



УДК 577.1 + 547.963.04 + 535.37

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СВЯЗЫВАНИЯ
 Δ^4 -3-КЕТОСТЕРОИДОВ ТРАНСКОРТИНОМ ЧЕЛОВЕКА

Ахрем А. А., Свиридов О. В., Стрельченко О. А.

Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск

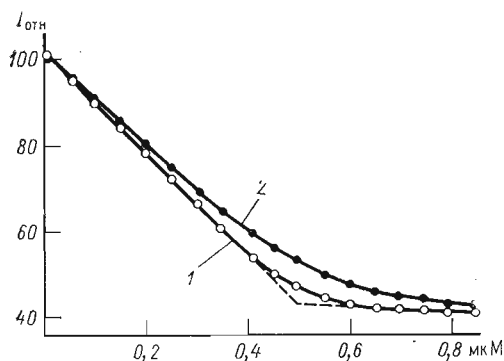
Транскортин является специфическим гликопротеином плазмы крови человека и позвоночных [1]. Этот белок с высоким сродством связывает кортикостероидные гормоны и прогестерон. Выделение гомогенного транскортина человека, свободного от природного лиганда, позволило нам [2] применить флуоресцентную спектроскопию при изучении стероидсвязывающего центра белка.

Тушение белковой флуоресценции при титровании транскортина Δ^4 -3-кетостероидами использовано нами в данной работе для определения концентрации связывающих центров белка в растворе и термодинамических характеристик комплексообразования.

Транскортин выделяли из плазмы ретроплацентарной крови человека аффинной хроматографией [3], связанный белком кортизол удаляли, как описано ранее [2]. В работе использовали кортизол, 11-дезоксикортизол, 11-эпикортизол, кортикостерон, прогестерон и тестостерон (Germed, ГДР). Все остальные реагенты были степени чистоты х. ч. (Союзреактив, СССР), воду дважды перегоняли в стеклянной аппаратуре. Измерение флуоресценции проводили на спектрофлуориметре Fica 55 (Франция) в термостатируемых при 4, 23 и 37° кварцевых кюветах. Для предотвращения запотевания стенок кювета постоянно обдувалась сухим аргоном. Флуоресценцию белка возбуждали при 280 нм и регистрировали при 337 нм. Все растворы транскортина были приготовлены в 0,05 М натрий-фосфатном буфере (рН 7,4), 10^{-3} М по дитиотреиту. Поглощение растворов белка при 280 нм было ниже 0,03. Титрование выполняли добавлением аликвот (1 мкл) раствора стероида ($1 \cdot 10^{-4}$ М) в 50% этаноле к 2 мл раствора белка. Такие же аликвоты 50% этанола вносили в кювету сравнения. В точке эквивалентности концентрация спирта не превышала 0,3%.

На рисунке представлены кривые тушения флуоресценции транскортина при титровании его прогестероном и тестостероном, гормонами, имеющими разное сродство к белку. Линейный участок кривой, соответствующий начальному уменьшению флуоресценции, экстраполировали к базовой линии и определяли концентрацию связывающих центров. Константы ассоциации (K_{ac}) рассчитывали по кривым тушения согласно работе [4].

Для оценки воспроизводимости метода и точности определения параметров связывания проводили пять титрований прогестероном при определенной температуре в течение дня. Десять серий титрований проводили



Титрование транскортина прогестероном (1) и тестостероном (2). Регистрировали флуоресценцию белка при различных концентрациях стероидов

в течение месяца для одной и той же концентрации белка. Эти эксперименты дали $K_{ac} = (2,0 \pm 0,41) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ при 23° и концентрацию связывающих центров $(4,78 \pm 0,12) \cdot 10^{-7} \text{ M}$ (приведены значения стандартных отклонений).

Методом тушения флуоресценции нами определены K_{ac} транскортина с рядом Δ^4 -3-кетостероидов (таблица). Стандартные отклонения в величинах K_{ac} , определенных при 4, 23 и 37° , не превышали приведенного выше значения для комплекса транскортина — прогестерон.

Ранее [5] мы установили ту же структурную зависимость сродства стероидов к транскортину методом конкурентного равновесного диализа. Однако определенные в данной работе K_{ac} для комплексов транскортина — стероид несколько выше. В этой связи следует отметить, что при спектральной регистрации стероид-белковых взаимодействий не нарушается состояние термодинамического равновесия системы, а само определение может быть проведено в короткий промежуток времени. В этом важное преимущество метода тушения флуоресценции перед традиционными методами — равновесным диализом, гель-фильтрацией, ультрафильтрацией и др.

Возможность быстрой регистрации связывания позволила проводить титрования при всех температурах с необходимым числом повторений в один день и использовать белок, выделенный в день эксперимента. Последнее особенно важно, поскольку транскортин, лишенный эндогенного стероида, при хранении инактивируется.

Из данных таблицы следует, что изменение свободной энергии при связывании стероида транскортином обусловлено главным образом изменением энтальпии. Общая упорядоченность системы при комплексообразовании возрастает.

Термодинамические параметры комплексообразования транскортина человека с Δ^4 -3-кетостероидами

Стероид	$K_{ac} \cdot 10^{-8}, \text{ M}^{-1}$			$\Delta G, \text{ ккал/моль}$			$\Delta H, \text{ ккал/моль}$	$\Delta S, \text{ кал/град.моль}$
	4°	23°	37°	4°	23°	37°		
Прогестерон	11,0	2,0	0,5	-11,4	-11,2	-10,9	-16,0	-16,6
11-Дезокс皮质醇	10,0	1,9	0,5	-11,4	-11,1	-10,9	-15,5	-14,8
Дезокс皮质酮	8,7	2,1	0,6	-11,3	-11,2	-11,1	-13,5	-7,9
Кортикостерон	7,8	1,8	0,5	-11,3	-11,1	-10,9	-14,2	-10,5
Кортизол	6,3	1,5	0,4	-11,2	-11,0	-10,8	-14,0	-10,1
11-Эпикортизол	3,0	0,7	0,2	-10,7	-10,5	-10,4	-14,0	-11,9
Тестостерон	2,2	0,4	0,1	-10,6	-10,2	-9,9	-16,0	-19,5

ЛИТЕРАТУРА

1. Westphal U. (1974) Steroid-Protein Interactions, pp. 164—236, Springer-Verlag, New York.
2. Ахрем А. А., Аввакумов Г. В., Кукушкина И. И., Прищепов А. С., Свиридов О. В., Стрельченко О. А. (1978) Биоорг. химия, 4, 421—423.
3. 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.
4. Attallah N. A., Lata G. F. (1968) Biochim. et biophys. acta, 168, 321—333.
5. Ахрем А. А., Аввакумов Г. В., Кукушкина И. И., Свиридов О. В., Стрельченко О. А., Чащин В. Л. (1978) Изв. АН БССР. Сер. хим. н., № 2, 122—125.

Поступило в редакцию
17.IV.1978

THERMODYNAMIC CHARACTERISTICS OF Δ^4 -3-KETO STEROID BINDING TO HUMAN TRANSCORTIN

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

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

The association constants (K_{as}) of human transcortin with seven Δ^4 -3-keto steroids have been measured by means of fluorescence quenching titration at 4°, 23° and 37° C. The observed temperature dependences of K_{as} were characteristic of specific binding. From the data obtained the thermodynamic parameters (ΔG , ΔH and ΔS) were calculated.
