

А. Н. СМЕРНОВ, О. В. СМЕРНОВА, В. Б. РОЗЕН

РЕЦЕПТОРЫ К ЭСТРАДИОЛУ В ЦИТОЗОЛЕ ПОЧЕК, ПЕЧЕНИ И МАТКИ КРЫС

(Представлено академиком С. Е. Севериным 25 VII 1974)

По современным представлениям первичным этапом в механизме действия эстрогенов на органы-мишени является их комплексообразование с рецепторными белками надосадочной фракции клеток (1). Обнаружение макромолекул, связывающих эстрадиол (E_2) с высоким сродством и низкой емкостью в органах-«немишенях» (почки, печень) (2), а также некоторые биохимические изменения, происходящие в этих органах под действием

E_2 (3, 4), позволяют предположить, что механизм действия эстрогенов включает рецепторное звено не только в органах-мишенях. В настоящей работе для доказательства рецепторной природы E_2 -связывающих макромолекул цитоплазмы почек и печени проведено дальнейшее изучение их свойств и сравнение со свойствами циторецепторов матки.

В работе использовали неполовозрелых и половозрелых самок крыс. Надосадочную фракцию (цитозол) почек, печени и маток получали как описано ранее (2) с применением для гомогенизации 0,02 M трис-HCl-буфера (pH 7,4), содержащего 1,5 mM ЭДТА и 1,5 mM дитиотреитол. Все процедуры, если это специально не оговорено, проводили при 0–4°. В работе использовали 6,7- 3H -эстрадиол-17 β (3H - E_2) с удельной активностью 40 С/ммол («Amersham», Англия), а также кристаллические стандарты немеченых гормональных препаратов. Концентрацию белка определяли по Лоури (5). Содержание радиоактивности

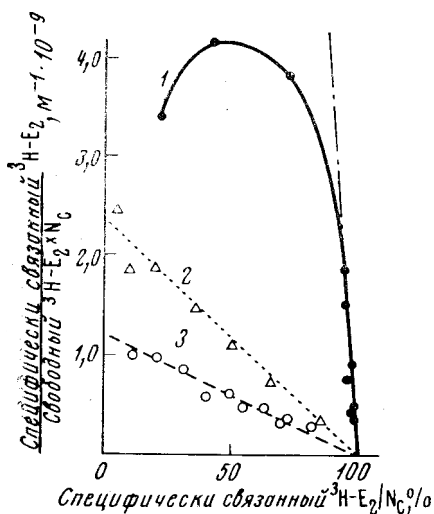


Рис. 1. Модифицированный скетчардовский график для специфического связывания 3H - E_2 макромолекулами цитозола матки (1), почек (2) и печени (3) неполовозрелых крыс

в пробах определяли как описано ранее (2). Во всех опытах определяли специфическое связывание E_2 на основе принципов, изложенных Андерсон с соавторами (6). Для определения общего связывания пробы инкубировали с 200 пг 3H - E_2 , для определения неспецифического связывания — с 200 пг 3H - E_2 , и 400 пг немеченого E_2 в течение 18 час. Разделение свободной и связанной форм гормона после инкубации проводили в большинстве опытов методом твердофазной адсорбции на декстран-покрытом угле.

Высокое сродство, низкая емкость и выраженная избирательность по отношению к лиганду являются основными характеристическими свойствами рецепторных белков. В связи с этим в работе проводили изучение указанных характеристик E_2 -связывающих макромолекул цитозола почек, печени и матки. Специфически связывающие E_2 макромолекулы цитозола почек и печени обладают высоким сродством к этому гормону ($K_{ac} = 2,2 \pm$

$\pm 0,4 \cdot 10^9 M^{-1}$ и $1,2 \pm 0,4 \cdot 10^9 M^{-1}$ соответственно). Значительные колебания определяемых величин K_{ac} не позволяют судить о степени различий в сродстве к E_2 между макромолекулами этих органов и цитосолными рецепторами матки ($K_{ac} = 10,2 \pm 6,2 \cdot 10^9 M^{-1}$). Кривые специфического связывания E_2 макромолекулами почек и печени в координатах Скоттхарда (⁷), однако, существенно отличаются от кривых связывания E_2 рецепторами матки (рис. 1). Величины специфического связывания выражены в долях N_c , равных для матки, почек и печени соответственно $62, 2,7$ и $2,2 \cdot 10^{-14}$ мол. на 1 мг белка. Характерное отклонение от линейности в последнем случае обусловлено.

Таблица 1

Конкуренция немеченых гормональных препаратов с $^3H-E_2$ за связывание макромолекулами цитозола почек, печени и матки крыс

Гормональный препарат	Конкурентоспособность в % от конкурентоспособности E_2 ($M \pm m$)		
	почка	печень	матка
Эстрадиол	100,0 \pm 3,5 (21) *	100,0 \pm 3,6 (22)	100,0 \pm 1,9 (15)
Гексастрол	101,9 \pm 4,4 (20)	95,0 \pm 3,1 (22)	95,5 \pm 2,0 (15)
Эстрон	101,7 \pm 3,9 (22)	76,0 \pm 2,6 (20)	86,0 \pm 2,0 (15)
Тестостерон	-3,4 \pm 4,2 (21)	5,0 \pm 2,9 (21)	7,3 \pm 2,1 (14)
5 α -дигидротестостерон	6,2 \pm 4,1 (21)	-1,1 \pm 2,6 (22)	-0,5 \pm 3,6 (14)
Прогестерон	-0,4 \pm 6,2 (14)	3,0 \pm 3,0 (22)	1,2 \pm 3,4 (15)
Кортикостерон	3,3 \pm 4,5 (21)	5,4 \pm 4,7 (15)	-0,5 \pm 3,3 (15)

* В скобках указано суммарное число определений в контроле и опыте.

Таблица 2

Влияние проназы, РНКазы и ДНКазы на способность макромолекул цитозола матки, почек и печени специфически связывать $^3H-E_2$

Орган	Белок, мг/мл	Специфически связанный $^3H-E_2$, % от контроля ($M \pm m$)				
		контроль	проназа	РНКазы	ДНКазы	ДНКазы + ИТ
Почки	14,8	100 \pm 11,4	-13,7 \pm 3,6 $P < 0,001$ *	97,5 \pm 16,1 $P > 0,1$	93,2 \pm 11,8 $P > 0,1$	—
Печень	41,6	100 \pm 16,6	4,6 \pm 9,7 $P < 0,001$	78,2 \pm 12,8 $P > 0,1$	103,5 \pm 15,3 $P > 0,1$	—
Матка	1,5	100 \pm 2,4	0,5 \pm 1,8 $P < 0,001$	87,2 \pm 2,1 $P < 0,002$	45,0 \pm 2,3 $P < 0,001$	—
	1,3	100 \pm 5,3	-6,1 \pm 1,2 $P < 0,001$	—	58,1 \pm 5,4 $P < 0,001$	88,2 \pm 3,0 $P > 0,05$

* Приведены значения уровня значимости по отношению к контролю.

как полагают (⁸), наличием кооперативного эффекта при связывании E_2 . Причины указанных различий в ходе скоттхардовских кривых неясны. Определение концентрации E_2 связывающих мест (N_c) показало, что в цитозоле почек и печени неполовозрелых крыс она значительно ниже, чем в матке ($N_c = 2,6 \pm 0,1, 1,25 \pm 0,26$ и $84 \pm 14 \cdot 10^{-14}$ мол. на 1 мг белка соответственно). Для исследования стереоспецифичности взаимодействия макромолекул цитозола почек, печени и матки с E_2 исследуемый материал инкубировали с 200 пг $^3H-E_2$ (контроль) или с 200 пг $^3H-E_2$ и 20 пг ряда немеченых гормональных препаратов. Данная постановка опыта позволяет ответить на вопрос о наличии способности лиганда конкурировать с $^3H-E_2$ за связывающие места, но не дает строго количественной оценки его конкурентоспособности. Показано (табл. 1), что вытеснить $^3H-E_2$ из комплексов

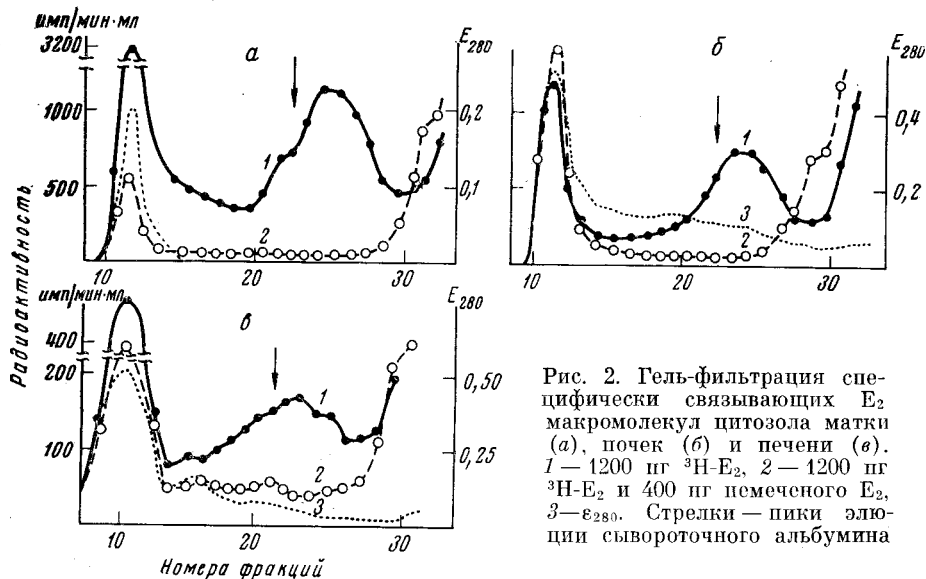


Рис. 2. Гель-фильтрация специфически связывающих E_2 макромолекул цитозола матки (а), почек (б) и печени (в). 1 — 1200 μg $^3\text{H}-E_2$, 2 — 1200 μg $^3\text{H}-E_2$ и 400 μg немеченого E_2 , 3 — E_{280} . Стрелки — пики элюции сывороточного альбумина

как с циторецепторами матки, так и с макромолекулами цитозола почек и печени, способны только те препараты, которые обладают эстрогенной активностью (эстрадиол, эстрон и гексаэстрол).

Определенный интерес представляет сравнение других характеристик специфически связывающих E_2 макромолекул цитозола почек, печени и матки. Для изучения природы этих макромолекул исследуемый материал

Таблица 3
Осаждение протамин-сульфатом специфически связывающих E_2 макромолекул цитозола почек, печени и матки

Орган	№ опыта	Специфически связанный $^3\text{H}-E_2$, $\mu\text{g}/\text{мл}$	
		осаждение протамином	адсорбция на угле
Почки	1	33,1	38,7
	2	32,4	38,4
	3	76,8	114,0
Печень	1	22,2	39,6
	2	12,8	9,5
	3	29,0	38,8
Матка	1	135,7	117,7
	2	89,1	87,0
	3	134,0	135,0

инкубировали 5 мин. при 37° с 0,5 $\text{mg}/\text{мл}$ РНКазы (фирма «Merk»), 0,25 $\text{mg}/\text{мл}$ ДНКазы (Ленинградский мясокомбинат) и 0,5 $\text{mg}/\text{мл}$ проназы (фирма «Merk»). Затем пробы инкубировали с гормоном и определяли специфически связанный $^3\text{H}-E_2$. Как видно из табл. 2, только проназа во всех случаях полностью снимает способность макромолекул специфически связывать $^3\text{H}-E_2$. Некоторое разрушение ДНКазой циторецепторов матки обусловлено, очевидно, примесью протеаз в использованном препарате, поскольку ингибитор трипсина сои (ИТ, «Reanal», Венгрия) почти полностью снимает этот эффект. Таким образом, очевидно, что специфически связывающие E_2 макромолекулы цитозола почек и печени так же, как и циторецепторы к E_2 матки (1), по крайней мере частично состоят из белка.

Учитывая свойство кислых белков взаимодействовать с поликатионами, исследовали способность макромолекул цитозола почек, печени и матки, специфически связывающих E_2 , взаимодействовать с протамином. Для этого к исследуемому материалу после инкубации с гормоном добавляли раствор протамин-сульфата (конечная концентрация 0,6 $\text{mg}/\text{мл}$). В полученном осадке определяли количество специфически связанного $^3\text{H}-E_2$. Из табл. 3 видно, что 60—100% специфически связанного $^3\text{H}-E_2$ осаждается протамином из цитозола всех трех органов.

Можно думать поэтому, что специфически связывающие E_2 макромолекулы цитозола почек и печени так же, как и матки (2), являются кислыми

белками. Исследование влияния температуры на способность макромолекул цитозола почек и печени специфически связывать $^3\text{H-E}_2$ показало, что эти макромолекулы, как и циторецепторы матки (⁹), весьма термолабильны: прогревание при 40° в течение 5 мин. приводит к снижению способности связывания $^3\text{H-E}_2$ этими макромолекулами на 80—90%.

При ступенчатом высаливании белков цитозола почек и печени оказалось, что специфически связывающие E_2 макромолекулы этих органов, подобно рецепторам матки (⁹), осаждаются преимущественно в области до 30% насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

При гель-фильтрации нативных надосадочных фракций почек, печени и матки на колонке сефадекса G-200 при низкой ионной силе среды весь специфически связанный $^3\text{H-E}_2$ во всех органах элюировался в исключаемом объеме. Это обусловлено, видимо, повышенной склонностью к агрегации связывающих E_2 макромолекул при гель-фильтрации в данных условиях. Осаждение белков цитозола почек, печени и матки из раствора с высокой ионной силой в присутствии Ca^{2+} по (⁹) и последующая хроматография на сефадексе G-200 позволили выявить сходные пики специфически связанного $^3\text{H-E}_2$, элюируемые несколько позже сывороточного альбумина (рис. 2). Приблизительная оценка молекулярных весов связывающих E_2 макромолекул с использованием в качестве стандартов овальбумина, гемоглобина, альбумина, трансферрина, алкогольдегидрогеназы, γ -глобулина и каталазы дает величины около 50 000. По-видимому, асимметрия данной формы циторецепторов матки обуславливает более низкую величину их молекулярного веса, полученную нами, по сравнению с данными (⁹), где использовались для расчетов также и седиментационные свойства циторецепторов к E_2 матки телят.

Итак, приведенные в работе данные показывают, что в цитозоле почек и печени крыс содержатся специфически связывающие E_2 макромолекулы, по ряду свойств весьма сходные с циторецепторами к E_2 матки, что позволяет отнести их к классу эстрогенных рецепторов. Циторецепторам к E_2 приписывают ключевую роль в механизме осуществления биологического эффекта эстрогенов в органах-мишенях. Описанные в работе специфически связывающие E_2 макромолекулы цитозола почек и печени могут, по-видимому, играть ту же роль в механизме действия эстрогенов на эти органы.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
19 VII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Б. Розен, О. В. Смирнова, А. Г. Волчек, Пробл. эндокринол., т. 17, 109 (1974).
² О. В. Смирнова, А. Н. Смирнов, В. Б. Розен, Биохимия, т. 39, 648 (1974). ³ C. Robb, J. Davis et al., J. Clin. Invest., v. 49, 871 (1970). ⁴ H. Schrievers, H. Hoff et al., Hoppe-Seyler's Zs. physiol. Chem., B. 354, 401 (1973). ⁵ O. Lowry, N. Rosenbrough et al., J. Biol. Chem., v. 193, 265 (1951). ⁶ J. Anderson, J. Clark, E. Peck, Biochem. J., v. 126, 561 (1972). ⁷ G. Scatchard, Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 51, 660 (1949). ⁸ T. Erdos, R. Bessada et al., In: Advances in Biosciences, Oxford, v. 7, 1971, p. 119. ⁹ G. Puca, E. Nola et al., Biochemistry, v. 10, 3769 (1971).