

УДК 612.018

БИОХИМИЯ

Академик АН УзССР Я. Х. ТУРАКУЛОВ, Д. Х. ХАМИДОВ,
Т. И. ВИНОКУРОВА, А. А. АБДУКАРИМОВ, А. И. ГАГЕЛЬГАНС

О ТИРОКСИНСВЯЗЫВАЮЩЕМ ФАКТОРЕ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

Выяснение специфики взаимодействия гормонов с внутриклеточными рецепторами представляется одним из существенных моментов исследования механизма реализации гормонального эффекта. Этот вопрос применительно к тиреоидным гормонам практически не изучен. Имеется единичное исследование ⁽¹⁾, указывающее на наличие специфического взаимодействия тироксина (константа сродства $1,4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$) с 105 000 *g*

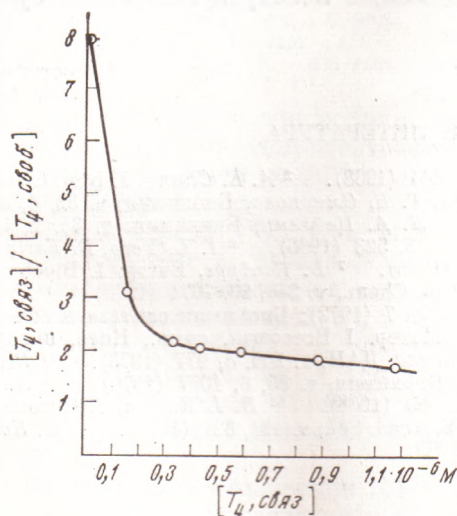


Рис. 1. График Скэтчарда для связывания (J^{125})- T_4 изолированными митохондриями печени крыс. Среда инкубации при диализе содержала: 0,3 *M* сахарозу, 10 *mM* трис-хлорид (рН 7,5), от 10^{-4} до 10^{-9} *M* (J^{125})- T_4 , суспензию митохондрий (4 мг белка на 100 мл)

сахарозы и 10 ммол. трис-хлорида, рН 7,4. Тироксинсвязывающий фактор митохондрий выделяли из супернатанта 200 000 *g* обработанных ультразвуком «теней» внутренних мембран митохондрий, полученных путем осмотического шока. Обработку ультразвуком проводили на генераторе УЗДН-1 при 15 кгц и токе 0,3 а в течение 2 мин. (интервалами по 20 сек.) при 0–3°. Среда озвучивания содержала (в ммол.) сахарозы 100, АТФ 1, трис-хлорида 10 (рН 7,8), $MgCl_2$ 5, сукцинат 10, KCl 100.

ТСФ из надосадочной жидкости озвученных «теней» митохондрий выделяли на колонке (2,5×40 см) с сефадексом G-100, уравновешенной 5 *mM* трис-буфером (рН 7,5). При этом ТСФ выходил во фракции высокомолекулярных соединений. Дальнейшую очистку ТСФ и характеристику его

фракцией цитоплазмы передней доли гипофиза. В другой работе ⁽²⁾ было обнаружено 2 или 3 (у самцов и самок соответственно) тироксинсвязывающих белковых фракции (ТСФ) в цитоплазме печени крыс, причем специфичность связывания оценивалась по способности *D*-изомера тироксина вытеснять связанную *L*-форму. С другой стороны, известно, что одной из основных внутриклеточных мишеней тироксина являются митохондрии ⁽³⁾, способные накапливать значительные количества тиреоидных гормонов даже при их низком уровне в окружающей среде.

В настоящей работе была исследована специфика взаимодействия тироксина с интактными митохондриями и выделенными из них фракциями, которую оценивали по величине констант сродства.

Митохондрии печени крыс изолировали по общепринятым методам в среде, содержащей 0,3 мол.

связывающей активности проводили на колонке (2,5×40 см) с сефадексом G-200, уравновешенной 5 мМ трис-буфером (рН 7,5) и 10^{-6} М (J^{125})-Т₄ с тироксином. В полученных фракциях измеряли содержание белка по поглощению при 280 нм и радиоактивность (в имп/мин на 1 мг белка) на торцовом счетчике. Связывание тироксина с интактными митохондриями

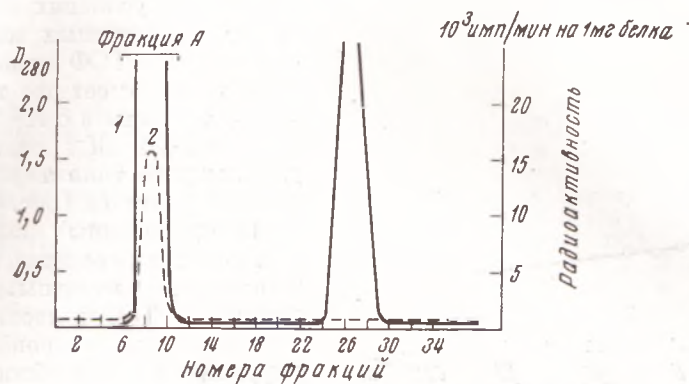


Рис. 2. Фракционирование белков матрикса митохондрий на сефадексе G-100. 1 — поглощение при 280 нм; 2 — радиоактивность (имп/мин на 1 мг белка)

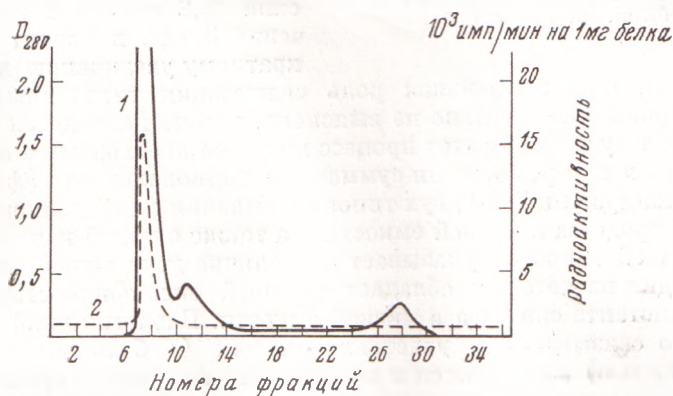


Рис. 3. Хроматография фракции А на сефадексе G-200. Обозначения те же, что на рис. 2

и очищенным ТСФ исследовали методом равновесного диализа (⁴). Константы сродства определяли графически по методу Скэтчарда, используя математический аппарат, изложенный Берtrandом (⁵), при составлении программы для ЭВМ «Минск-32». При расчетах вводили поправку на количество (J^{125})-Т₄, сорбированного на диализных мешках, и на радиоактивность, соответствующую примеси йодида в препарате меченого тироксина.

Анализ данных, представленных на рис. 1, показывает, что в интактных митохондриях печени крыс имеется два типа тироксинсвязывающих участков: с высоким ($K=1 \cdot 10^8$ М⁻¹) и низким ($K=3,5 \cdot 10^3$ М⁻¹) сродством.

Надосадочная жидкость 200 000 g при гель-фильтрации через колонку с сефадексом G-100, уравновешенную 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, и $1 \cdot 10^{-6}$ М (J^{125})-Т₄, делится на две фракции, первая из которых эффективно связы-

вает тироксип (рис. 2). Последующее разделение этой фракции на колонке с сефадексом G-200 обнаружило наличие трех белковых фракций (рис. 3), причем связывание $(J^{125})-T_4$ наблюдалось только в первом пике. При рехроматографии всех трех фракций в обратной последовательности в тех же условиях было подтверждено связывание тироксина именно этим пиком. Анализ процесса связывания тироксина указанной

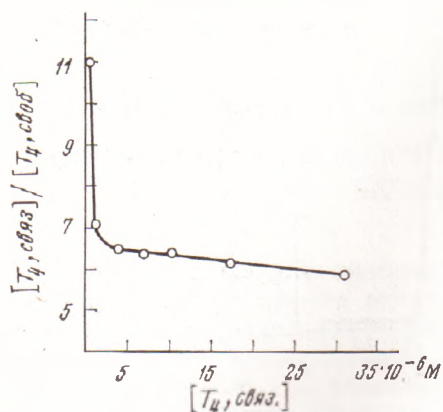


Рис. 4. График Скэтчарда для связывания $(J^{125})-T_4$ с ТСФ. Среда инкубации при анализе содержала: 5 мМ трис-хлорид (рН 7,5), от 10^{-4} до 10^{-9} М $(J^{125})-T_4$, ТСФ (4 мг белка на 100 мл)

фракцией в условиях, использованных для интактных митохондрий, показал, что ТСФ аналогично митохондриям имеет два типа связывающих участков с $K=3,5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ и $K=8,1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ соответственно для каждого типа тироксинсвязывающих участков (рис. 4).

Представленные выше значения констант сродства комплексов тироксина с интактными митохондриями и ТСФ позволяют объяснить высокую «тироксинконцентрирующую» способность митохондрий, отмеченную ранее многочисленными авторами (6).

Так, по данным Хоха (7), инъекция гипотиреоидным животным незначительных количеств тироксина (5,2 мкг на 1 г веса) в течение 3 час. приводит к его 550-кратному увеличению в митохонд-

риях печени. Функциональная роль связывания тиреоидных гормонов в митохондриях окончательно не выяснена, однако появляется все больше доводов в пользу того, что этот процесс является необходимым и инициальным элементом при реализации суммарного гормонального эффекта. Наличие в митохондриях и ТСФ двух типов связывания с тироксином с большой константой сродства и низкой емкостью, а также с малой константой сродства и большой емкостью указывает на наличие двух типов связывающих участков, один из которых обладает большей специфичностью, судя по большей константе сродства и низкой емкости. Биологический смысл специфического связывания в участках-мишенях (с большим сродством и низкой емкостью) заключается в обеспечении фиксации гормонов при их низкой физиологической концентрации и в ограничении этого процесса при патологическом повышении концентрации гормона (8). В то же время другой тип связывания с низкой константой сродства и большей емкостью может служить своеобразной «буферной» системой, способной аккумулировать гормон в широких пределах концентраций. Различие в константах сродства двух классов связывающих участков, очевидно, обусловлено формированием различных типов связей между гормоном и белком. В частности, Грин с сотрудниками (9) показали, что фиксация тиреоидных гормонов по типу высокого сродства глобулином сыворотки обеспечивается гидрофобными силами. Вместе с тем, неспецифическое связывание тироксина с сывороточным альбумином происходит за счет электростатических сил (10).

Наличие двух типов связывающих участков в выделенном нами ТСФ, возможно, свидетельствует о наличии примесей, связывающих гормон с низким сродством. Не исключено, что в результате последующей очистки ТСФ до гомогенного состояния сохраняются только участки с высоким сродством и низкой емкостью для тироксина. Подобный эффект очистки продемонстрирован для внутриклеточного рецептора стероидов (11) и тироксинсвязывающего преальбумина крови (12).

Авторы признательны В. Л. Эпельбаум за математическую обработку данных и составление программы для ЭВМ «Минск-32», а также Э. Махмудовой, Н. Ходжаевой и М. Ниязову за помощь в проведении экспериментов.

Институт биохимии
Академии наук УзССР
Ташкент

Поступило
17 IV 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. B. Suji, R. S. Toccafondi et al., J. Endocrin., v. 58, 1, 41 (1973). ² S. W. Spaulding, P. J. Davis, Biochim. et biophys. acta, v. 229, 1, 20 (1971). ³ A. L. Lehninger, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 42, 2, 312 (1971). ⁴ R. A. Pages, J. Robbins, H. Edelhoch, Biochem., v. 12, 14, 2773 (1973). ⁵ H. A. Bertrand, E. J. Masoro et al., Biochem., v. 10, 20, 3679 (1971). ⁶ Тиреоидные гормоны, Я. Х. Туракулов (отв. ред.), Ташкент, 1972. ⁷ F. L. Hoch, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 58, 2, 506 (1967). ⁸ E. E. Baulieu, Recent Progress in Hormon Research, v. 27, N. Y.—London, 1971. ⁹ A. Green, J. Marshall et al., Biochim. et biophys. acta, v. 278, 1, 117 (1972). ¹⁰ K. M. Tabachnik, J. Biol. Chem., v. 242, 1646 (1967). ¹¹ J. D. Baxter, G. M. Tomkins, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 68, 5, 932 (1971). ¹² A. Raz, W. S. Goodman, J. Biol. Chem., v. 244, 12, 3230 (1969).