

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.152.3.

©Коллектив авторов

### ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТРИПСИНА С СОЕВЫМ ИНГИБИТОРОМ ТРИПСИНА С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ОПТИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА

*Н.И. Раченкова, Ю.Д. Иванов, А.А. Мольнар, А.И. Арчаков*

ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН.  
119121, Москва, Погодинская ул. 10; факс: (495) 245-0857;  
эл. почта: Yurii.Ivanov@ibmc.msk.ru

С помощью оптического биосенсора исследовано образование и распад комплекса трипсина (Т) с соевым ингибитором трипсина (STI). Показано, что аминокислотные группы STI необходимы для образования комплексов Т/STI. Измерены температурные зависимости констант скорости ассоциации, диссоциации и константы равновесия реакции комплексообразования. Установлено, что константа скорости образования ( $k_{on}$ ) комплексов Т/ STI растет с ростом температуры, а константа скорости диссоциации ( $k_{off}$ ) не изменяется. Из полученных температурных зависимостей рассчитаны значения энергии активации реакций образования и распада комплексов, энтальпия ( $\Delta H$ ) и энтропия ( $\Delta S$ ) реакции комплексообразования. Показан решающий вклад энтропийной составляющей в реакцию комплексообразования.

**Ключевые слова:** оптический биосенсор, трипсин, соевый ингибитор трипсина, белок-белковое взаимодействие.

**ВВЕДЕНИЕ.** В настоящее время из семян бобовых выделено большое число ингибиторов трипсина и химотрипсина, многие из которых детально охарактеризованы. Эти ингибиторы разделяют на два семейства родственных белков: семейство ингибиторов трипсина из сои (ингибитора Кунитца, STI) и семейство ингибитора трипсина и химотрипсина из сои (ингибитора Баумана-Бирк ВВ1) [1]. Белок-ингибитор трипсина (STI) был выделен из семян сои и охарактеризован Кунитцем [2]. STI имеет молекулярную массу 21500 Да, молекулярная масса трипсина составляет 24409 Да [3].

Природа взаимодействия трипсин-ингибитор к настоящему времени исследована достаточно подробно. STI имеет две дисульфидные связи, образованные Cys39-Cys86 и Cys136-Cys145. Трипсинсвязывающий центр молекулы STI, в состав которого входит пептидная связь Arg(63)-Ile(64) [4], локализован внутри большой пептидной петли, образованной первым из указанных выше дисульфидных мостиков. В настоящее время установлено, что для существования прочного комплекса фермента с ингибитором не требуется образования ковалентной связи между реагирующими белковыми молекулами. Конформация петли активного центра ингибитора высоко комплементарна поверхности фермента в области его активного центра [5]. Анализ пространственной модели комплекса STI с трипсином показал, что между молекулами фермента и ингибитора образуется 9 водородных связей [6]. В образовании комплекса с ферментом участвуют следующие аминокислотные остатки STI (подчеркнуто): Asn13-Gln192, Ser61-Gly216, Tyr62-Asn97, Arg63-

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТРИПСИНА С СОЕВЫМ ИНГИБИТОРОМ

Asp189, Arg63-Gly193, Arg63-Ser195, Arg63-Ser214, Arg65-His40, His71-His57 [6].

К настоящему времени из литературы известна зависимость константы равновесия ( $K_p$ ) в интервале температур от 10°C до 40°C [7]. Константы равновесия комплекса T/STI, полученные методом изотермальной титрационной калориметрии, составляют  $1 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$  при 25°C [8] и  $1 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}$  при 25°C [9], а  $K_p$ , полученные из кинетических кривых конкурентного ингибирования -  $2 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}$  при 25°C [7], то есть имеются разногласия в величинах  $K_p$  у разных авторов на два порядка. Что касается термодинамических параметров  $\Delta S$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta G$ , то к настоящему времени в литературе имеются следующие данные:  $\Delta S$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta G$  были измерены методом проточной калориметрии и составляли  $\Delta H = 8,6$  ккал/моль,  $\Delta S = 69,8$  кал/(моль·К),  $\Delta G = -12,3$  ккал/моль [8], вычисленные из кривых конкурентного ингибирования [7] эти значения составляли  $\Delta H = 5,9$  ккал/моль,  $\Delta S = 67$  кал/(моль·К). Данные по температурным зависимостям кинетических констант в литературе не встречаются. В то же время, значения этих констант при температуре 25°C составляли:  $k_{on} = 5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  (была определена методом остановленного потока [10]),  $k_{off} = 1,9 \cdot 10^5 \text{ c}^{-1}$  (была определена из кинетических кривых конкурентного ингибирования, используя измеренные значения  $k_{on}$  и  $K_p$  [9]).

Метод оптического биосенсора в последнее время широко используется для изучения белок-белковых взаимодействий [12-19]. Основное преимущество данного метода – анализ в реальном времени межмолекулярных взаимодействий без введения каких-либо меток в анализируемые молекулы и возможность определять одновременно кинетические константы образования и распада комплексов, константу равновесия реакции комплексообразования [20-23].

В данной работе исследовали взаимодействие трипсина с соевым ингибитором трипсина в реальном времени с помощью двухканального оптического биосенсора “резонансное зеркало” (RM-оптического биосенсора) [24], по данным определения температурных зависимостей константы скорости ассоциации, константы скорости диссоциации реакции комплексообразования этих белков. Из них были рассчитаны термодинамические барьеры реакций образования и распада комплексов, энтропия и энтальпия реакции комплексообразования.

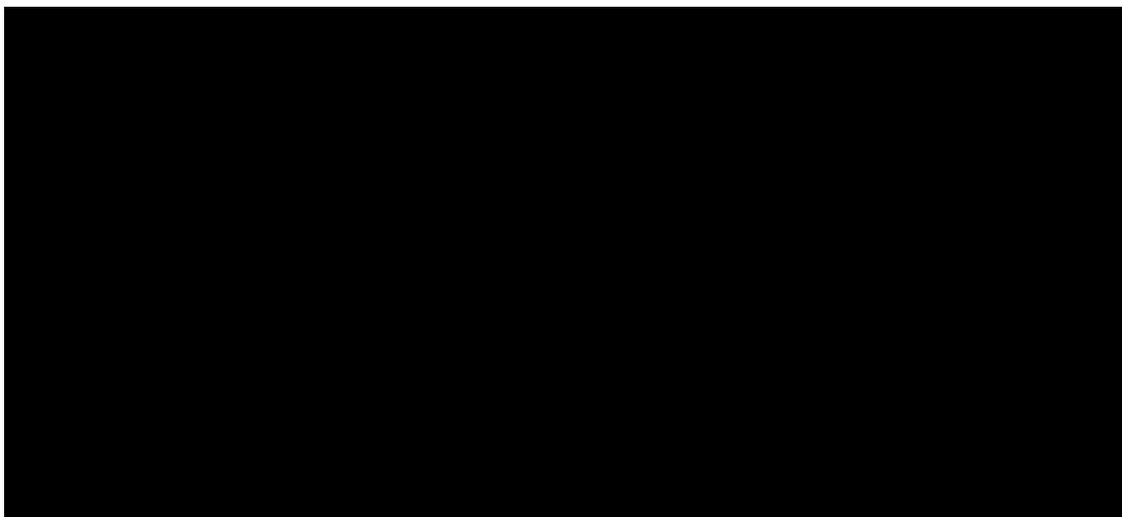
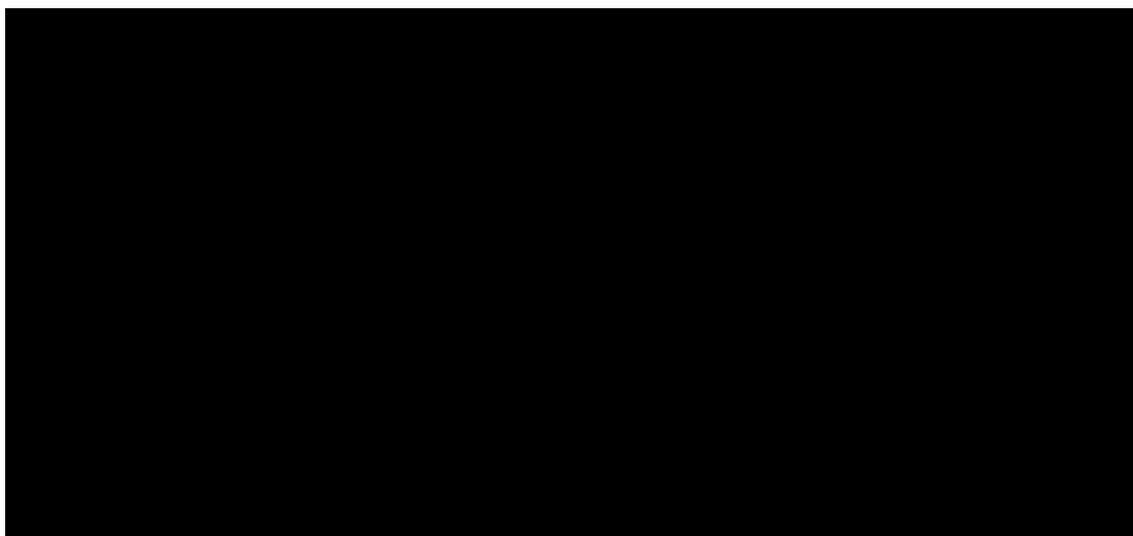
**МЕТОДИКА.** *Прибор.* Двухканальный оптический биосенсор Iasys<sup>+</sup> (“Affinity Sensors”, UK), кюветы с карбоксиметилдекстрановым покрытием (“CM-dextran”).

*Химические реактивы.* 0,4 М 1-этил-3-(3-диметил-аминопропил)карбодимид (EDC), 0,1М N-гидроксисукцинимид (NHS), 1 М этаноламин были получены из фирмы “Affinity sensors”. Использовались также химические реактивы “Реахим” (Москва, Россия).

*Белки.* Трипсин (T – porcine pancreatic trypsin) и соевый ингибитор трипсина (STI – soybean trypsin inhibitor) были приобретены у фирмы “Sigma” (США).

*Определение параметров белкового взаимодействия с помощью оптического биосенсора.* Изучение комплексообразования T/STI проводили с помощью двухканального оптического биосенсора IAsys + “резонансное зеркало” с измерительными кюветами с покрытием CM-dextran. Основные принципы данного метода подробно описаны в литературе [20-23]. Для регистрации реакции комплексообразования один из белков ковалентно иммобилизуется через аминогруппу на CM-dextran подложку кюветы, активированную с помощью EDC и NHS [24], а второй белок добавляется в измерительную кювету. При образовании комплексов меняется показатель преломления в зоне реакции, что регистрируется по измерению положения резонансного угла зондирующего лазерного луча, проходящего через систему призма-волновод измерительной кюветы [20-23]. Для того, чтобы выяснить какую роль в белок-белковом взаимодействии играют положительно заряженные аминогруппы, каждый из белков-партнеров был иммобилизован через их аминогруппы с помощью EDC/NHS на CM-dextran подложке кюветы. Использование такой иммобилизации позволяет альтернативно модифицировать аминогруппы этих белков и выяснить

влияние такой модификации на белок-белковое взаимодействие. Иммунизацию трипсина проводили в течении 10 мин в 20 мМ боратном буфере при pH = 8,5; а соевого ингибитора трипсина - в течении 20 мин в 10 мМ ацетатном буфере при pH = 5,0. После иммунизации белка нековалентно связанный лиганд был удален из кюветы посредством ее промывки буфером PBS/T (10 мМ Na-фосфатный буфер, pH = 7,4, содержащий 138 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 0,05% твин-20) (рис. 1А, 1Б). Непрореагировавшие карбоксильные группы на декстрановой поверхности были заблокированы 1 М этаноламином, pH = 8,5, после чего кювета была промыта PBS/T. Поверхностная концентрация белка ( $I$ , молекул/мм<sup>2</sup>) была рассчитана по формуле  $I = R \cdot 3 \cdot 10^{12} / M_r$ , где  $R$  – показание оптического биосенсора,  $M_r$  – молекулярный вес белка [24]. Поверхностная концентрация иммобилизованного Т ( $T_{im}$ ) составила  $(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^{11}$  молекул/мм<sup>2</sup>, а STI ( $STI_{im}$ ) составила  $(2,6 \pm 0,2) \cdot 10^{11}$  молекул/мм<sup>2</sup>.



**Рисунок 1.**

Сенсограммы иммобилизации белков Т и STI на карбоксиметилдекстрановой подложке двухканального оптического биосенсора IAsys+,  $t = 25^\circ\text{C}$ . Сенсограмма иммобилизации Т (А), иммобилизационный буфер – 20 мМ боратный буфер, pH = 8,5. Сенсограмма иммобилизации STI (Б), иммобилизационный буфер – 10 мМ ацетатный буфер, pH = 5,0; Стрелками указаны добавки: EDS/NHS (0,4 М 1-этил-3-(3-диметил-аминопропил)карбодиимид/0,1 М N-гидроксисукцинимид); PBS/T (2-10мМ калий-фосфатный буфер, содержащий 138 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl и 0,05% твин-20); 1М этаноламина.  $I_{im}$  - количество иммобилизованного белка.  $R$  – величина сигнала биосенсора в относительных единицах.

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТРИПСИНА С СОЕВЫМ ИНГИБИТОРОМ

Контрольный канал модифицировали аналогичным образом, что и рабочий, за исключением того, что в иммобилизационный буфер в контрольном канале не добавляли белковый раствор.

Измерения белок-белковых взаимодействий проводили в диапазоне концентраций добавляемого белка 0,6 – 2,0 мкМ в измерительной кювете, когда концентрация добавляемого белка находилась в избытке. При этих значениях концентраций белка кинетику связывания можно описывать уравнением псевдопервого порядка [24]. Константа скорости ассоциации рассчитывалась из уравнения, аппроксимирующего кривую связывания:

$$R_t = R_0 + \Delta R \{1 - \exp(-(k_{on} C + k_{off}) t)\} \quad (1),$$

где  $R_t$  - сигнал прибора в момент времени  $t$ ,  $R_0$  - сигнал при  $t = 0$ ,  $C$  - концентрация лиганда,  $\Delta R$  - разница между сигналами  $R_\infty$  (при  $t = \infty$ , в равновесном состоянии) и  $R_0$ . Анализ зависимости константы скорости образования комплексов от температуры выполнялся по зависимости начального наклона кривых связывания от температуры. Температурная зависимость взаимодействия T/STI исследовалась в диапазоне температур 15-40°C. Зависимости измеренных констант скорости ассоциации  $k_{on}$  от температуры были аппроксимированы уравнением Аррениуса:

$$k_{on} = A \exp(-\Delta G_{on}^\# / RT) \quad (2),$$

где  $A$  - константа,  $T$  - абсолютная температура (°K),  $\Delta G_{on}^\#$  - энергия активации реакции образования комплексов,  $R$  - газовая постоянная.

Отсюда был вычислен активационный барьер реакции образования комплексов  $\Delta G_{on}^\#$ .

Константу диссоциации рассчитывали по уравнению:

$$R = R_d \exp(-k_{off} \cdot t) \quad (3),$$

где  $R_d$  - разница между величиной сигнала  $R_\infty$  и сигналом в конце диссоциации.

Из соответствующих значений  $k_{off}$  была рассчитана величина энергии активации реакции диссоциации комплексов ( $\Delta G_{off}^\#$ ) с использованием уравнения Эйринга:

$$k_{off} = (k_B T/h) \exp(-\Delta G_{off}^\# / RT) \quad (4),$$

где  $k_B$  - константа Больцмана,  $h$  - постоянная Планка.

Время жизни комплексов определяли как

$$\tau = 1/k_{off} \quad (5),$$

Константу равновесия ( $K_p$ ) вычисляли как

$$K_p = k_{on} / k_{off} \quad (6),$$

Расчет изменения энергии Гиббса ( $\Delta G$ ) для реакции комплексообразования выполняли по уравнению [25]:

$$\Delta G = -RT \ln K_p \quad (7),$$

где  $K_p$  - константа равновесия.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Анализ белок-белкового взаимодействия с помощью оптического биосенсора. Образование комплексов T/STI проводили в 0,05 М ацетатном буфере, содержащем 200 мМ KCl, 50 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH = 5,0. При иммобилизации T наблюдалось образование комплексов T<sub>im</sub>/STI. На рисунке 2 показано несколько циклов образования и распада T/STI комплексов, что указывает на стабильность кюветы оптического биосенсора в этих условиях. Для полной регенерации поверхности кюветы после процесса диссоциации комплексов в рабочем буфере проводили инкубацию T<sub>im</sub>/STI комплексов в 1 мМ HCl. При иммобилизации STI образования комплексов T/STI не наблюдалось (рис.3), в то время как при иммобилизации T комплексы образуются (рис.3). Это означает, что аминокислоты STI важны для образования комплекса на подложке оптического биосенсора. Действительно, по данным рентгеноструктурного анализа, аминокислоты STI: Lys 76, Lys 145, Lys 165, Lys 178 находятся вблизи места связывания с трипсином [3], поэтому иммобилизация STI через эти аминокислоты может блокировать образование комплекса фермент-ингибитор. На

рисунке 3 приведены температурные зависимости кривых связывания  $T_{im}/STI$ . С ростом температуры от 15 до 40°C, наблюдается повышение начального угла наклона кривой связывания, это указывает на рост константы скорости образования комплексов. Из данных таблицы 1, где представлены рассчитанные значения кинетических параметров комплексообразования и рисунка 4А, видно, что наблюдается небольшой рост (примерно в 2 раза) скорости образования комплексов в диапазоне температур 15-40°C. Так как константы  $k_{on}$  растут с увеличением температуры, то это указывает на существование термодинамического барьера на стадии образования комплекса  $T_{im}/STI$ . Рассчитанное из уравнения (3) значение активационного барьера реакции образования комплексов  $\Delta G_{on}^\#$  составляет – 23,2 ккал/моль.

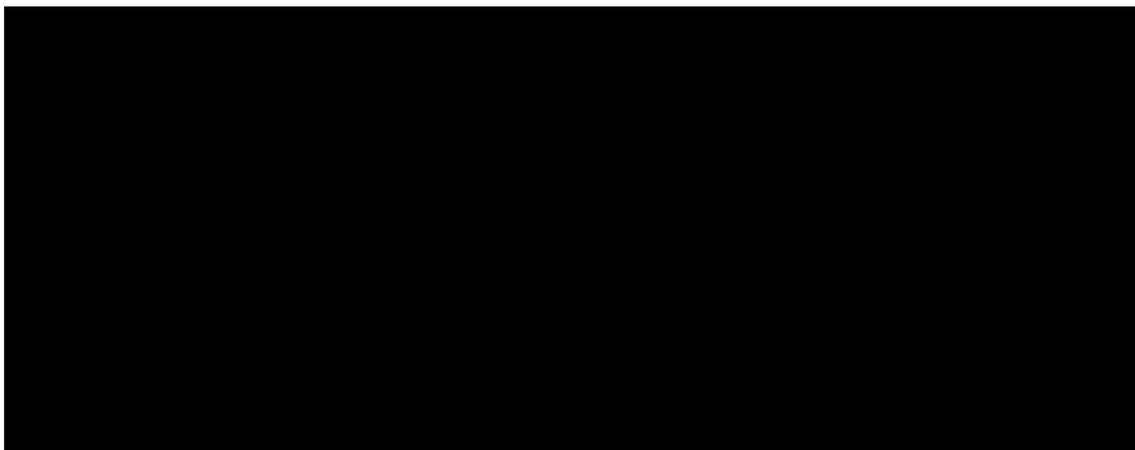


Рисунок 2.

Сенсограмма связывания STI с иммобилизованным T. Экспериментальные условия: рабочий буфер – 0,05 М ацетатный буфер, содержащий 200 мМ KCl, 50 мМ CaCl<sub>2</sub> при t = 25°C, регенерационный буфер - 1 мМ HCl. Стрелками показаны добавки 1 мкМ STI в рабочем буфере, промывка кюветы рабочим буфером, добавка регенерационного буфера.

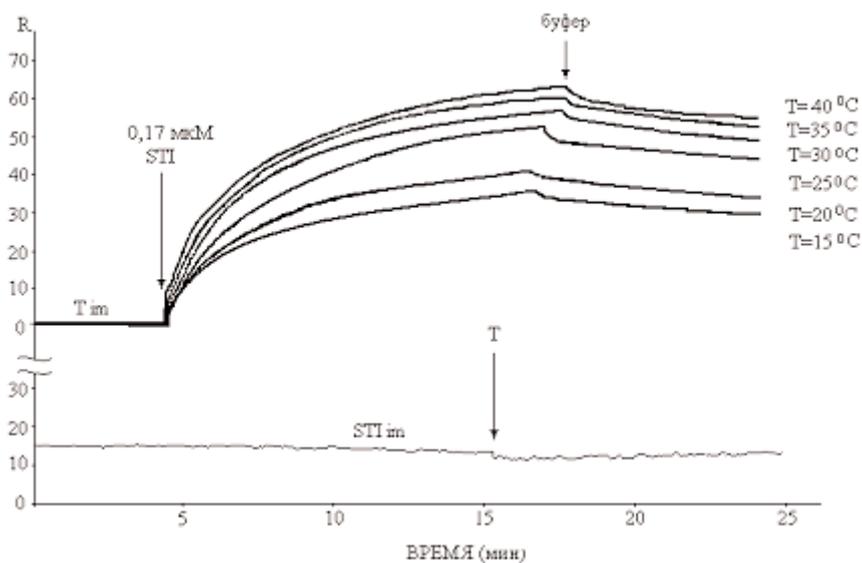


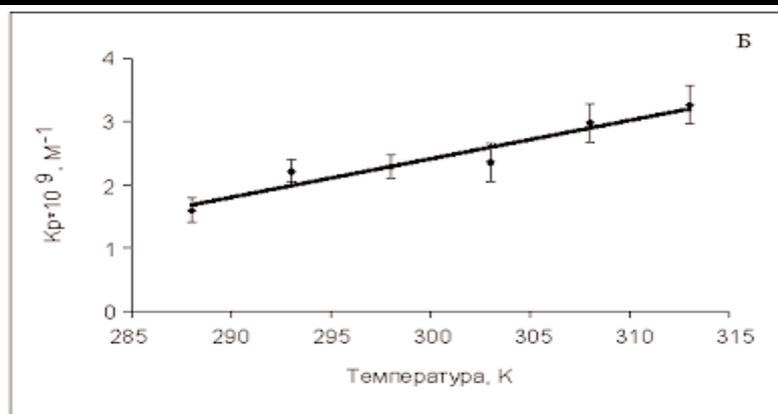
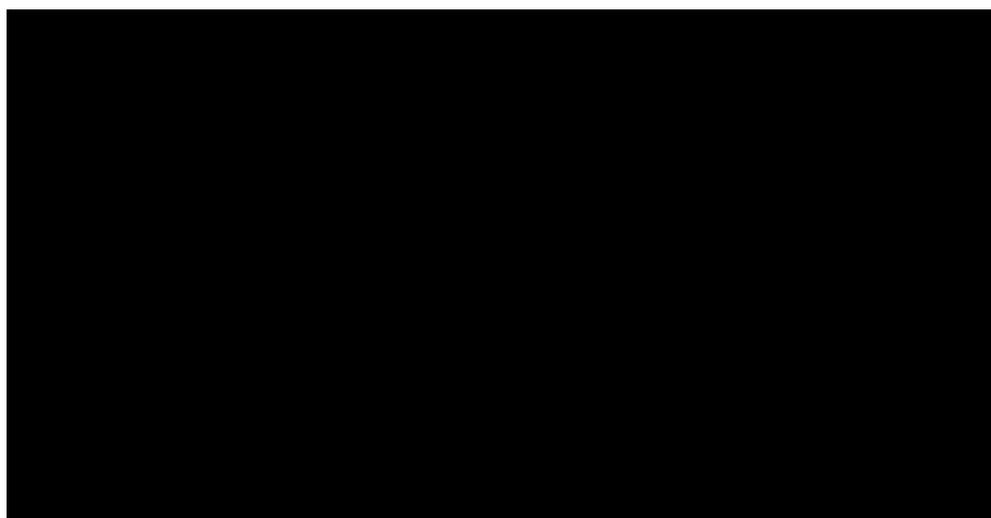
Рисунок 3.

Температурная зависимость реакций образования и распада комплексов  $STI_{im}/T$  и отсутствие взаимодействий для пары  $T_{im}/STI$  в диапазоне температур 15 - 40°C. Среда инкубации содержала 0,05 М ацетатный буфер, содержащий 200 мМ KCl, 50 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH = 5,0. Стрелкой показана добавка T в указанном буфере и смена белкового раствора на буферный раствор.

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТРИПСИНА С СОЕВЫМ ИНГИБИТОРОМ

*Таблица.* Кинетические параметры  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  и константы равновесия реакции комплексообразования  $T_{im}/STI$ . Экспериментальные условия те же, что и на рисунке 2.

| trypsin/<br>soybean<br>tr. inhibitor | $t = 15^\circ$  | $t = 20^\circ$  | $t = 25^\circ$  | $t = 30^\circ$  | $t = 35^\circ$  | $t = 40^\circ$  |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| $k_{on} \cdot 10^9, M^{-1}c^{-1}$    | $1,1 \pm 0,1$   | $1,4 \pm 0,1$   | $1,5 \pm 0,1$   | $1,5 \pm 0,2$   | $1,9 \pm 0,2$   | $2,1 \pm 0,2$   |
| $k_{off} \cdot 10^9, c^{-1}$         | $6,4 \pm 0,2$   |                 |                 |                 |                 |                 |
| $Kp \cdot 10^9, M^{-1}$              | $1,6 \pm 0,1$   | $2,2 \pm 0,1$   | $2,3 \pm 0,1$   | $2,4 \pm 0,2$   | $3,0 \pm 0,2$   | $3,3 \pm 0,2$   |
| $\Delta G, \text{ккал/моль}$         | $-12,1 \pm 0,1$ | $-12,5 \pm 0,1$ | $-12,7 \pm 0,1$ | $-12,9 \pm 0,1$ | $-13,3 \pm 0,1$ | $-13,6 \pm 0,1$ |
| $\Delta H, \text{ккал/моль}$         | $7,7 \pm 0,7$   |                 |                 |                 |                 |                 |
| $\Delta S, \text{кал/моль K}$        | $68,0 \pm 6,0$  |                 |                 |                 |                 |                 |



**Рисунок 4.**

Температурные зависимости константы скорости ассоциации  $k_{on}$  (А) и константы скорости диссоциации  $Kp$  (Б) в системе  $T_{im}/STI$ . Экспериментальные условия те же, что и на рисунке 2.

Константа скорости диссоциации практически не изменяется (табл. 1), константа скорости диссоциации комплексов  $T_{im}/STI$  составляет  $6 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ , что соответствует времени жизни комплексов порядка 4-5 часов. Значение активационного барьера реакции диссоциации  $\Delta G_{off}^{\#}$ , рассчитанное из уравнения (4) составляет  $-22,9$  ккал/моль. Таким образом, имеется активационный барьер как на стадии образования, так и на стадии распада  $T/STI$  комплексов.

Константа равновесия  $K_p$  растет в интервале  $1,6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} - 3,3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$  с ростом температуры от  $15^\circ\text{C}$  до  $40^\circ\text{C}$  (табл. 1, рис. 4Б.).

В таблице 1 представлены значения энергии Гиббса ( $\Delta G$ ) реакции комплексообразования  $T_{im}/STI$ , рассчитанные из уравнения (7). Интервал этих значений составляет от  $-12,1$  до  $-13,6$  ккал/моль.

Отметим, что при  $t=25^\circ\text{C}$  значения  $k_{on} = (1,5 \pm 0,1) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ ,  $k_{off} = (6,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-5} \cdot \text{с}^{-1}$ ,  $K_p = (2,3 \pm 0,1) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ , полученные методом оптического биосенсора, хорошо согласуются со значениями, полученными ранее другими методами [7,10,11]. Температурная зависимость  $\Delta G$  реакции комплексообразования  $T/STI$  (рис.5) удовлетворительно аппроксимируется полиномом первого порядка и ее можно представить выражением

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (8),$$

где  $\Delta H$  и  $\Delta S$  – изменение энтальпии и энтропии.

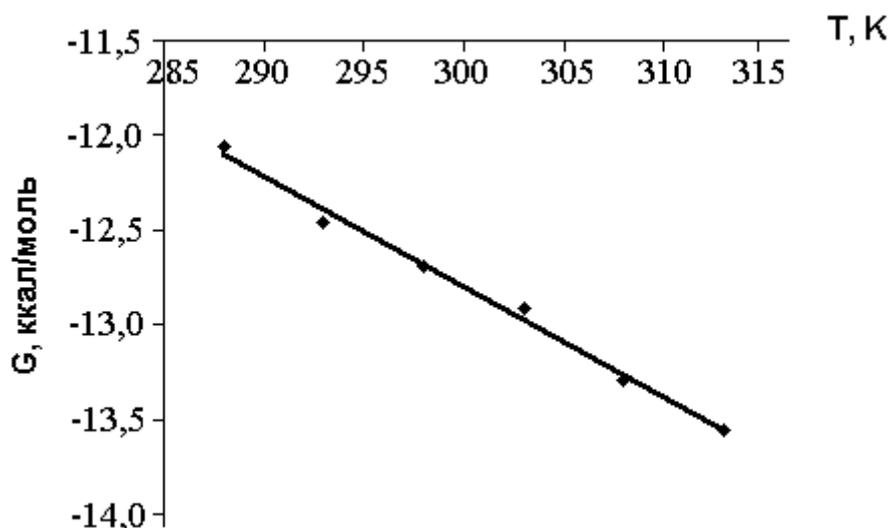


Рисунок 5.

Температурные зависимости энергии Гиббса ( $\Delta G$ ) реакции комплексообразования  $T_{im}/STI$ . Экспериментальные условия те же, что и на рисунке 2.

Из уравнения (8) были определены  $\Delta H$  и  $\Delta S$ , которые составляют  $7,7 \pm 0,7$  ккал/моль и  $68,0 \pm 6,0$  кал/(моль·К) соответственно. Как видно, энтальпийный член положительный, энтропийный ( $-T\Delta S$ ) также положительный. Отсюда, можно сделать вывод, что реакция комплексообразования  $T_{im}/STI$  эндотермическая, а вклад энтропийной составляющей гораздо больше, чем энтальпийной. Это согласуется с данными работы [7], где показано, что  $\Delta H = 8,6$  ккал/моль,  $\Delta S = 69,8$  кал/(моль·К),  $\Delta G = -12,3$  ккал/моль при  $t = 25^\circ\text{C}$ .

Таким образом, было проведено исследование образования и распада комплекса  $T_{im}/STI$  методом оптического биосенсора. Комплексообразование существенно зависит от того, какой из белков иммобилизован на поверхности оптического биосенсора через его аминокислотные группы. В случае иммобилизации  $STI$  комплексообразования не наблюдалось, что указывает на важность аминокислотных групп  $STI$  в реакции комплексообразования. Константа скорости образования комплексов  $T_{im}/STI$  растет с ростом температуры, а диссоциации не изменяется.

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТРИПСИНА С СОЕВЫМ ИНГИБИТОРОМ

Рассчитаны активационные параметры кинетических констант образования и распада комплекса  $T_{im}/STI$  из зависимостей констант скорости ассоциации и диссоциации от температуры. Показан решающий вклад энтропийной составляющей в реакцию комплексообразования.

Данная работа была выполнена при финансовой поддержке гранта “Медицинские диагностические системы будущего”, в рамках работы: “создание нового поколения биоиммуносенсоров и биочипов”, грантов РФФИ № 05-04-48690 и научной школы № 325.2003.4, INTAS № 01-470, также работа была поддержана Janssen Research Foundation, Федеральной целевой программой: Протеомика в медицине и биотехнологии (государственная поддержка протеомных исследований: нанобиотехнология и компьютерное конструирование лекарств, контрактами с Федеральным агентством по науке и инновациям по теме лотов ЖС-13.5/002), ЖС-КП.6/003. В рамках ФЦНТП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники на 2002-2006 годы”, а также грантом 1.2.29 ОАО МКНТ (2005 г.).

### ЛИТЕРАТУРА.

1. *Richardson M.* (1977) *Phytochemistry*, **16**(1), 159-169.
2. *Kunitz M.* (1946) *J. Gen. Physiol.*, **29** (3), 149-154.
3. Protein Data Bank <http://www.rcsb.org/pdb/>
4. *Kortt A.A.* (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, **577**(2), 371-382.
5. *Read R.J., James M.N.G.* (1986) *Proteinase inhibitors*.
6. *Sweet R. M., Wright H.T., Janin J., Chothia C.H., Blow D.M.* (1974) *Biochemistry*, **13**, 4212-4228.
7. *Onesti S, Matthews D.J., Aducci P., Amiconi G., Bolognesi M., Menegatti E., Ascenzi P.* (1992) *J. Mol. Recognit.*, **5**, 105-114.
8. *Baugh R.J. and Trowbridge C.G.* (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**(23), 7498-7501.
9. *Мосолов В.В., Колосова Г.В., Валуева Т.А., Дронова Л.А.,* (1982) *Биохимия*, №5, 797-802.
10. *Song H. K. and Suh Se W.,* (1998,) *J. Mol. Biol.*, **275**, 347-363.
11. *Luthy J. A., Praissman M, Finkelnstadt W.R., Laskowski M.* (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**(5), 1760-1771.
12. *Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Karuzina I.I., Archakov, A.I., Hoa G.H., Sligar S.G.* (2001) *Arch. Biochem. Biophys.*, **391**, 255-264.
13. *Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Gnedenko O.V., Pozdnev V.F., Shumyantseva V.V., Samenkova N.F., Kuznetsova, G.P., Tereza A.M., Schmid R.D., Archakov A.I* (2001) *J. Mol. Recognit.*, **14**, 185-196.
14. *Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Eldarov M.A., Skryabin K.G., Lehnerer M., Schulze J., Hlavica P., Archakov, A.I.* (1997) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **42**, 731-737.
15. *Ivanov Yu.D., Usanov S.A., Archakov A.I.,* (1999) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **47**, 327-336.
16. *Archakov A.I., Ivanov Yu.D.,* (1999) in: *Biophysics of Electron Transfer and Molecular Bioelectronics*, Plenum Publication Corporation, pp. 173-194.
17. *Морозов С.Г., Иванов. Ю.Д., Учайкин В.Ф., Каракас Н.В., Вахрушина С.В., Гнеденко О.В., Конев В.А., Ковалев О.Б., Арчаков А.И.* (1999) *Новости Науки и Техники. Серия Медицина. Аллергия, астма и клиническая иммунология*, **9**, 187-189.
18. *Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Archakov A.I.* (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **273**, 750-752.
19. *Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Kuznetsov V.Yu., Lehnerer M., Schulze J., Hlavica P., and Archakov, A.I.* (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* **362**, 87-93.
20. *Johnsson U., Fagerstam L., Ivarsson B., Johnsson B., Karlsson R., Lundh K., Lofas S., Persson B., Roos H., Ronnberg I., Sjolander S., Stenberg E., Stahlberg R., Urbansitzky C., Ostlin H., and Malmqvist M.* (1991) *BioTechniques* **11**, 620-627.

21. *Cush R., Cronin J.M., Stewart W.J., Maule C.H., Molloy J., Goddard N.J.* (1993) *Biosensor and Bioelectronics* **8**, 347-353.
22. *Davies R.J., Edwards P.R., Watts H., Lowe C.R., Buckle P.E., Yeung D., Kinning T.M., and Pollard- Knight D.V.* (1994) in *Techniques in Protein Chemistry V*, Academic Press, Inc, pp. 285-292.
23. *Yeung D., Gill A., Maule C.H., and Davies R.J.* (1995) *Trends Analyt. Chem.* **14**, 49-56.
24. IAsys manual (1993)
25. *Д. Мецлер* (1980) *Биохимия*, **1**, Мир, М.

Поступила: 29. 03. 2005

#### OPTICAL BIOSENSOR STUDY OF INTERACTION BETWEEN TRYPSIN AND TRYPSIN INHIBITOR

*N.I. Rachenkova, Yu.D. Ivanov, A.A. Molnar, A.I. Archakov*

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences,  
Pogodinskaya st. 10, Moscow, 119121 Russia; fax: (495)245-0857;  
e-mail: Yuri.Ivanov@ibmc.msk.ru

The formation of complexes between trypsin (T) and soybean trypsin inhibitor (STI) was analyzed, using a two-channel IAsys<sup>+</sup> optical biosensor.

The temperature dependence of complex formation (with its major parameters - the association rate constants ( $k_{on}$ ), the dissociation rate constants ( $k_{off}$ ) and the equilibrium constants (Kp)) was determined. The equilibrium constants obtained well correlate with those obtained by other methods. The association rate constant for the binding of T/STI complex increased with temperature, while the dissociation rate constant practically remained unchanged. The association and dissociation rate constants activation parameters were calculated from their concentration dependence.

Based on the temperature dependence the activation energy, enthalpy and entropy of complex formation were calculated. It was shown that the entropy component plays a key role in T/STI interaction.

**Key words:** optical biosensor, trypsin, soybean trypsin inhibitor, protein-protein interaction.