

УДК 577.122

# НОВОЕ СВОЙСТВО ИЗВЕСТНЫХ БЕЛКОВ: СПЕЦИФИЧЕСКОЕ СВЯЗЫВАНИЕ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ АПОЛИПОПРОТЕИНАМИ ПЛАЗМЫ ЧЕЛОВЕКА

© 1994 г.

О.В.СВИРИДОВ

*Институт биоорганической химии АН Беларуси, 220141 Минск, Жодинская ул., 5/2,  
факс: (0-172)63-72-74*

**Ключевые слова:** аполипопротеины, тиреоидные гормоны, тироксин, трийодтиронин.

Тиреоидные гормоны тироксин (Т<sub>4</sub>) и трийодтиронин (Т<sub>3</sub>) способны ассоциировать с липопротеидными частицами высокой, низкой и очень низкой плотности (ЛВП, ЛНП и ЛОНП) плазмы человека. Аполипопротеины (апо) выступают в качестве Т<sub>4</sub>-связывающих компонентов липопротеидных частиц. Связывание тиреоидных гормонов с аполипопротеинами является зависимым от времени, обратимым, насыщаемым и чувствительным к специфическим ингибиторам процессом взаимодействия со структурно обособленным центром в белке, комплементарным лиганду. Количество таких центров в макромолекуле варьирует от одного в апоА-I до трех в апоВ-100. Низкие значения сродства ( $K_a \sim 10^5\text{--}10^6 \text{ M}^{-1}$ ) к Т<sub>4</sub> характерны для апоА-II, апоА-IV, апоЕ, апоВ-100, тогда как апоА-I и его липидный комплекс апоА-I-ЛВП проявляют достаточно высокое сродство к гормону ( $K_a \sim 10^7\text{--}10^8 \text{ M}^{-1}$ ). Активный центр апоА-I-ЛВП содержит химическую группировку, взаимодействующую с ионизированной оксигруппой фенольного кольца Т<sub>4</sub>, включает полости, способные вместить атомы иода молекулы лиганда, имеет гидрофобную природу и низкую стереоспецифичность, расположен у поверхности белковой глобулы в N-концевой части полипептидной цепи, конформационно связанной с поверхностным полярным монослоем липидного матрикса. Три гормонсвязывающих центра в апоВ-100 находятся в удаленных друг от друга областях полипептидной цепи вне участков связывания гепарина и клеточного рецептора ЛНП. АпоВ-100 и апоЕ стимулируют проникновение Т<sub>4</sub> в фибробласты, а апоА-I ингибирует взаимодействие Т<sub>4</sub> и Т<sub>3</sub> с плазматическими мембранами плаценты человека.

Аполипопротеины составляют один из самых представительных классов белков плазмы крови человека. Благодаря своей амфифильной структуре эти белки обладают способностью связывать и тем самым обеспечивать солиubilизацию липидов в водном окружении плазмы. Образующиеся макромолекулярные комплексы характеризуются воспроизводимым соотношением белковой и липидной частей. Липопротеидные частицы постоянно находятся в состоянии динамического изменения, захватывая или высвобождая липиды и транспортные аполипопротеины. Последние обладают целым рядом дополнительных функций кроме транспорта липидов в клетки. Некоторые аполипопротеины действуют как кофакторы в процессах активации или ингибирования ферментов, участвующих в метаболизме липидов (аполипопротеин (апо) А-I, апоС-II, апоС-III). Другие выступают в роли лигандов для поверхностных клеточных рецепторов, необходимых для связывания, интернализации и деградации липопротеинов (апоА-I, апоА-IV, апоВ, апоЕ). Кроме того, аполипопротеины могут выполнять функции, не связанные с метаболизмом липидов, например влиять на активность тромбоцитов (апоА-I). В целом ряде прекрасных обзоров подробно описаны методы выделения и очистки аполипопротеинов, их структурно-функциональные свойства и биомедицинское значение [1-5].

Тиреоидные гормоны 3,3',5,5'-тетраиод-L-тиронин (тироксин, Т<sub>4</sub>) и 3,3',5-трийод-L-тиронин (Т<sub>3</sub>) важны для регуляции самых разнообразных метаболических процессов и, в частности, они влияют на реакции практически всех

путей метаболизма липидов. Структурные характеристики тиреоидных гормонов, их взаимодействие со специфическими транспортными и рецепторными белками и ключевые этапы механизма гормонального действия являлись предметами обсуждения во многих обзорах [6–13].

О способности липофильных молекул  $T_4$  и  $T_3$  ассоциировать с липопротеидными частицами было известно давно [14–23]. Однако системные исследования биохимических аспектов этих взаимодействий были начаты лишь в последние годы и, насколько нам известно, еще не были обобщены в обзорных статьях. С целью восполнить этот пробел мы постарались наряду с кратким изложением результатов ранних наблюдений в этой области подробно обсудить недавно опубликованные данные нескольких групп исследователей. В последующих разделах обзора главное внимание будет уделено равновесным и кинетическим параметрам комплексообразования тиреоидных гормонов с изолированными аполипопротейнами, структурным элементам и локализации  $T_4$ -связывающих центров в различных аполипопротеинах, а также биологической роли данных гормон-белковых комплексов в составе липопротеидных частиц плазмы крови человека.

### Роль аполипопротеинов в ассоциации тиреоидных гормонов с липопротеидными частицами

В период между 1960 и 1980 г. было опубликовано несколько сообщений о связывании тиреоидных гормонов с фракциями липопротеинов плазмы [14–23]. Многие из этих работ страдали методологическими недостатками, выявленными в современных публикациях, а в тот период некоторые доказательства связывания были опровергнуты другими авторами. В упомянутых работах для детекции связывания использовали иммуноэлектрофорез в комбинации с автордиографией [14], выделение липопротеидных фракций из сыворотки, меченной  $T_4$  [17], и радиоэлектрофоретический анализ  $T_4$ -связывающих белков в нормальной [19] и патологических [24] сыворотках. В частности, в последней работе электрофорез проб плазмы, уравновешенных с  $[^{125}I]T_4$  или  $[^{125}I]T_3$ , выявил зависимость связывания меченых гормонов от состава липопротеидных фракций: гиперлипипротейнемия у больных коронарным атеросклерозом сопровождалась увеличением связывания обоих гормонов с хиломикронами и  $\alpha$ -липопротеинами, а  $[^{125}I]T_3$  при этом ассоциировал и с фракцией  $\beta$ -липопротеинов. Оригинальный метод [23] «постэлектрофоретического окрашивания» электрофореграмм сыворотки  $[^{125}I]T_4$  позволил резко повысить чувствительность детекции низкоаффинных  $T_4$ -связывающих белков в связи с равномерной экспозицией всех полос гормональному «красителю». Этим методом было выявлено, что ~2% общего  $T_4$  связывается с  $\beta$ -липопротеинами и меньшее количество — с  $\alpha$ -липопротеинами.

Сомнения в истинности результатов ранних работ были вызваны использованием авторами небольшого числа проб сыворотки [14–17], неопределенным временем их хранения [17, 19, 22, 23], а также отсутствием данных об условиях равновесия в системах [14, 16, 17, 23], о корректной идентификации липопротеинов и об отсутствии в них примесей известных  $T_4$ -связывающих белков [14–19, 21–23]. В тот период была создана [25] модель взаимодействия тиреоидных гормонов с липидами, которая позволяла авторам критических работ отдавать приоритет липидному компоненту липопротеинов в связывании иодтиронинов. В этих модельных экспериментах было изучено связывание  $T_4$  и  $T_3$  с липосомами, образованными лецитином в воде. Связывание обоих гормонов плавно падало по мере повышения pH в диапазоне 6–9, вызывавшем ионизацию фенольного гидроксила молекул  $T_4$  (pK 6,5) и  $T_3$  (pK 8,4). Был сделан вывод о том, что слабая ионизация OH-группы при физиологических значениях pH поддерживает гидрофобность ароматической части молекулы иодтиронина и обуславливает ее взаимодействие с липидсодержащими системами.

Методические недостатки обсуждавшихся выше работ были в основном преодолены в более поздней работе [26]. Авторы использовали гель-хроматографию на сефарозе CL-6B для фракционирования липопротеинов свежих проб плазмы от здоровых доноров и больных с липопротеидными расстройствами, причем выделенные фракции по данным чувствительных методов не содержали примесей высокоаффинных  $T_4$ -связывающих белков. Было убедительно показано, что  $T_4$ ,  $T_3$  и реверсивный  $T_3$  взаимодействуют с липопротеинами высокой (ЛВП), низкой (ЛНП) и очень низкой плотности (ЛОНП). Относительное связывание гормонов с ЛВП, ЛНП и ЛОНП в пересчете на цельную плазму составляло соответственно 3; 0,2 и 0,03% для  $T_4$  и 6; 0,05 и 0,02% для  $T_3$ .

Косвенные данные указывали на то, что происходит взаимодействие тиреоидных гормонов с аполипипотеинами, а не солюбилизация гидрофобных молекул в липидах. Действительно, выявленный порядок уменьшения относительного связывания не мог иметь место, если бы липидный компонент давал главный вклад в ассоциацию. Конкурентное ингибирование связывания  $[^{125}I]T_4$  радиоинертным  $T_4$  указывало на ограниченную емкость центров связывания. Наконец, связывающие центры обладали способностью различать структурные особенности иодтиронинов.

Благодаря использованию  $[^{125}I]T_4$ , содержащего радиоактивный йод во внутреннем кольце иодтиронинового ядра, оказалось возможным осуществить фотоаффинное мечение ЛНП [27]. Электрофорез меченых продуктов в полиакриламидном геле в присутствии Ds-Na показал, что апоВ-100 и его протеолитические фрагменты апоВ-74 и апоВ-26 связывают меченый гормон. Ковалентное связывание метки подавлялось на 65–86% в присутствии 10 мкМ  $T_4$ . Этим же методом было показано, что за связывание  $T_4$  с ЛОНП также ответствен белковый компонент липопротеидных частиц апоВ-100.

Новый этап в исследованиях природы  $T_4$ -связывающих компонентов липопротеинов плазмы человека начался с применением методического подхода, основанного на аффинной хроматографии с использованием иммобилизованных иодтиронинов [28–31]. До этого аффинная хроматография на  $T_4$ -сефарозе применялась для выделения из плазмы человека высокоаффинного  $T_4$ -связывающего глобулина (ТСГ) [32]. В результате тщательного электрофоретического анализа препарата ТСГ, обладающего кажущейся гомогенностью, был обнаружен примесный белок с  $M_r \sim 27\,000$ , который обозначили 27К [28]. Этот белок отличался от ТСГ по заряду и иммунохимическим свойствам и полностью отделялся от ТСГ при изоэлектрическом фокусировании. Очищенный белок 27К был способен специфически присоединять  $[^{125}I]T_4$  в реакции фотоаффинного мечения и обратимо связывать  $T_4$  в условиях равновесного диализа. С помощью седиментационного анализа было установлено, что в нативных условиях белок 27К имеет молекулярную массу 66 кДа. В ходе изучения биосинтеза белка 27К *in vitro* клетками гепатомы человека Hep G2 [33] было найдено, что этот белок синтезируется клетками печени в биологически активной форме и не содержит олигосахаридных цепей. В вышедшей через три года работе [34] с помощью иммунохимической идентификации и анализа липидного состава было показано, что белок 27К представляет собой ЛВП, состоящий из двух молекул апоА-I и липидной части, включающей эфиры холестерина, фосфатидилхолин и сфингомиелин в молекулярном соотношении 5 : 9 : 2. Другая группа исследователей провела системное изучение выделения на  $T_4$ -сефарозе и идентификацию белков нормальной и ретроплацентарной сывороток человека, проявляющих сродство к тиреоидным гормонам [29–31]. Было проанализировано более ста образцов выделенных белковых смесей и наряду с ТСГ, альбумином и иммуноглобулинами в них был выявлен еще один постоянный компонент с  $M_r \sim 25\,000$  (белок 25К). Авторам [31, 35] удалось подобрать условия аффинной хроматографии, обеспечивающие максимальный выход белка 25К. Предложен также оригинальный способ его полного отделения от сопутству-

ющих  $T_4$ -связывающих белков, который заключается в селективной десорбции белка 25K с  $T_4$ -сефарозы раствором холата натрия и в его последующей очистке аффинной хроматографией на холат-сефарозе [35]. С помощью иммунодиффузии в геле, радиоиммуноанализа, ультрацентрифугирования, липидного анализа, избирательного осаждения и электрофореза показано, что выделенный белок входит в состав липопротеидных частиц высокой плотности и представляет собой апоА-I. По данным гель-хроматографии в нативных условиях апоА-I-ЛВП имел молекулярную массу  $\sim 70$  кДа. Хроматография на холат-сефарозе отделяла апоА-I от липидного компонента и не влияла на  $T_4$ -связывающие свойства очищенного аполипопротеина [35]. Выделенные альтернативными методами в двух лабораториях [28, 35] апоА-I, а также коммерческие препараты апоА-I [36], изученные в этих лабораториях, ковалентно присоединяли [ $^{125}$ I] $T_4$  в реакции фотоаффинного мечения и образовывали обратимые комплексы с тиреоидными гормонами. Таким образом, описанные двумя группами исследователей белки 27K и 25K представляли собой близкие по характеристикам препараты ЛВП, единственным белковым компонентом которых являлся апоА-I. По сути дела было выявлено ранее не известное биологическое свойство апоА-I-способность связывать тиреоидные гормоны. В независимом исследовании методом ультрафильтрации из плазмы человека был выделен апоА-I-ЛВП с молекулярной массой  $\sim 70$  кДа [37]. По-видимому, индивидуальные ЛВП, по молекулярным размерам соответствующие  $T_4$ -связывающему апоА-I-ЛВП, могут выполнять важные самостоятельные функции в организме человека.

Метод фотоаффинного мечения с последующим электрофорезом и автордиографией оказался полезным в идентификации и других  $T_4$ -связывающих аполипопротеинов. Так, было показано, что ассоциация  $T_4$  с изолированными субфракциями ЛВП<sub>2</sub> и ЛВП<sub>3</sub> опосредуется несколькими аполипопротеинами, включая апоА-I, апоА-II, апоА-IV, апоС-I, апоС-II, апоС-III и апоЕ [38].

#### Кинетические и равновесные параметры связывания тиреоидных гормонов аполипопротеинами

Изучение кинетики и термодинамики комплексообразования тиреоидных гормонов с аполипопротеинами проводилось с использованием традиционных методов разделения свободных и связанных с белком низкомолекулярных веществ. При этом учитывались свойства иодтиронинов как цвиттер-ионов, способных к электростатическим взаимодействиям с ионообменником Dowex AG 1×8 [26, 27, 36], гидрофобные характеристики тиронинового ядра, обеспечивающие прочную адсорбцию на активированном угле Norit A [39], небольшая молекулярная масса (порядка 700 Да), позволяющая проводить разделение диализом через полупроницаемую мембрану [28] или гель-фильтрацией на сефадексе G-25 [26, 36]. Приблизительную количественную оценку гормон-белкового сродства получали и в ходе экспериментов по фотоаффинному мечению. Так, принимая в расчет количества  $T_4$ , вызывающие 50%-ное ингибирование ковалентного связывания [ $^{125}$ I] $T_4$  с белком, авторы [38] определили, что значения  $K_a$  комплексов этого гормона с целым рядом аполипопротеинов (табл.1) находятся в диапазоне  $10^5 - 10^6$  М<sup>-1</sup>.

Тот же диапазон значений  $K_a$  был получен при исследовании с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-25 комплексообразования  $T_4$  с широким спектром аполипопротеинов в составе изолированных фракций ЛНП, ЛОНП и ЛВП [26]. Кинетические эксперименты показали, что за 60 мин инкубации при комнатной температуре связывание гормона с ЛНП, ЛОНП и ЛВП достигает соответственно 20, 60 и 70% от максимального.

Ионообменная хроматография на Dowex AG 1×8 была успешно применена для изучения реакции связывания  $T_4$  с апоВ-100 в составе изолированной фракции ЛНП<sub>2</sub>, не содержавшей других белковых компонентов [27]. Пока-

Параметры комплексообразования  $T_4$  аполипопротеинами человека

№ п/п	Препарат	Время достижения равновесия, мин	$K_a \cdot 10^{-5}, M^{-1}$	Число центров связывания, моль $T_4$ на 1 моль белка	Литература
1	АпоА-I (белок 27К)	—	85	1	[28]
2	АпоА-I (белок 25К)	40	400	1	[39]
3	АпоА-I	30	750	1	[36]
4	АпоВ-100-ЛНП <sub>2</sub>	—	25	3	[27]
5	ЛНП	60(20%)	1-10	—	[26]
6	ЛОНП	60(60%)	1-10	—	[26]
7	ЛВП <sub>3</sub>	60(70%)	1-10	—	[26]
	АпоА-II-ЛВП <sub>2</sub>				[38]
8	АпоА-IV-ЛВП <sub>2</sub>	—	1-10	—	[38]
	АпоЕ-ЛВП <sub>2</sub>				[38]

*Примечания.* Препараты 1 и 2 выделены аффинной хроматографией на  $T_4$ -сефарозе, 3-коммерческий препарат фирмы «Sigma», остальные препараты получены в лабораториях авторов традиционными методами химии липопротеинов. Прочерк означает, что определение данного параметра не проводилось. В скобках указаны проценты от расчетного максимального связывания в состоянии равновесия.

зано, что эта крупная макромолекула имеет три эквивалентных гормонсвязывающих центра с  $K_a = 2,5 \cdot 10^6 M^{-1}$ .

Равновесный диализ в течение 20 ч при pH 8,2 и 20° показал, что очищенный белок 27К (апоА-I-ЛВП) связывает  $T_4$  с  $K_a$ , равной  $8,5 \cdot 10^6 M^{-1}$ . Однако выбранный авторами [28] метод разделения не позволял выполнить кинетические эксперименты.

Адсорбция на активированном угле, покрытом декстраном, была использована при изучении кинетических и равновесных параметров взаимодействия иодтиронинов с апоА-I-ЛВП, выделенным аффинной хроматографией на  $T_4$ -сефарозе [39]. Связывание  $[^{125}I]T_4$  достигало максимума через 40 мин и не менялось в течение последующих 80 мин инкубации при 0–22°. Введение в систему после достижения равновесия избытка немеченного  $T_4$  вызывало диссоциацию комплекса  $[^{125}I]T_4$ , которая протекала быстрее при 22°, чем при 0–2°. В этом кинетическом эксперименте была доказана обратимость связывания тиреоидных гормонов аполипопротеинами и тем самым получены основания для определения равновесных характеристик, свойственных только обратимым процессам. Найдено, что равновесные параметры комплексообразования соответствуют модели связывающих центров одного типа со значениями  $K_a = (4,0 \pm 2,1) \cdot 10^7 M^{-1}$  и максимального связывания  $B_{max} = 1,7 \pm 0,8$  нмоль  $T_4$  на 1 мг апоА-I-ЛВП.

Кинетические данные по связыванию тиреоидных гормонов с коммерческими препаратами апоА-I («Sigma» и «Calbiochem») были получены с использованием сефадекса G-25 и Dowex AG 1×8 [36]. При 23° связывание  $T_4$  достигало максимума через 30 мин и не менялось в течение последующих 24 ч инкубации. Измерения параметров связывания в состоянии гормон-белкового равновесия дали значение  $K_a \approx 7,5 \cdot 10^7 M^{-1}$ .

В двух работах [36, 39] изучено влияние различных химических агентов и условий среды на параметры связывания тиреоидных гормонов аполипопротеинами.

Особый интерес представляют данные по действию на комплекс  $T_4$  – апоА-I известных ингибиторов связывания тиреоидных гормонов с транспортными белками, в том числе лекарственных средств [36]. По силе ингибиторного эффекта органические соединения были выделены в три группы. Наиболее сильное действие оказывали мекфеналиновая кислота, диклофенак, фуросемид, 8-анилин-1-нафталинсульфонат (АНС) и ненасыщенные жирные

кислоты: полумаксимальное ингибирование ( $I_{0,5}$ ) при концентрациях порядка  $10^{-6}$  М. Умеренное ингибирующее действие оказывали холестерин, эфиры холестерина и фосфолипиды:  $I_{0,5}$  при  $10^{-5} - 10^{-4}$  М. Слабый ингибиторный эффект был выявлен у насыщенных жирных кислот, ди- и триглицеридов, дифенилгидантоина, гепарина и барбитала:  $I_{0,5}$  при  $10^{-3}$  М.

Специфические ингибиторы, денатурирующие агенты и рН среды влияли на взаимодействие  $T_4$  с апоА-I-ЛВП [39]. Белок слабо связывал гормон при рН 5-6 и практически полностью терял сродство к иодтирони́ну при рН < 5. Поскольку ингибирующее воздействие среды при рН 5 было полностью обратимым, авторы предположили участие заряженных группировок (фенольный гидроксил в  $T_4$ , боковые цепи аминокислот белка) в стабилизации комплекса апоА-I с тиреоидным гормоном. Белковые структуры, вовлеченные во взаимодействие с  $T_4$ , необратимо разрушались при рН 3 и воздействиях 2,5 М NaCl и 3 М гуанидинхлорида. Интересно, что 4 М мочеви́на не влияла на комплексообразование, по-видимому, вследствие малого вклада водородных связей, чувствительных к мочеvine, в стабилизацию гормон-белкового комплекса. Мертиолят, трихлорацетат и АНС оказывали зависимое от концентрации обратимое ингибирующее действие на связывание  $T_4$  с апоА-I.

Результаты исследований комплексообразования в кинетическом и равновесном режимах позволяют судить о связывании тиреоидных гормонов аполипопротеинами как о зависимом от времени, насыщаемом и обратимом процессе, чувствительном к специфическим ингибиторам, денатурирующим агентам и условиям среды. Такие характеристики взаимодействия противостоят ранним представлениям о неспецифическом включении неполярных молекул иодтирони́нов в липидную или белковую части липопротеинов и подразумевают наличие в белке структурно обособленного связывающего центра, по строению комплементарного лиганду.

#### Структурные элементы и локализация участков связывания тиреоидных гормонов в молекулах аполипопротеинов

Для выявления структурных и топографических характеристик гормон-связывающих участков использовались в основном следующие четыре метода: а) определение относительного сродства аполипопротеинов к иодтирони́нам различной структуры [27, 36, 39], б) спектральный анализ изменений молекулярных состояний белка и гормона в результате комплексообразования [28, 35], в) аффинное зондирование молекул аполипопротеинов иодтирони́нами, конъюгированными с репортерными группами [35, 40-42], и соединениями, имитирующими природные лиганды [43], г) блокирование гормон-белковых взаимодействий моноклональными антителами, специфичными к отдельным фрагментам полипептидной цепи связывающего белка [44, 45].

В экспериментах по конкурентному ингибированию связывания [ $^{125}$ I] $T_4$  с апоА-I стереоизомерами и структурными аналогами  $T_4$  [36] был выявлен следующий порядок сродства иодтирони́нов к аполипопротеину: 3,3',5,5'-тетраиод-L-тиронин (L- $T_4$ ) = 3,3',5,5'-тетраиод-D-тиронин (D- $T_4$ ) = 3,3',5-трииодтироуксусная кислота = 3,3',5'-трииод-L-тиронин (r-L- $T_3$ ) > 3,3',5-трииод-L-тиронин (L- $T_3$ ) > L-тиронин. Аналогичный ряд для апоВ-ЛНП<sub>2</sub> выглядел так [27]: L- $T_4$  = D- $T_4$  = r-L- $T_3$  > L- $T_3$ .

На основании рассчитанных количественных характеристик относительного сродства тиреоидных гормонов и их структурных аналогов к апоА-I-ЛВП был построен следующий ряд [39]: L- $T_4$  (1,0) = D- $T_4$  (1,1) = L- $T_3$  (1,2) = D- $T_3$  (1,2) > 3,5-дииод-L-тиронин (10,1) = 3,3'5-трииодтироуксусная кислота (10,2) > 3,3'5-трииодтиропропионовая кислота (54,0) > 3,5-дииод-L-тирозин (1368). В скобках указана кратность превышения сродства  $T_4$  над сродством его аналога к апоА-I-ЛВП. Из данных, приведенных в этих работах, следует, что D-изомеры тиреоидных гормонов активно конкурируют с природными L-изомерами за участки связывания на аполипопротеинах.



Полное деиодирование внешнего кольца на порядок снижает сродство к апоА-I. Существенное уменьшение сродства апоА-I-ЛВП к иодтиронином вызывается также изменениями углеродного скелета алифатической цепи молекулы. Утрата лигандом структурных особенностей, характерных для иодтиронинов, превращает его в соединение, практически инертное по отношению к апо А-I, как это видно на примере дииодтирозина.

Близкие по характеру требования к структурным особенностям молекул иодтиронинов предъявляют «классические»  $T_4$ -связывающие белки ТСГ, транстиретин и альбумин, имеющие специальную химическую и пространственную организацию участков связывания [46-48]. Но в отличие от аполипопротеинов транстиретин и ТСГ способны распознавать энантиомеры иодтиронинов, тогда как альбумин подобно аполипопротеинам связывает L- и D-изомеры тиреоидных гормонов примерно с одинаковым сродством. Сравнительный анализ комплексообразования иодтиронинов с аполипопротеинами и известными  $T_4$ -связывающими белками позволил предположить [39] наличие в аполипопротеинах локальной структуры, комплементарной структуре тиреоидного гормона, т.е. связывающего центра. Хотя аполипопротеины не обладали способностью распознавать стереоизомеры иодтиронинов, окончательный вывод о стереоспецифичности их связывающих центров был сделан путем оценки оптической активности образующегося гормон-белкового комплекса. Эту и другие характеристики связывающего центра апоА-I определяли по спектральным эффектам специфического связывания интактных иодтиронинов, т.е. молекул, не содержащих конъюгированных репортерных групп [28, 35].

Анализ спектров кругового дихроизма эквимольных комплексов  $T_4$  с апоА-I, апоА-I-ЛВП (белок 25K) и субфракцией ЛВП<sub>3</sub> в области амидного хромофора и ближнем ультрафиолете показал, что оптическая активность комплексов не зависит от липидного компонента, лиганд не индуцирует изменений во вторичной структуре белка и в микроокружении его ароматических хромофоров [35]. Для сравнения следует отметить, что в комплексе  $T_4$ -ТСГ по данным спектроскопии кругового дихроизма образуется асимметричная оптически активная структура в области контакта боковых цепей аминокислотных остатков и молекулы лиганда [49]. По-видимому, связывающий центр апоА-I не создает асимметричного окружения для  $T_4$  и образовавшийся комплекс имеет низкую стереоспецифичность.

Добавление  $T_4$  к апоА-I-ЛВП (белок 27K) приводило к тушению триптофановой флуоресценции белка [28]. Аналогичный эффект был выявлен при флуориметрическом титровании тиреоидным гормоном препаратов апоА-I-ЛВП (белок 25K), апоА-I и интактной субфракции ЛВП<sub>3</sub> [35], причем в точках эквимольности флуоресценция тушилась соответственно на 31, 32 и 34%. Только в случае апоА-I изменение интенсивности флуоресценции сопровождалось сдвигом максимума испускания на 8 нм в длинноволновую область. В рамках механизма индуктивно-резонансного переноса энергии возбуждения от донора (остатки триптофана) к акцептору (молекула лиганда) в комплексе  $T_4$ -апоА-I спектральный сдвиг объясняли преимущественным тушением флуоресценции триптофанилов, расположенных в гидрофобном окружении связывающего центра. Кроме того, не исключался вклад конформационных изменений белка, индуцированных комплексообразованием и образующих новое микроокружение белковых хромофоров. Эти изменения третичной структуры полипептидной цепи могут ослабляться липидным компонентом в апоА-I-ЛВП и ЛВП<sub>3</sub> и не проявляться в виде спектрального сдвига. Действительно, исследование особенностей связывания [ $^{125}$ I] $T_4$  с ЛВП<sub>2</sub> и ЛВП<sub>3</sub> [50] показало, что меченый гормон более активно связывается с апоА-I в составе ЛВП<sub>3</sub>. Авторы предположили, что в этих двух субфракциях липопротеидных частиц апоА-I существует в разных конформациях, отличающихся по способности связывать  $T_4$ . В любом случае оказывается, что липидная часть ЛВП вовлечена в молекулярный механизм формирования спектраль-

ного отклика апоформы на связывание тиреоидного гормона. Меньшую эффективность тушения гормоном флуоресценции апоА-I по сравнению с ТСГ (более 60% [49]) объясняют большим в случае апоА-I удалением индольных хромофоров от молекулы лиганда.

Абсорбционные характеристики эквимольного комплекса  $T_4$ -апоА-I-ЛВП отличались от аддитивного спектра УФ-поглощения компонентов комплекса [35]. Отсутствие выраженных сигналов возмущенных электронных переходов триптофанов и тирозилов, как это имеет место в комплексе  $T_4$ -ТСГ [49], дало основание предположить, что разностный спектр комплекса  $T_4$ -апоА-I-ЛВП формируется в основном за счет изменения хромофорных свойств  $T_4$  в новом микроокружении связывающего центра, в частности из-за изменения степени ионизации фенольного гидроксила.

Интересные результаты были получены при использовании в спектральных исследованиях тиреоидных гормонов, модифицированных спиновой меткой [35, 40, 41] или флуоресцентным красителем [42], а также флуоресцентных зондов, имитирующих структуры природных иодтиронинов [43]. Формулы соединений и значения их относительного сродства к апоА-I приведены в табл. 2.

Спектроскопия ЭПР показала свою эффективность в исследованиях топографии активных центров ТСГ, транстиретаина и альбумина [51]. При взаимодействии спин-меченого  $T_4$  ( $T_4$ -Im) с препаратами апоА-I происходило существенное изменение формы спектра ЭПР [35, 40]. С ростом молярного соотношения белок : метка увеличивалось эффективное время вращательной корреляции и падала интенсивность низкопольного сигнала. С целью доказательства локализации аффинного спинового зонда в  $T_4$ -связывающем центре апоА-I, расположенном в глубине макромолекулы, были проведены два типа экспериментов: конкурентное вытеснение связанного  $T_4$ -Im немодифицированным  $T_4$  [35] и восстановление нитроксильного фрагмента связанной метки аскорбат-анионом [40].

Прибавление избытка  $T_4$  к комплексу  $T_4$ -Im-апоА-I приводило к восстановлению спектральных параметров, характерных для свободной формы метки в растворе. Обратимый характер изменений сигнала ЭПР указывал на то, что наблюдаемые спектральные эффекты вызваны специфическим взаимодействием  $T_4$ -Im с активным центром апоА-I, а не простой иммобилизацией спиновой метки в белковых агрегатах или неспецифических гидрофобных участках полипептидной цепи.

Реакция восстановления нитроксила протекала для комплекса  $T_4$ -Im-апоА-I значительно медленнее, чем для свободного  $T_4$ -Im. Это предполагает наличие в апоА-I полости, сформированной аминокислотными остатками, в которой молекула меченого лиганда частично экранирована от реакционно-способных компонентов растворителя. Вместе с тем сохраняющаяся активность аскорбат-аниона в отношении  $T_4$ -Im, иммобилизованного в белке, говорит об относительно небольшой глубине залегания  $T_4$ -связывающего центра в белковой глобуле.

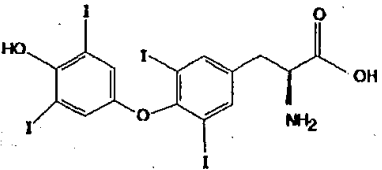
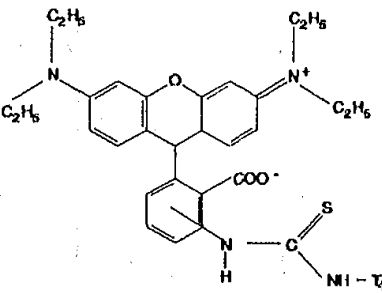
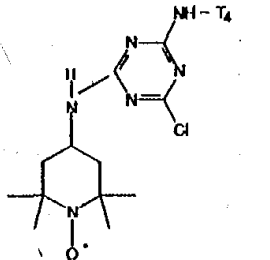
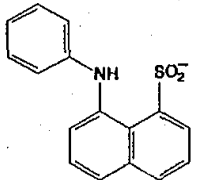
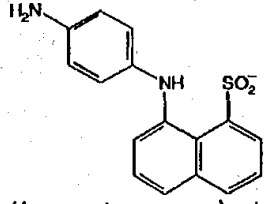
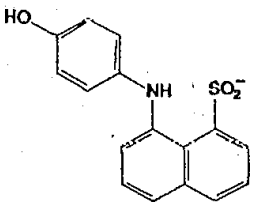
Для оценки структурно-конформационных взаимодействий между липидным компонентом и белковым  $T_4$ -связывающим участком было проведено сравнительное исследование температурных зависимостей комплексообразования  $T_4$ -Im с апоА-I и апоА-I-ЛВП (блок 25K) и в том же температурном интервале с использованием парамагнитных доксилстеариновых кислот охарактеризовано поведение липидной части липопротеина [41]. Присутствие липидного компонента вызывало низкотемпературный сдвиг на  $1^\circ$  излома на графике Аррениуса для зависимости спектральных параметров связанного  $T_4$ -Im от температуры, обуславливало снижение эффективных значений энthalпии активации гормон-белкового комплекса и приводило к уменьшению подвижности иммобилизованной метки.

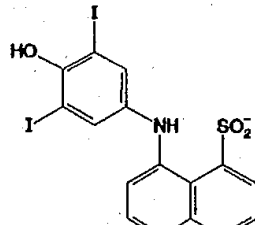
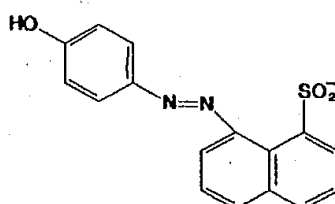
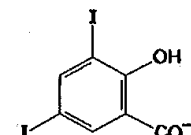
С методической точки зрения важно отметить тот факт, что параметры сигнала ЭПР 16-доксилстеариновой кислоты (C16) указывали на характер-



Таблица 2

Спектральные исследования  $T_4$ -связывающего центра апоА-I человека с использованием аффинных зондов

Химическая структура зонда	Сродство к апоА-I, %	Спектральные эффекты связывания	Литература
 Тироксин ( $T_4$ )	100	тушение на 32% и батохромный сдвиг на 8 нм в максимуме полосы флуоресценции апоА-I; дифференциальный сигнал УФ-абсорбции комплекса	[28, 35]
 Конъюгат $T_4$ -родамиин Б	1,0	увеличение в 1,5 раза интенсивности флуоресценции, усиление и гипсохромный сдвиг на 3 нм полосы абсорбции конъюгата в присутствии лигандов	[42]
 Спин-меченый $T_4$ ( $T_4$ -Im)	1,2	сигнал ЭПР метки, иммобилизованной в $T_4$ -связывающем центре у поверхности белковой глобулы	[35, 40, 41]
 8-Анилин-1-нафталин-сульфонат (АНС)	0,2	тушение на 40% флуоресценции апоА-I; увеличение интенсивности в 46 раз и гипсохромный сдвиг на 50 нм в максимуме флуоресценции зонда	[43]
 1-(4-аминофениламино)нафталин-8-сульфонат ( $NH_2$ -АНС)	0,06	тушение на 21% флуоресценции апоА-I; увеличение интенсивности в 2,2 раза и гипсохромный сдвиг на 50 нм в максимуме флуоресценции зонда	[43]
 1-(4-оксифениламино)нафталин-8-сульфонат ( $OH$ -АНС)	0,5	тушение на 13% флуоресценции апоА-I; увеличение интенсивности на 30% и гипсохромный сдвиг на 5 нм в максимуме флуоресценции зонда	[43]

 <p>1-(3,5-диiod-4-оксифениламино) нафталин-8-сульфонат (ди-I(OH)-АНС)</p>	1,1	тушение на 6% флуоресценции апоА-I; увеличение интенсивности в 5 раз и гипсохромный сдвиг на 8 нм в максимуме флуоресценции зонда	[43]
 <p>8-(4-оксифенилазо)нафталин- 1-сульфонат (ОН-азо-АНС)</p>	0,8	увеличение в 3 раза общей интенсивности флуоресценции зонда и появление в спектре двух максимумов, сдвинутых в коротковолновую область на 8 и 15 нм относительно максимума свободного зонда	[43]
 <p>Диiodсалицилат</p>	0,5	тушение на 20% флуоресценции апоА-I; увеличение интенсивности в 2,8 раза и гипсохромный сдвиг на 2 нм в максимуме флуоресценции зонда	[43]

*Примечание.* Относительное сродство определялось в экспериментах по конкурентному ингибированию зондом связывания [ $^{125}\text{I}$ ]T<sub>4</sub> с апоА-I и рассчитывалось по отношению концентраций зонда и T<sub>4</sub>, при которых из комплекса [ $^{125}\text{I}$ ]T<sub>4</sub>-апоА-I вытеснялось 50% меченого гормона.

ную для ЛВП интактную липидную структуру белка 25К, выделенного аффинной хроматографией. Форма и параметры спектра ЭПР 5-доксилстеариновой кислоты (С5), нитроксильный фрагмент которой должен локализоваться вблизи поверхности фосфолипидного монослоя апоА-I-ЛВП, указывали на высокую упорядоченность полярных липидов, свойственную всем классам интактных липопротеидных частиц [41].

Прибавление эквимольного белка количества T<sub>4</sub> к комплексу апоА-I-ЛВП - С16 приводило к существенному увеличению времени вращательной корреляции спиновое зонда и линеаризации графика Аррениуса. Эти изменения могли вызываться достаточно глубокой реорганизацией липидного матрикса. В то же время связывание эквимольного количества T<sub>4</sub> с комплексом апоА-I-ЛВП - С5 не вызывало достоверных изменений параметра порядка S. Тем не менее авторы [41] отмечают взаимосвязь между спектральными параметрами, характеризующими резкое уменьшение упорядоченности полярного липидного слоя апоА-I-ЛВП в температурном интервале 20-25°, и перегибом при 23° на кривой Аррениуса для комплекса апоА-I-ЛВП с T<sub>4</sub>-Im. Этот перегиб с большой степенью вероятности можно интерпретировать как следствие структурной перестройки белкового домена, включающего T<sub>4</sub>-связывающий центр. В целом конформационные изменения белкового компонента в диапазоне 20-50°, сопровождающиеся падением T<sub>4</sub>-связывающей активности [31], находили больший отклик в полярной фосфолипидной зоне (глубина ~ 8 Å), чем в области терминальных углеводородных звеньев фосфолипидов на глубине порядка 22 Å, куда способна погружаться парамагнитная группа С16.

Поскольку прямое сопряжение между структурными изменениями апо-липопротеина и липидами гидрофобного ядра выявлено не было, авторы [41]

считают, что наблюдаемые спектральные эффекты взаимодействия парамагнитных лигандов с апоА-I можно объяснить локализацией  $T_4$ -связывающего центра в белковом домене, конформационно связанным с поверхностным полярным монослоем липидного матрикса.

Использование в качестве репортерной метки флуоресцентного красителя родамина В, присоединенного тиокарбамильной связью к молекулам  $T_4$  и  $T_3$ , позволило проводить наблюдения за комплексообразованием тиреоидных гормонов с апоА-I и апоА-I-ЛВП в видимой части спектра [42]. Связывание флуоресцентных конъюгатов с апоА-I практически не меняло параметры абсорбции и флуоресценции родаминового хромофора. Взаимодействие конъюгатов с апоА-I-ЛВП вызывало существенное увеличение интенсивности и голубой сдвиг на 3 нм максимума поглощения, а также увеличение в 1,5 раза амплитуды полосы флуоресценции при 586 нм. Спектральные эффекты взаимодействия авторы объясняют, исходя из модели, предусматривающей переход от свернутой («сандвичевой») структуры конъюгата к молекулярному состоянию, в котором обеспечивается свободное вращение фрагментов гормона и красителя в конъюгате без взаимодействия между ними [52]. Нарушение сандвичевой структуры происходит только при связывании конъюгата с липидсодержащим белковым препаратом. Этот результат согласуется с наблюдениями, сделанными с помощью коротковолновой флуоресцентной спектроскопии и ЭПР [35, 41], о том, что липидный компонент апоА-I-ЛВП вносит собственный вклад в механизм комплексообразования тиреоидных гормонов с липопротеидными частицами.

Третью группу соединений, применявшихся для аффинного зондирования области  $T_4$ -связывающего центра апоА-I [43], составляют флуоресцентные зонды, не содержащие иодтирониновую структуру как таковую, но по своему пространственному строению имитирующие тиреоидные гормоны. Молекулярные основы этого методического подхода были заложены кристаллографическими исследованиями [53], которые показали, что молекула АНС обладает конформационной гибкостью и воплощает в себе псевдоиодтирониновую пространственную структуру и конформацию метки-репортера природы белкового микроокружения. Доказано, что АНС взаимодействует с  $T_4$ -связывающими центрами ТСГ [54] и транстирстина [55] и параметры флуоресцентного сигнала дают полезную информацию о химической природе гормонсвязывающих центров этих белков. В развитие этого методического подхода широкий ряд производных АНС и салицилата (табл. 2) был использован для изучения структурных особенностей участка связывания в апоА-I [43].

Относительная интенсивность флуоресценции, индуцированной связыванием зондов с апоА-I, падала в ряду АНС > ди-I(OH)-АНС > OH-азо-АНС > > диодсалицилат >  $NH_2$ -АНС > OH-АНС > салицилат, а величина гипсохромного сдвига максимума эмиссии уменьшалась в следующем порядке: АНС =  $NH_2$ -АНС > OH-азо-АНС > ди-I(OH)-АНС > OH-АНС > диодсалицилат > салицилат. Ингибирующее действие зондов на комплексообразование между  $[^{125}I]T_4$  и апоА-I зависело от природы заместителей в бензольном кольце: ди-I(OH)-АНС > OH-азо-АНС > диодсалицилат > OH-АНС > АНС > >  $NH_2$ -АНС > салицилат. Высказано предположение, что  $T_4$ -связывающий центр апоА-I сформирован в основном гидрофобными боковыми цепями аминокислотных остатков, включает химическую группировку, взаимодействующую с ионизированной оксигруппой, и содержит полости, которые способны вместить атомы иода, присоединенные к бензольному ядру молекулы лиганда.

Поскольку концепция существования структурно обособленных специфических центров связывания тиреоидных гормонов в аполипопротеинах получила широкое экспериментальное подтверждение, встал вопрос о расположении этих центров на полипептидной цепи. В качестве реперных участков в первичной структуре апоВ-100, включающей 4536 аминокислотных остатков, были выбраны центры связывания гепарина и домен, ответственный за

взаимодействие апоВ-100 с клеточным рецептором ЛНП [44]. Методический подход исследователей заключался в оценке ингибиторных эффектов гепарина и пяти различных анти-апоВ-100 моноклональных антител на мечение апоВ-100 и его протеолитических фрагментов в фотохимической реакции с  $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ . Найдено, что один из  $\text{T}_4$ -связывающих центров расположен во фрагменте апоВ-26 (остатки 474–539), второй входит в состав апоВ-44 (остатки 1438–1481), а третий локализован в С-концевой части белка (апоВ-30, остатки 3250–4536). Все три  $\text{T}_4$ -связывающих центра находятся вне домена, взаимодействующего с клеточным рецептором, и удалены от гепаринсвязывающих центров. Аналогичный экспериментальный подход был применен для определения локализации  $\text{T}_4$ -связывающего центра в апоА-I [45]. В этой работе с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии Ds-Na и автордиографии изучали продукты реакции фотоаффинного мечения  $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$  делипидированного апоА-I и его липидных комплексов (ЛВП<sub>2</sub> и ЛВП<sub>3</sub>) в присутствии девяти анти-апоА-I моноклональных антител, различающихся по эпитопным специфичностям. Определили, что единственный  $\text{T}_4$ -связывающий сайт расположен в N-концевой части белка вблизи эпитопного участка, образованного остатками 1–16, в удалении от кластера положительно заряженных основных остатков, которые находятся в средней части молекулы и способны связывать гепарин. Кроме того, было показано, что ассоциация апоА-I с липидами сопровождается конформационной перестройкой белка, изменяющей пространственные соотношения между  $\text{T}_4$ -связывающим центром и отдельными эпитопами белковой структуры.

#### Роль аполипопротеинов во взаимодействии тиреоидных гормонов с клеткой

Содержание не связанных с белками («свободных») тиреоидных гормонов в плазме крови человека не превышает 0,1% от их общей концентрации. Однако на протяжении многих лет молекулярные механизмы физиологических процессов с участием  $\text{T}_3$  и  $\text{T}_4$  объясняли биологической активностью только свободной фракции гормонов. Гипотеза «свободных гормонов», которая была выдвинута еще в 50-х годах [56, 57], затем получила экспериментальное и теоретическое развитие [58] и была представлена в виде физиологически обоснованной математической модели [59]. В последние годы получены экспериментальные доказательства проникновения тиреоидных гормонов в ткани и реализации гормонального эффекта при посредстве индивидуальных  $\text{T}_4$ -связывающих белков сыворотки. Ключевую роль в этих процессах играет взаимодействие гормон-белкового комплекса с клеточным рецептором ТСГ [60], транстиретином [61] или иммуноглобулинов [62].

Известно, что многие типы клеток человека имеют поверхностные рецепторы апоВ-100 и апоЕ, участвующие в доставке холестерина в клетку путем связывания и последующей интернализации комплекса ЛНП-рецептор [63]. На существовании этого механизма была основана гипотеза о физиологической роли комплекса тиреоидного гормона с ЛНП, которая недавно получила экспериментальную проверку [64]. Авторы изучили поглощение  $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$  и  $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$  фибробластами кожи человека, выращенными в присутствии обедненной липопротеинами сыворотки. При добавлении в среду фракции ЛНП, апоВ-100 или апоЕ в концентрациях, достаточных для связывания гормона, но не превышающих емкость клеточного рецептора, наблюдали увеличение на 27–63% начальной скорости поглощения и количества поглощенного  $\text{T}_4$  (но не  $\text{T}_3$ ) в состоянии равновесия. Этот эффект отсутствовал у клеток с дефицитом рецепторов (наследственная гиперхолестеринемия, низкая экспрессия рецепторов при избытке холестерина в среде). Специфический характер действия ЛНП и соответствующих аполипопротеинов подтверждался тем фактом, что другие  $\text{T}_4$ -связывающие белки, наоборот, пропорционально своим концентрациям в среде снижали количество  $\text{T}_4$ , проникающего в клетку. Авторы [64] предположили, что существуют два пути транспорта  $\text{T}_4$

в фибробласты. Первый – через центры связывания свободного гормона на клеточной поверхности, второй, дополнительный путь, не доступный для  $T_3$ , – через рецепцию комплекса  $T_4$ -ЛНП и интернализацию последнего.

Поскольку рецепторы липопротесинов всех главных классов присутствуют в такой важной ткани-мишени тиреоидных гормонов, как плацента человека [65, 66], в литературе [64] высказывалось предположение, что липопротеины могут путем рецепции и трансплацентарного перехода доставлять тиреоидные гормоны из плазмы матери к плоду. Однако первые эксперименты *in vitro* с плазматическими мембранами плаценты человека показали, что из широкого ряда изученных  $T_4$ -связывающих белков, включая апоА-I, лишь иммуноглобулин М оказывает стимулирующее действие на связывание  $T_3$  (но не  $T_4$ ) с мембранами синцитиотрофобласта [62].

Создается впечатление, что каждый отдельный  $T_4$ -связывающий белок выполняет специализированную функцию по доставке одного из двух тиреоидных гормонов, в специфическую ткань. В этом и может состоять биологический смысл существования в плазме крови человека многокомпонентной системы  $T_4$ -связывающих белков, важными представителями которой являются аполипопротеины.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Osborne J.C., Jr, Brewer H.B., Jr. Adv. Protein Chem. 1977. V. 31. P. 253–337.
2. Plasma Lipoproteins. Methods Enzymol. 1986. Part A. V. 128. Part B. V. 129.
3. Scanni A.M. The Plasma Proteins. V. 5. N.Y.: Acad. Press, 1987. P. 142–190.
4. Торховская Т.И., Халилов Э.М. Вopr. мед. химии. 1988. Т. 34. С. 2–12.
5. Возизян П.А., Холодова Ю.Д. Укр. биохим. журн. 1989. Т. 61. С. 22–41.
6. Тиреоидные гормоны. Под ред. Туракулова Я.Х. Ташкент: Фан, 1972.
7. Cody V. Recent Prog. Horm. Res. 1978. V. 34. P. 437–475.
8. Eberhardt N.L., Apriletti J.W., Baxter J.D. Biochemical Actions of Hormones. V. 7. Ed. Litwack G. N.Y.: Acad. Press, 1980. P. 312–394.
9. Hoch F.L. Prog. Lipid Res. 1988. V. 27. P. 199–270.
10. Nunez J. Hormones and Their Actions. Ed. Cooke B.A., King R.J.B., van der Molen H.J. Amsterdam: Elsevier Sci. Publ., 1988. P. 61–80.
11. Bartalena L. Endocr. Rev. 1990. V. 11. P. 47–64.
12. Hennemann G., Docter R. The Thyroid Gland. Ed. Greer M.A. N.Y.: Raven Press, 1990. P. 221–230.
13. Schussler G.C. Thyroid. 1990. V. 1. P. 25–34.
14. Clausen J., Munkner T. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1960. V. 104. P. 40–42.
15. Toro-Goyco E., Cancino M. Science. 1963. V. 139. P. 761–763.
16. Hollander C.S., Latimer B.H., Preut T.E., Lockwood D.H., Asper S.P. Metabolism. 1963. V. 12. P. 45–48.
17. Sterling K., Brenner A., Rose H.C. Endocrinology. 1965. V. 77. P. 398–402.
18. Lightfoot R.W., Christian C.L. J. Clin. Endocrinol. 1966. V. 26. P. 305–308.
19. Miyai K., Itoh K.F., Abe H., Kumahara Y. Clin. Chim. Acta. 1968. V. 22. P. 341–345.
20. Freeman T., Pearson J.D. Clin. Chim. Acta. 1969. V. 26. P. 365–368.
21. Von Kostner G., El Eisch I.A. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 1970. Bd. 8. S. 60–65.
22. Itoh K. Folia Endocrinol. (Jpn). 1970. V. 46. P. 559–568.
23. Hoch H., Lewallen C.G. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1974. V. 38. P. 663–674.
24. Лувшин И.Б., Шерстюк Г.В. Лабор. дело. 1980. № 7. С. 409–412.
25. Hiller A.P. J. Physiol. 1970. V. 21. P. 585–597.
26. Benvenega S., Gregg R.E., Robbins J. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1988. V. 67. P. 6–16.
27. Benvenega S., Cahnmann H., Gregg R., Robbins J. Biochimie. 1989. V. 71. P. 263–268.
28. Grimaldi S., Bartalena L., Carlini F., Robbins J. Endocrinology. 1986. V. 118. P. 2362–2369.
29. Свиридов О.В., Ермоленко М.Н., Карпыза Е.И., Стрельченко О.А. Весті АН Беларусі. Сер. біал. н. 1988. № 3. С. 115–116.
30. Свиридов О.В., Ермоленко М.Н., Стрельченко О.А. Биохимия. 1989. Т. 54. С. 495–502.
31. Свиридов О.В., Ермоленко М.Н., Пышко Е.С., Карпова Т.В., Стрельченко О.А. Биохимия. 1990. Т. 55. С. 329–337.
32. Gershengorn M.C., Cheng S.-Y., Lippoldt R.E., Lord R.S., Robbins J. J. Biol. Chem. 1977. V. 252. P. 8713–8718.
33. Bartalena L., Grimaldi S., Fleischmann K., Robbins J. Endocrinology. 1986. V. 118. P. 2370–2374.
34. Benvenega S. Endocrinology. 1989. V. 124. P. 1265–1269.
35. Свиридов О.В., Ермоленко М.Н., Пышко Е.С., Халимончик С.В., Гуритович Н.А., Романов С.Л., Киселев П.А., Стрельченко О.А. Биохимия. 1991. Т. 56. С. 2281–2296.
36. Benvenega S., Cahnmann H.J., Gregg R.E., Robbins J. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1989. V. 68. P. 1067–1072.
37. Atmeh R.F. J. Lipid Res. 1990. V. 31. P. 1771–1780.

38. Benavenga S., Cahnmann H.J., Rader D., Kindt M., Robbins J. *Endocrinology*. 1992. V. 131. P. 2805-2811.
39. Свиридов О.В., Пышко Е.С., Ермоленко М.Н. *Биохимия*. 1990. Т. 55. С. 2002-2010.
40. Бовдей И.А., Свиридов О.В., Киселев П.А. *Журн. прикл. спектр.* 1992. Т. 57. С. 315-321.
41. Бовдей И.А., Свиридов О.В., Киселев П.А. *Биохимия*. 1993. Т. 58. С. 707-715.
42. Ермоленко М.Н., Фильченков И.А., Свиридов О.В. *Биохимия*. 1992. Т. 57. С. 1271-1278.
43. Пышко Е.С., Фильченков И.А., Свиридов О.В. *Журн. прикл. спектр.* 1993. Т. 58. С. 305-311.
44. Benavenga S., Cahnmann H.J., Robbins J. *Endocrinology*. 1990. V. 127. P. 2241-2246.
45. Benavenga S., Cahnmann H.J., Robbins J. *Endocrinology*. 1991. V. 128. P. 547-552.
46. Sterling K., Tabachnik M. *J. Biol. Chem.* 1961. V. 236. P. 2241-2243.
47. Snyder S.M., Cavalieri R.R., Goldfine I.D., Ingbar S.A., Jorgensen E.C. *J. Biol. Chem.* 1976. V. 251. P. 6489-6494.
48. Andrea T.A., Cavalieri R.R., Goldfine I.D., Jorgensen E.C. *Biochemistry*. 1980. V. 19. P. 55-63.
49. Свиридов О.В., Ермоленко М.Н. *Весті АН Беларусі. Сер. хім. н.* 1987. № 5. С. 59-64.
50. Benavenga S., Cahnmann H.J., Rader D., Kindt M., Robbins J. *Thyroid*. 1991. V. 1 (Suppl.). P. 55.
51. Cheng S.-Y., Rakhit G., Erard F., Robbins J., Chignell C.F. *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. P. 831-836.
52. Edelhoch H., Cheng S.-Y., Irace G. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1981. V. 366. P. 253-264.
53. Cody V., Hazel J. *J. Med. Chem.* 1977. V. 20. P. 12-17.
54. Green A.M., Marshall J.S., Pensky J., Stanbury J.B. *Science*. 1972. V. 175. P. 1378-1380.
55. Cheng S.-Y., Pages R.A., Saroff H.A., Edelhoch H., Robbins J. *Biochemistry*. 1977. V. 16. P. 3707-3712.
56. Recant L., Riggs D.S. *J. Clin. Invest.* 1952. V. 31. P. 789-797.
57. Robbins J., Rall J.E. *Recent Prog. Horm. Res.* 1957. V. 13. P. 161-208.
58. Ekins R. *Thyroid Hormone Metabolism*. Ed. Hennemann G. N. Y.: Marcel Dekker, 1986. P. 77-106.
59. Mendel C.M. *Endocr. Rev.* 1989. V. 10. P. 232-274.
60. Hashizume K., Sakurai A., Migamoto T., Yamauchi K., Nishii Y. *Endocrinol. (Jap)*. 1986. V. 33. P. 665-674.
61. Divino C.M., Schussler G.C. *J. Biol. Chem.* 1990. V. 256. P. 1425-1429.
62. Карпыза Э.И., Киклевич И.Е., Ермоленко М.Н., Свиридов О.В. *Биохимия*. 1993. Т. 58. С. 285-293.
63. Goldstein J.L., Barz S.K., Brown M.C. *Methods Enzymol.* 1983. V. 98. P. 241.
64. Benavenga S., Robbins J. *Endocrinology*. 1990. V. 126. P. 933-941.
65. Gummings S.W., Hatley W., Simpson E.R., Ohashi M. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1982. V. 54. P. 903-908.
66. Naoum H.G., De Chazal R.C.S., Eaton B.M., Contracter S.F. *Biochim. et biophys. acta*. 1987. V. 902. P. 193-199.

Поступила в редакцию

07.12.93

После доработки

17.01.94

O.V. SVIRIDOV

## A NOVEL PROPERTY OF THE KNOWN PROTEINS: SPECIFIC BINDING OF THYROID HORMONES TO HUMAN PLASMA APOLIPOPROTEINS

*Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of Belarus', 220141 Minsk,  
Zhodinskaya ul., 5/2; fax: (0172)60-65-89*

**Key words:** apolipoproteins, thyroid hormones, thyroxine, triiodothyronine.

The thyroid hormones – thyroxine ( $T_4$ ) and triiodothyronine ( $T_3$ ) – are capable of associating with human plasma high (HDL), low (LDL) and very low density lipoprotein particles (VLDL). Apolipoproteins (apo) act as the hormone-binding components of the lipoprotein particles. The thyroid hormone binding to apolipoproteins is a time-dependent, reversible, saturable and sensitive to specific inhibitors. Interaction with the structurally isolated site in the protein which is complementary to the ligand. The number of such sites per macromolecule varies from one (apoA-I) to three (apoB-100). Low affinities ( $K_a \sim 10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) for  $T_4$  are characteristic of apoA-II, apoA-IV, apoE and apoB-100, while apoA-I and its lipid complex, apoA-I-HDL display sufficiently high affinities for the hormone ( $K_a \sim 10^7 - 10^8 \text{ M}^{-1}$ ). The active site of apoA-I-HDL contains a chemical group interacting with the ionized phenolic ring hydroxy-group of  $T_4$ , includes cavities capable of accommodating iodine atoms of the ligand molecule, has a hydrophobic nature and low stereospecificity and is located close to the surface of the protein globule in the N-terminal part of polypeptide chain conformationally associated with the polar surface monolayer of the lipid matrix. Three hormone-binding sites in apoB-100 are located in different regions of the polypeptide chain which are distant from each other and lie outside the sites of heparin and cellular LDL receptor binding. ApoB-100 and apoE stimulate  $T_4$  entry into fibroblasts, while apoA-I inhibits the interaction of  $T_4$  and  $T_3$  with human placental plasma membranes.