

УДК 577.169

О ПРИРОДЕ РЕЦЕПТОРОВ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ. ТРАНСЛОКАЦИЯ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ ЧЕРЕЗ ПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ

АЗИМОВА Ш. С., УМАРОВА Г. Д., ПЕТРОВА О. С.,
ТУХТАЕВ К. Р., АБДУКАРИМОВ А.

Исследована транслокация в условиях *in vivo* тироксинсвязывающего преальбумина сыворотки крови (ТСПА). Установлено, что ТСПА в комплексе с гормоном проникает через плазматическую мембрану в цитоплазму клеток-мишеней. Методом иммуноавторадиографии с помощью моноспецифических антител против ТСПА показано, что его антигенные детерминанты в процессе транслокации не изменяются. Методом электронно-микроскопической авторадиографии установлено, что ТСПА сыворотки крови в клетках мишеней локализуется на рибосомах, митохондриях, в липидных каплях и комплексе Гольджи. В клетках, не чувствительных к тиреоидным гормонам, небольшое количество проникшего ТСПА локализуется в лизосомах. При исследовании T_4 - и T_3 -связывающих белков цитоплазмы печени крыс установлено, что один из них имеет общие с ТСПА антигенные детерминанты.

Тиреоидные гормоны имеют специфические рецепторы, локализованные внутри клеток. Тироксин- и трийодтиронинсвязывающие белки обнаружены в цитоплазме, митохондриях, хроматине, липидных включениях и других субклеточных органеллах [1–7]. Между тем в настоящее время нет единого представления относительно способа проникновения тиреоидных гормонов в клетки-мишени. Ряд исследователей считает, что тиреоидные гормоны транспортируются через плазматическую мембрану в свободном состоянии и только в ядре связываются со специфическими рецепторными молекулами [8]. В то же время имеются работы, авторы которых на основании косвенных данных пришли к выводу, что процесс транслокации через плазматическую мембрану должен быть опосредован специфическими белковыми носителями [9, 10], природа которых в настоящее время неизвестна.

Ранее мы сообщали об идентичности тироксинсвязывающего преальбумина сыворотки крови (ТСПА) цитоплазматическому и ядерному рецепторам тироксина [11, 12]. В связи с этим было сделано предположение, что ТСПА в комплексе с гормоном транслоцируется через плазматическую мембрану и как истинный рецептор опосредует эффекты, находящиеся под контролем тиреоидных гормонов [11].

С целью проверки этого предположения мы исследовали транслокацию меченого [125 I]преальбумина, [125 I]тироксина и [125 I]трийодтиронина в условиях *in vivo*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Преальбумин из сыворотки крови крыс и человека выделяли по методу Раза и Гудмана [13].

Иодирование белка проводили по Хантеру и Гринвуду [14].

Тщательно перфузированную гипотоническим раствором печень, а также отмытые легкие и мозг гомогенизировали в 0,25 М растворе сахарозы в присутствии 3 мМ $MgCl_2$ и дитиотрейтола. Ядра и митохондрии отделяли и далее полученный раствор центрифугировали при 105 000 g. Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость рассматривали как цитоплазму. Разделение белков цитоплазмы проводили методом препаративного электрофореза [15].

Радиоиммунопреципитацию проводили по методу Оухтерлони [16].

Моноспецифическую антисыворотку к ТСПА получали, как описано ранее [17].

Моноспецифические антитела выделяли из антисыворотки методом аффинной хроматографии на BgCN-активированной сефарозе 4В, к которой в качестве лиганда был

пришит ТСПА [18]. Фиксацию и заливку тканей для электронно-микроскопической радиоавтографии (ЭМРА) проводили по методу Аткинсона и соавт. [19].

Исследования методом ЭМРА проводили в двух модификациях — эмульсионной [20] и безэмульсионной [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Меченый белок получали путем иодирования с помощью ^{125}NaI в присутствии хлорамина Т. Иодированный ТСПА отделяли от низкомолекулярных продуктов реакции путем 2-кратной гель-фильтрации на сефадексе G-50.

Методом Оухтерлони было показано, что иодированный белок по своим антигенным детерминантам не отличается от нативного. Далее, высокоочищенный продукт (по 4 мг с удельной активностью 2·

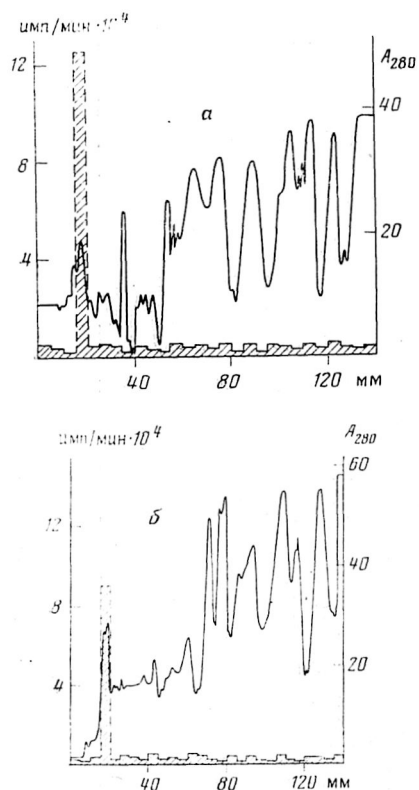


Рис. 1

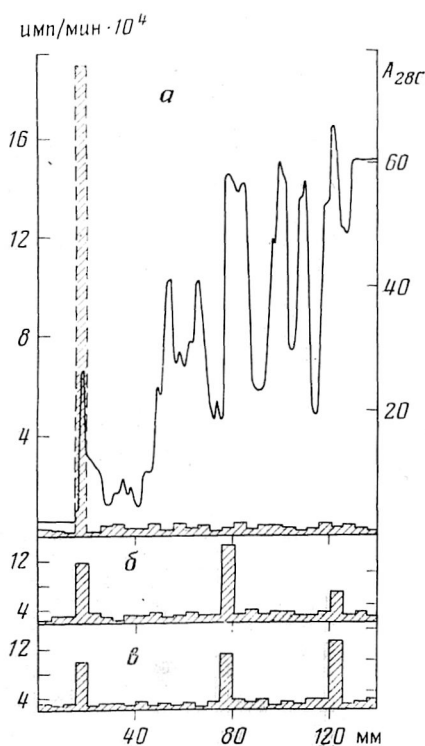


Рис. 2

Рис. 1. Электрофорез белков цитоплазмы легкого (а), цитоплазмы мозга (б) в 7,5%-ном, полиакриламидном геле, рН 8,3 (денситограмма). Заштрихована величина радиоактивности участков геля

Рис. 2. Электрофорез белков цитоплазмы печени после введения $[^{125}\text{I}]\text{TSPA}$ (а), $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ (б), $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ (в). Заштрихована величина радиоактивности участков геля

· 10^8 имп/мин на 1 мг) вводили крысам внутривенно. Параллельно другой группе животных вводили меченые гормоны $[^{125}\text{I}]\text{тироксин}$ и $[^{125}\text{I}]\text{трийодтиронин}$. Через 40 мин животных забивали декапитацией и исследовали проникновение как гормонов, так и ТСПА в цитоплазму различных органов. Белки цитоплазмы печени, легких и мозга разделяли методом препаративного электрофореза в полиакриламидном геле [15] при рН 8,3 и исследовали радиоактивность в полученных белковых фракциях.

Распределение ^{125}I ТСПА в цитоплазме различных органов

Орган	Количество общего белка в цитоплазме, мг	Радиоактивность в зоне ТСПА, имп/мин на 1 мг	Удельная активность, имп/мин на 1 мг ТСПА
Печень	45	20 000	440
Легкое	37	13 700	370
Мозг	28	9 100	320

Как видно на рис. 1 и 2, основной пик радиоактивности приходится на зону, соответствующую по своей электрофоретической подвижности ТСПА. Количество меченого белка, проникшего в цитоплазму печени, легкого и мозга, различаются (см. таблицу).

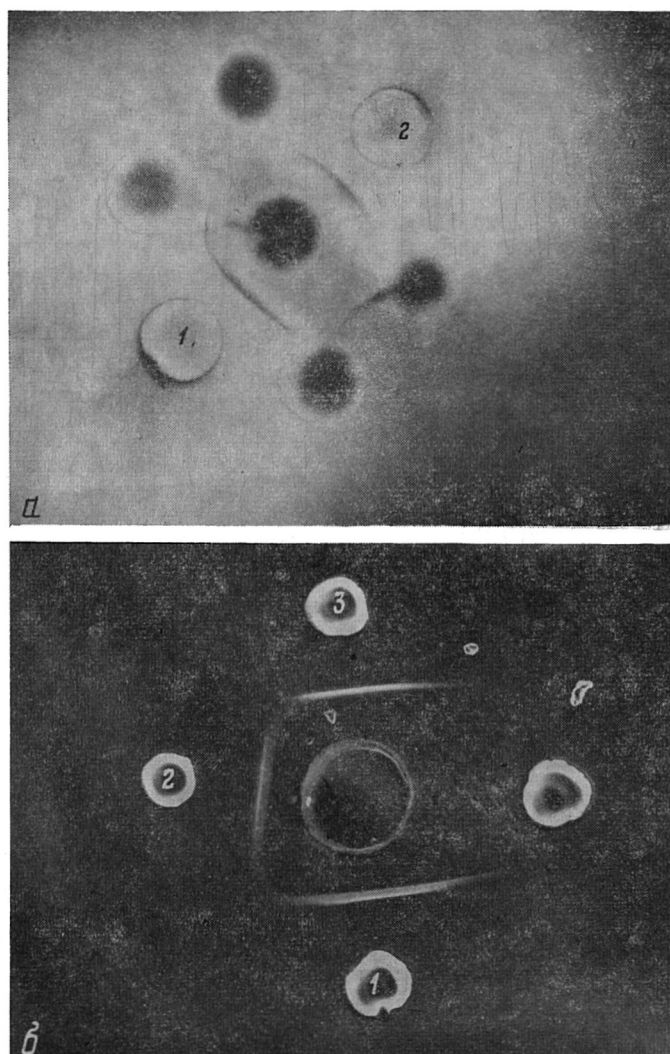


Рис. 3. Реакция радиоиммунопреципитации по Оухтерлони. а — В центральной лунке моноспецифические антитела к ТСПА сыворотки крови человека: 1 — ^{125}I ТСПА человека, вводимый крысам, 2 — ^{125}I ТСПА, изолированный из цитоплазмы печени после введения его *in vivo*. б — В центральной лунке — моноспецифическая антисыворотка к ТСПА сыворотки крыс: 1 — ^{125}I Т₄-связывающий белок цитоплазмы печени крыс с электрофоретической подвижностью ТСПА, 2 — ^{125}I Т₃-связывающий белок цитоплазмы печени крыс с электрофоретической подвижностью ТСПА, 3 — ТСПА

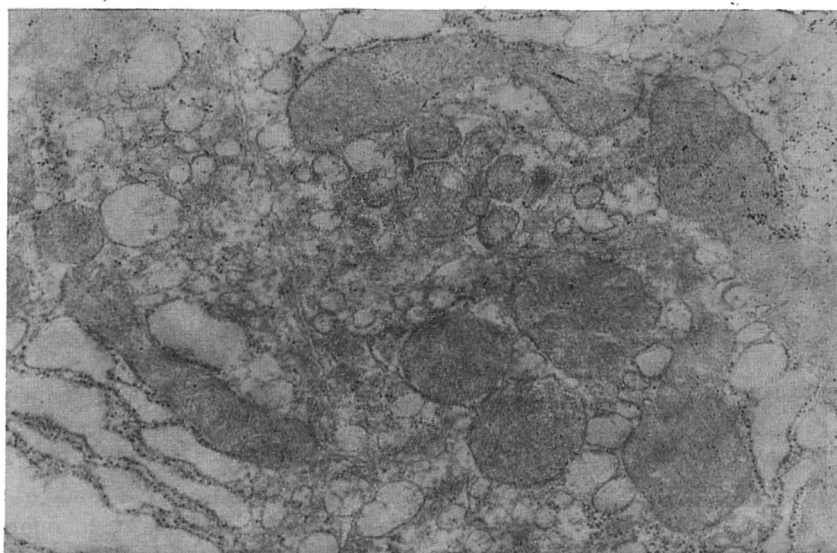


Рис. 4. Фрагмент цитоплазмы гепатоцита. Метка наблюдается под канальцами зернистой эндоплазматической сети. Метод безэмульсионный. Срезы свинцом не контрастированы. Ув. 15 000

Как видно из таблицы, степень проникновения меченого ТСПА в цитоплазму легкого и мозга меньше, чем в печень, и составляет 0,85 и 0,79% соответственно от содержания в печени.

При исследовании цитоплазмы печени крыс, которым был введен $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ и $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$, обнаружено несколько радиоактивных белков (рис. 2), один из которых соответствует по электрофоретической подвижности ТСПА сыворотки крови и осаждается моноспецифическими антителами к ТСПА (рис. 3).

Для более детальной субклеточной локализации ТСПА нами использован метод электронно-микроскопической радиоавтографии. Для исследования были выбраны такие традиционные ткани-мишени, как печень и надпочечники, а также ткань, некомпетентная к тиреоидным гормонам, — селезенка.

В цитоплазме гепатоцитов особенно интенсивная метка наблюдается над канальцами зернистой эндоплазматической сети — отдельные канальцы данной органеллы содержат интенсивную метку, в то время как другие лишены последней (рис. 4). Обнаружение ТСПА на рибосомах может косвенно свидетельствовать о том, что он может входить в состав рибонуклеопротеидных частиц и, следовательно, оказывать влияние на посттранскрипционные процессы. Это подтверждается данными [22], что рецептор тироксина обнаружен в цитоплазматических информосомах. В отдельных клетках удается проследить проникновение меченого ТСПА в липидные капли (рис. 5).

При исследовании методом ЭМРА срезов клеток пучковой зоны коры надпочечников показано, что меченый белок проникает из межклеточного пространства в цитоплазму (рис. 6). При этом на электронограммах каких-либо инвагинаций плазмолеммы по типу пиноцитоза не обнаружено. Меченый ТСПА локализуется в структурных компонентах комплекса Гольджи, митохондриях и липидных включениях (рис. 4).

Интенсивность включения меченого ТСПА в клетки селезенки была невысокой, что и следовало ожидать, учитывая, что селезенка не является мишенью для тиреоидных гормонов — треки обнаруживались только над лизосомами макрофагов селезенки.

Вышеперечисленные данные показывают, что ТСПА сыворотки крови в комплексе с гормоном проникает через плазматическую мембрану

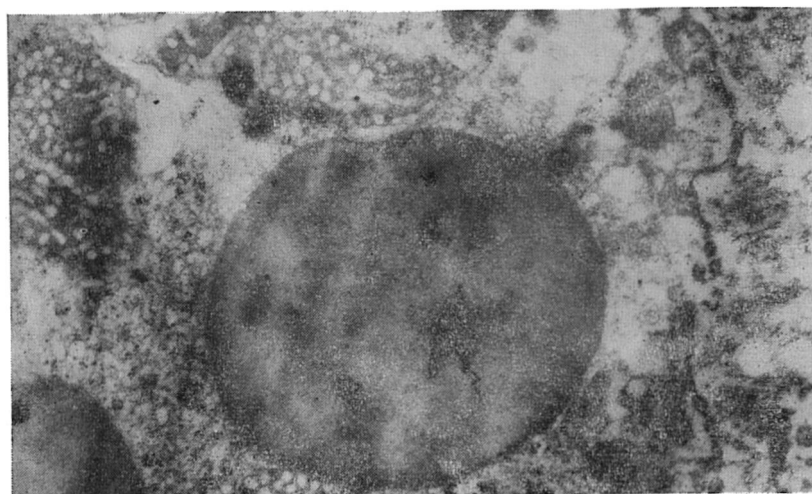


Рис. 5. Фрагмент цитоплазмы пучковой зоны коры надпочечников. Проникновение метки в липидную каплю. Метод эмульсионный. Ув. 14 000

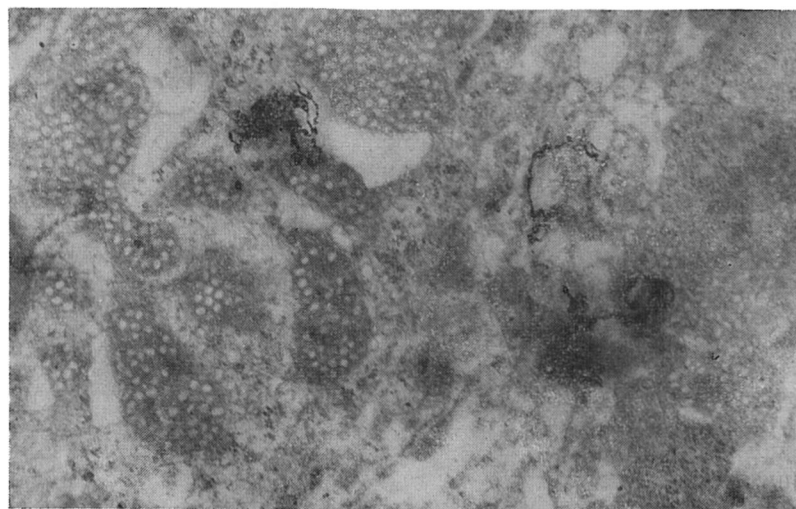


Рис. 6. Клетки пучковой зоны коры надпочечников. Проникновение $[^{125}\text{I}]$ ТСПА через плазмолему в цитоплазму. Метод безэмульсионный. Увеличение 14 000

в цитоплазму и локализуется в различных субклеточных органеллах, в функционировании которых принимают участие тиреоидные гормоны.

Интересно было выяснить, происходит ли трансформация ТСПА в процессе его транслокации через плазматическую мембрану? Крысам вводился ТСПА сыворотки человека, затем радиоактивные зоны, соответствующие преальбумину, элюировали из гелей фосфатным буфером и после диализа исследовали методом Оухтерлони с моноспецифическими антителами, полученными против ТСПА сыворотки человека. Как видно на рис. 3, меченый человеческий преальбумин, введенный крысам *in vivo* и затем изолированный из цитоплазмы, дает реакцию преципитации с антителами к ТСПА сыворотки человека. Ранее при сравнении пептидных карт [11] гомогенных рецепторов тироксина, выделенных из цитозоля аффинной хроматографией, и ТСПА сыворотки крови было установлено, что эти тироксинсвязывающие белки обладают совершен-

но идентичным фингерпринтом. Эти результаты были подтверждены также иммунологическими исследованиями [12]. Совокупность всех приведенных данных приводит к выводу о том, что в процессе транслокации ТСПА не изменяет свою структуру.

Как уже указывалось, в настоящее время нет единого мнения о способе проникновения тиреоидных гормонов в клетки-мишени. Данные литературы по этому вопросу укладываются в две схемы.

1. Тиреоидные гормоны связываются в крови со специфическими транспортными белками, затем происходит диссоциация гормон-белкового комплекса, и свободный гормон диффундирует в клетку через плазматическую мембрану.

2. Транслокация гормонов является активным процессом и происходит по эстафетному механизму — они связываются в сыворотке крови транспортными белками, затем диссоциируют с них с образованием комплекса со специфическим белком-носителем, в составе которого они транслоцируются через плазматическую мембрану.

Наши данные по изучению транслокации гормон-рецепторного комплекса, меченого как по белку, так и по гормону, свидетельствуют о непосредственном проникновении через плазматическую мембрану этого комплекса. Такие же результаты были получены ранее при исследовании транслокации гормона и меченого рецептора в культуре клеток человека [23]. Все эти результаты противоречат эстафетному механизму транслокации.

На основании изложенного материала и литературных данных [23] можно сделать вывод, что экскретируемый из щитовидной железы гормон в сыворотке связывается с высоким сродством с ТСПА, доставляется всем органам и транслоцируется в компетентные клетки по мере их подготовленности. Вероятно, помимо гормонотранспортирующей функции эта молекула, структура которой конформационно весьма мобильна [24], может взаимодействовать с другими физиологически активными веществами (акцепторами), обеспечивая тем самым регуляцию процессов, протекающих с участием тиреоидных гормонов. Количество акцепторов и их сродство к гормон-рецепторному комплексу определяет компетентность клетки или отдельной субклеточной органеллы к данному гормону.

ЛИТЕРАТУРА

1. Oppenheimer J., Schwartz H., Surks M. *Endocrin. Res. Commun.*, 1975, v. 2, p. 309—325.
2. De Groote L., Coleoni A., Rue P., Seo H., Mortino E., Refetoff S. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1977, v. 79, p. 173—178.
3. Samuels H., Tsai J. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1973, v. 70, p. 3488—3493.
4. Latham K., Ring J., Baxter J. J. *Biol. Chem.*, 1976, v. 251, p. 7388—7397.
5. Sterling K., Lazarus J. H., Milch P., Sakurada T., Brenner M. *Science*, 1978, v. 201, № 4361, p. 1126—1129.
6. Garbi-Chini J., Torressani J. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1979, v. 88, p. 170—177.
7. Garbi-Chini J., Torressani J. *J. Endocrinol. Invest.*, 1981, v. 4, p. 177—183.
8. Oppenheimer J., Schwartz H., Koerner D., Surks M. *J. Clin. Invest.*, 1974, v. 53, p. 768—777.
9. Cheng Sh. S., Maxfield I. R., Robbins J., Willingham M. C., Pastan I. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., Biol. Sci.*, 1980, v. 77, № 6, p. 3425—3429.
10. Krenning E. P., Docter R., Bernard H. I., Visser T. J., Hennemann G. *FEBS Letters*, 1978, v. 91, p. 113—116.
11. Азимова Ш. С., Гулямова Т. Г., Абдукаримов А. *Проблемы эндокринологии*, 1982, т. 28, № 3, с. 65—68.
12. Петрова О. С., Абдукаримов А. *Узб. биол. журн.*, 1983, № 3, с. 63—64.
13. Raz A., Goodman D. J. *Biol. Chem.*, 1969, v. 244, p. 3230—3237.
14. Hunter W. M., Greenwood F. C. *Nature*, 1962, v. 194, p. 495—497.
15. Маурер Т. *Диск-электрофорез*. М.: Мир, 1977. 248 с.
16. Ouchterlony O. In: *Handbook of Experimental Immunology*. Oxford — Edinburg: Blackwell Sci. Publ., 1967, p. 6555.
17. В кн.: *Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу*/Под ред. Аксельсона Н. и др. М.: Мир, 1977, с. 200—205.
18. Cuatrecasas P., Anfinsen B. *Ann. Rev. Biochem.*, 1971, v. 259, p. 259—265.
19. Atkinson D. J., Atterwill C. K., Balars R., Bermudez I., Kingsburg A. *Brit. J. Pharmacol.*, 1982, v. 77, p. 435—439.

20. *Bachmann L., Salpeter M. M. J. Histochem., Cytochem.*, 1966, v. 14, p. 753—754.
21. *Normandin D. K. Frans. Amer. Microsc. Soc.*, 1973, v. 92, № 3, p. 381—384.
22. *Dejer M., Dastique B., Sabatier M., Thomopoulos S., Kruhl J. Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1975, v. 67, p. 995—1104.
23. *Абдукаримов А., Мучник С. Е., Арипджанов А., Гулямова Т. Г., Хамидов Д. Х.* Докл. АН СССР, 1978, т. 234, с. 6—9.
24. *Blake C. C., Oatley S. I. Nature*, 1977, v. 268, p. 115—120.

Институт биохимии
АН УзССР, Ташкент

Поступила в редакцию
30.XII.1983

ON THE NATURE OF THYROID HORMONE RECEPTORS: TRANSLOCATION OF THYROID HORMONES THROUGH PLASMA MEMBRANES

**AZIMOVA Sh. S., UMAROVA G. D., PETROVA O. S.,
TUKHTAEV K. R., ABDUKARIMOV A.**

Institute of Biochemistry, Uzbek SSR Academy of Sciences, Tashkent

The *in vivo* translocation of thyroxine-binding blood serum prealbumin (TBPA) was studied. It was found that the TBPA-hormone complex penetrates through the plasma membrane into the cytoplasm of target cells. Electron microscopic autoradiography revealed that blood serum TBPA is localized in ribosomes of target cells as well as in mitochondria, lipid droplets and Golgi complex. Negligible amounts of the translocated TBPA is localized in lysosomes of the cells insensitive to thyroid hormones (spleen macrophages). Study of T₄- and T₃-binding proteins from rat liver cytoplasm demonstrated that one of them has the antigenic determinants common with those of TBPA. It was shown autoimmunoradiographically that the structure of TBPA is not altered during its translocation.