моль N-бромсукцинимида (3)

ной смеси не превышала  $10^{-5}$ — $10^{-4}$  М, избыток реагента удаляли на 98—100% (судя по  $D_{220}$ ) в 10 раз меньшими количествами угля, чем в случае ONb-бромида. Потери белка за счет адсорбции были исчезающе малы.

Как видно из табл. 2, модификация транскортина N-бромсукцинимидом в общих чертах напоминает взаимодействие белка с ONb-бромидом. Уже при эквимольном белку количестве реагента число модифицированных групп составляет суммарно 0,31 остатка на 1 моль транскортина, причем в присутствии 5-кратного мольного избытка кортизола степень модификации не снижается. При 3-кратном избытке N-бромсукцинимида имеет место значительное увеличение числа модифицированных остатков триптофана в белке и отставание в степени модификации комплекса транскортина — кортизол. Число связывающих центров транскортина заметно уменьшается по мере модификации, тогда как изменения  $K_{асс}$  выражены слабо. Параметры  $n$  и  $K_{асс}$  комплекса транскортина — кортизол оставались практически неизменными вплоть до 8-кратных избытков N-бромсукцинимида. Таким образом, связанный белком стероид защищает часть остатков триптофана от окисления. При 8-кратных избытках реагента степень модификации не превышает суммарно 1,78 остатка триптофана на 1 моль белка, но окисленный транскортин практически теряет способность связывать кортизол.

Спектры КД комплекса транскортина — кортизол до и после модификации 3-кратным избытком реагента полностью совпадают (рис. 2, кривая 1). Модификация транскортина в тех же условиях (с последующим добавлением кортизола до эквимольного соотношения) приводит к изменениям спектра в области амидного (200—240 нм) и ароматических (290—330 нм) хромофоров (кривая 2). Уменьшение эллиптичности, характеризующей степень упорядоченности вторичной структуры белка (область 200—240 нм), вызвано, по-видимому, инактивацией части стероидсвязывающих центров транскортина. Эта часть молекул белка потеряла возможность стабилизировать свою структуру связыванием стероида [2]. В длинноволновой области спектра уменьшение величины  $[\theta]_{305}$  на 47% (см. рис. 2, кривая 2) соответствует инактивации 41% молекул транскортина (см. табл. 2). После обработки комплекса транскортина с кортизолом 8-кратным избытком N-бромсукцинимида общая упорядоченность глобулы резко уменьшается (см. рис. 2, кривая 3). Это свидетельствует, по-видимому, о том, что отдельные остатки триптофана играют важную роль в поддержании нативной структуры белковой глобулы.

Таким образом, характер изменений спектров КД транскортина отражает, как и в случае взаимодействия белка ONb-бромидом, химические изменения остатков триптофана и уменьшение числа связывающих центров. Из анализа этих спектров следует, что защитное действие кортизола

обусловлено его непосредственным контактом с остатком триптофана, а не конформационными изменениями транскортина, вызванными стероидом.

В отсутствие лиганда этот остаток реагирует как с ONb-бромидом, так и с N-бромсукцинимидом, что приводит к инаktivации связывающего центра. Объемистая ONb-группа, введенная в молекулу транскортина, может стерически ингибировать связывание стероида даже в том случае, если модифицированный остаток триптофана находится не в самом связывающем центре, а вблизи него. В реакции с N-бромсукцинимидом индольное ядро приобретает оксигруппу и атом брома [12]. Эффективный объем боковой цепи модифицированного остатка триптофана при этом увеличивается незначительно. Следовательно, можно сделать вывод, что снижение транскортином способности связывать кортизол после модификации белка ONb-бромидом и N-бромсукцинимидом обусловлена главным образом модификацией индольного ядра остатка триптофана.

Представленные аргументы позволяют предположить, что по крайней мере один остаток триптофана белка принимает непосредственное участие в связывании стероидных гормонов.

### Экспериментальная часть

Гомогенный транскортин, не содержащий стероид, получали из сыворотки ретроплацентарной крови человека методом аффинной хроматографии [7, 13] и использовали в работе в тот же день. Буферные растворы приготавливали из солей марки х. ч., используя дважды перегнанную в стеклянной аппаратуре деионизованную воду. Концентрацию белка измеряли спектрофотометрически, используя известный коэффициент экстинкции  $E_{283}^{1\%}$  6,9 [7].

Контроль за количеством связанного лиганда осуществляли радиометрически, используя изотопное разбавление холодного кортизола [ $1,2\text{-}^3\text{H}_2$ ]кортизолом (Amersham, Великобритания) с удельной радиоактивностью 42 Ки/ммоль.  $K_{\text{асс}}$  транскортина с кортизолом (Koch Light, Великобритания) определяли методами флуориметрического титрования [14], если исследовался белок без стероида, или равновесного диализа [15], когда имели дело с комплексом транскортина — кортизол. В последнем случае избыток стероида удаляли на холоду твердофазной адсорбцией вместе с избытком модифицирующего реагента.

*Спектральные измерения.* УФ-поглощение исследуемых растворов измеряли на спектрофотометре VSU 2P (Carl Zeiss, ГДР), адсорбционные спектры записывали на приборе «Specord UV VIS» (Carl Zeiss, ГДР), спектры КД регистрировали на спектрополяриметре J-20 (Jasko, Япония). Для участка спектра, соответствующего амидному хромофору (область 200—240 нм), молекулярную эллиптичность  $[\theta]$  рассчитывали по концентрации аминокислотных остатков. В расчетах использовали усредненный молекулярный вес остатка, равный 115, и вес полипептидной части, составляющий 78% от веса гликопротеида. В области 290—330 нм  $[\theta]$  определяли по молярной концентрации белка или комплекса. Флуоресцентные измерения проводили в спектрофлуориметре «Fica 55» (Франция) при  $23 \pm 1^\circ$ . Флуоресценцию возбуждали при 280 нм и регистрировали при 337 нм.

Для определения суммарного содержания триптофана в транскортине 54 мкМ раствор белка в 0,02 М натрий-фосфатном буфере, pH 6,5, разбавляли в соотношении 1:3 раствором 8 М гуанидинхлоридрата в 0,02 М натрий-фосфатном буфере (pH 6,5), выдерживали при  $20^\circ\text{C}$  в течение 2 ч и измеряли поглощение белкового раствора при 280 и 288 нм. В последующих расчетах использовали следующие молярные коэффициенты экстинкции остатков ароматических аминокислот в белках: для Trp —  $\epsilon_{280}$  5690,  $\epsilon_{288}$  4815, для Trp —  $\epsilon_{280}$  1280,  $\epsilon_{288}$  385  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [9]. Принимая молекулярный вес транскортина равным 49 500 [16], получили, что молекула белка содержит 4,15 (округленно 4) остатка Trp.

Для определения содержания тирозина тот же раствор белка в 6 М гуанидинхлориде довели до pH 12,5 и измеряли приращение поглощения  $\Delta D_{295}$  и  $\Delta D_{300}$ . Далее, используя значения  $\Delta \epsilon_{295}$  2480 и  $\Delta \epsilon_{300}$  2270  $M^{-1}cm^{-1}$  [9], получили после усреднения 9,8 (округленно 10) остатков Туг на молекулу белка.

Поскольку транскортин не содержит остатков цистеина [7], а вклад остатков фенилаланина в поглощение белка при 280 нм исчезающе мал, то коэффициент экстинкции нативного транскортина  $\epsilon_{280}$  34 155  $M^{-1}cm^{-1}$  должен практически полностью определяться суммарным поглощением всех остатков Тгр и Туг. Сумма молярных коэффициентов экстинкции 4 остатков Тгр и 10 остатков Туг (35 560  $M^{-1}cm^{-1}$ ) ближе к экспериментальной величине 34 155  $M^{-1}cm^{-1}$ , чем сумма молярных коэффициентов экстинкции 3 остатков Тгр и 9 остатков Туг [7] (28 590  $M^{-1}cm^{-1}$ ).

*Модификация транскортина и его комплекса с кортизолом ONb-бромидом.* В работе использовали 0,2 М раствор ONb-бромида (Sigma, Великобритания) в диоксане, высушенном над металлическим натрием, и 0,2 М раствор метионина (Calbiochem, США) в воде. Реакцию модификации проводили по методу [10] в темноте при 20°С в стеклянных пробирках, содержимое которых перемешивалось миниатюрными якорьками на магнитной мешалке. К 2 мл 15 мкМ раствора транскортина или его комплекса с кортизолом в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,0) с помощью микрошприца последовательно добавляли равные молярные количества метионина и ONb-бромида, создавая необходимый избыток реагентов по отношению к транскортину. В отдельных опытах последовательность добавления: 5 моль кортизола (на 1 моль белка), затем метионин и ONb-бромид. Спустя 30 мин к реакционной смеси (при 20°С или на холоду) добавляли 0,2 мл 10% суспензии активированного угля «Norit А» (Serva, ФРГ) в 2% растворе декстрана ( $M$  80 000, Fluka, Швейцария). Суспензию перемешивали 20 мин (при 20°С или в ледяной бане) и затем центрифугировали при 10 000 g. Супернатант довели до pH 11,0 и спектрофотометрировали при 410 нм. Концентрацию включенных в белок ONb-групп рассчитывали, исходя из известного коэффициента экстинкции  $\epsilon_{410}$  18 450  $M^{-1}cm^{-1}$  [17].

*Модификация транскортина и его комплекса с кортизолом N-бромсукцинимидом.* В опытах использовали свежеприготовленный 0,04 М водный раствор N-бромсукцинимиды (Serva, ФРГ), перекристаллизованного из воды. К 2 мл 20 мкМ раствора транскортина или его комплекса с кортизолом в 0,05 М натрий-ацетатном буфере (pH 5,2) с помощью микрошприца добавляли окислитель, создавая необходимый избыток N-бромсукцинимиды по отношению к транскортину. В отдельных опытах сначала добавляли 5 моль кортизола (на 1 моль белка), затем N-бромсукцинимид. Реакция протекала в темноте при 20°С в течение 5 мин [12]. Затем к реакционной смеси (при 20°С или на холоду) добавляли 0,2 мл 1% суспензии активированного угля в 0,2% растворе декстрана. Суспензию перемешивали 10 мин и отделяли уголь центрифугированием. В аликвоту супернатанта вносили твердый гуанидинхлорид до 6 М концентрации и с учетом изменения объема пробы спектрофотометрически определяли содержание триптофана, как описано выше. Стероидсвязывающие параметры белка и комплекса измеряли после доведения pH белкового раствора (не содержащего гуанидинхлоридата) до pH 7,4.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ахрем А. А., Аввакумов Г. В., Кукушкина И. И., Прищепов А. С., Свиридов О. В., Стрельченко О. А. Триптофан в стероидсвязывающем центре транскортина.— Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 3, с. 421—423.
2. Ахрем А. А., Свиридов О. В., Стрельченко О. А. Обратимые конформационные изменения компонентов комплекса транскортин—стероид.— Докл. АН СССР, 1978, т. 241, № 5, с. 1207—1209.
3. Ахрем А. А., Свиридов О. В., Стрельченко О. А. О природе стероидсвязывающего центра транскортина человека.— Докл. АН СССР, 1978, т. 242, № 5, с. 1212—1214.
4. Akhrem A. A., Dshko T. N., Sviridov O. V., Strel'chyonok O. A. The study of hu-

- man transcortin-steroid interaction by circular dichroism, fluorescence and ultraviolet difference spectroscopy.— IUPAC 11 the Int. Symp. on Chemistry of Natural Products, Symp. Papers, 1978, v. 2, p. 486—487.
5. *Ахрем А. А., Свиридов О. В., Стрельченко О. А., Прищепов А. С., Дешко Т. Н.* Специфические взаимодействия в комплексе транскортина — стероид.— Биоорганической химии, 1979, т. 5, № 5, с. 711—720.
  6. *Ахрем А. А., Гарбуз Н. И., Янковская Г. С., Свиридов О. В., Стрельченко О. А.* Изменения в спектрах поглощения и кругового дихроизма стероидов при взаимодействии с транскортином человека.— Изв. АН БССР. Сер. хим. н., 1979, № 3, с. 77—82.
  7. *Ахрем А. А., Авакумов Г. В., Вашкевич И. И., Свиридов О. В., Стрельченко О. А.* Характеристика белков плазмы ретроплацентарной крови человека, выделенных биоспецифической хроматографией на иммобилизованном кортизоле.— Биохимия, 1979, т. 44, № 1, с. 142—153.
  8. *Козловский В. С., Разживин А. П., Баратова Л. А., Борисов А. Ю.* Флуоресцентное определение числа триптофановых остатков в молекуле белка.— В кн.: Физико-химические методы молекулярной биологии. М.: Изд-во МГУ, 1978, с. 127—145.
  9. *Edelhoch H.* Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins.— Biochemistry, 1967, v. 6, № 7, p. 1948—1954.
  10. *Horton H. R., Koshland D. E., Jr.* A highly reactive colored reagent with selectivity for the tryptophan residue in proteins: 2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromide.— J. Amer. Chem. Soc., 1965, v. 87, № 5, p. 1126—1132.
  11. *Gaillard F., Dautrevaux M.* The accessible cysteine residue of human transcortin. Evidence for oxidation of the sulphhydryl group.— FEBS Lett., 1978, v. 94, № 1, p. 63—67.
  12. *Spande T. E., Witkop B.* Determination of the tryptophan content of proteins with N-bromosuccinimide.— In: Methods in Enzymology. New York: Academic Press, 1967, v. 11, p. 498—506.
  13. *Ахрем А. А., Авакумов Г. В., Кужушкина И. И., Свиридов О. В., Стрельченко О. А., Сурвило Л. И., Чащин В. Л.* Выделение транскортина из сыворотки ретроплацентарной крови человека методом аффинной хроматографии.— Изв. АН БССР. Сер. хим. н., 1977, № 6, с. 111—115.
  14. *Ахрем А. А., Свиридов О. В., Стрельченко О. А.* Термодинамические характеристики связывания  $\Delta^4$ -3-кетостероидов транскортином человека.— Биоорганической химии, 1978, т. 4, № 9, с. 1275—1277.
  15. *Westphal U.* Assay and properties of corticosteroid-binding globulin and other steroid-binding serum proteins.— In: Methods in Enzymology. New York: Academic Press, v. 15, p. 761—796.
  16. *Gaillard F., Han K.-K., Dautrevaux M.* Caractérisation et propriétés physico-chimiques de la transcortine humaine.— Biochimie, 1975, v. 57, № 5, p. 559—568.
  17. *London G. M., Koshland D. E., Jr.* The chemistry of a reporter group: 2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromide.— J. Biol. Chem., 1970, v. 245, № 9, p. 2247—2254.

Поступила в редакцию  
5.V.1980  
После доработки  
10.X.1980

#### STUDY OF STEROID-BINDING SITE IN HUMAN TRANSCORTIN USING TRYPTOPHAN-SPECIFIC REAGENTS

AKHREM A. A., SVIRIDOV O. V., STREL'CHYONOK O. A.,  
PRISHCHEPOV A. S.

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

2-Hydroxy-5-nitrobenzyl bromide (HNBB) at pH 7,0 and N-bromosuccinimide (NBS) at pH 5,2 selectively modify tryptophan residues in pure human transcortin. At 10-20-fold molar excess of HNBB and at equimolar protein/NBS ratio, exposed groups of transcortin are subject to reaction. These tryptophan residues are neither protected by the ligand (cortisol) from the action of the reagents, nor contribute to the Cotton effects induced by cortisol binding to transcortin. Treatment of the protein by 3-fold molar excess of NBS or 40-fold excess of HNBB gives rise to modification of a less accessible tryptophan residue with concomitant inactivation of the part of steroid-binding sites and corresponding decrease of circular dichroism in the region of electronic transitions of indole chromophore. The protein-bound steroid almost completely inhibits alkylation and oxidation of this residue. Further increase in NBS and HNBB concentrations cause an essential inactivation of transcortin due to modification of the tryptophan residue of another type which seems to take part in maintaining the native conformation of the protein.