

ХАРАКТЕРИСТИКИ СВЯЗЫВАНИЯ ТИРОКСИНА С ФРАКЦИЯМИ ЛИПОПРОТЕИНОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ И АПОЛИПОПРОТЕИНОМ А-I

Лев Михайлович ПОЛЯКОВ, Роман Александрович КНЯЗЕВ,
Александр Владимирович РЯБЧЕНКО, Наталия Викторовна ТРИФОНОВА,
Мария Владимировна КОТОВА

*НИИ биохимии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2*

Целью исследования было изучение способности различных фракций липопротеинов плазмы крови человека (очень низкой (ЛПОНП), низкой (ЛПНП) и высокой плотности (ЛПВП) подфракций 2 (ЛПВП₂) и 3 (ЛПВП₃)) связываться с тироксином (Т₄). Методами хроматографии на сефарозе CL-2В показано, что значительная часть меченого ¹²⁵I-тироксина элюируется в объеме выхода фракции ЛПВП, что может свидетельствовать о возможности образования комплексов ЛПВП с Т₄. Процесс носил обратимый характер, поскольку введение в данную систему избыточного количества (10⁻⁶–10⁻⁷ М) немеченого Т₄ приводило к вытеснению ¹²⁵I-Т₄ из комплексов с ЛПВП, что свидетельствует о взаимодействии типа «белок – лиганд». Исследовано влияние условий среды на образование комплексов Т₄ с ЛПВП. Повышение температуры до 40 °С приводило к более чем 50%-му снижению выхода радиоактивности с фракцией ЛПВП. Комплексообразование уменьшалось при 4 °С, однако при этом комплексы отличались наибольшей устойчивостью. Методом тушения триптофановой флуоресценции получены основные физико-химические характеристики взаимодействия Т₄ с подфракциями ЛПВП₂, ЛПВП₃. Константы комплексообразования ЛПВП с Т₄ составили порядка 10⁶–10⁷ М⁻¹. Наибольшее сродство к Т₄ обнаружено для частиц подфракции ЛПВП₃. Установлено, что в комплексообразовании с Т₄ принимает участие основной белковый компонент ЛПВП – аполипопротеин А-I, у которого имеется один центр связывания.

Ключевые слова: липопротеины высокой плотности, тироксин, аполипопротеин А-I.

Тиреоидные гормоны (тироксин и трийодтиронин) необходимы для нормального роста и развития организма. Их основная часть находится вне щитовидной железы, причем более 99 % циркулирующих в крови тиреоидных гормонов связана с белками плазмы, главным образом с тироксинсвязывающим глобулином, тироксинсвязывающим преальбумином (транстиретином) и альбумином у человека, а также с транстиретином и альбумином у грызунов [6]. В количественном отношении более важен тироксинсвязывающий глобулин, который представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 50 кДа. На его долю приходится 75 % тироксина (Т₄) и 85 % трийодтиронина (Т₃), которые связываются с ним

со сродством, в 100 раз превышающим таковое для транстиретина [5]. Роль белков-переносчиков в процессах транспорта тиреоидных гормонов заключается в предупреждении потери гормонов через почки и печень. Свободная фракция тиреоидных гормонов крайне мала и составляет 0,03 % для Т₄ и 0,3 % для Т₃. Однако именно это небольшое количество свободных гормонов определяет их биологическую активность. Несмотря на большую разницу в концентрации общих гормонов (связанных и несвязанных) в сыворотке крови (80 нг/мл для Т₄ и 1,5 нг/мл для Т₃), различное сродство белков-переносчиков к тиреоидным гормонам обеспечивает близкую их концентрацию в несвязанной, активной форме [5, 7].

Поляков Л.М. – д.м.н., проф., зав. лабораторией медицинской биотехнологии, e-mail: plm@niibch.ru

*Князев Р.А. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии,
e-mail: Knjazev_roman@mail.ru*

*Рябченко А.В. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии,
e-mail: borrelia@mail.ru*

*Трифорова Н.В. – младший научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии,
e-mail: nataliya-tverdohleb@yandex.ru*

*Котова М.В. – младший научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии,
e-mail: zerokiri@mail.ru*

По аналогии со стероидными гормонами молекулярные механизмы различных проявлений тиронинов объясняет гипотеза «свободных гормонов», утверждающая, что биологической активностью обладает только фракция не связанных с белками плазмы гормонов [6]. Однако в последние годы получены экспериментальные доказательства, что клеточный приток и отток тиреоидных гормонов происходит при участии трансмембранных белковых транспортеров: монокарбоксилатных транспортеров (MCT8), (MCT10) и транспортирующего органического анион-полипептида IC1 (OATP1C1) [8–10]. Считается, что из этих транспортеров MCT8 является единственным специфичным транспортером для гормонов щитовидной железы и некоторых их производных [3]. Следует заметить, что роль других белков плазмы в транспорте тиреоидных гормонов в ткани-мишени в течение длительного времени была спорной несмотря на отдельные сообщения о способности T_4 образовывать комплексы с липопротеиновыми частицами низкой плотности [2].

Целью исследования было изучение способности различных фракций липопротеинов плазмы крови человека (очень низкой (ЛПОНП) и низкой плотности (ЛПНП), высокой плотности подфракций 2 (ЛПВП₂) и 3 (ЛПВП₃)) связываться с тироксином.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Выделение фракций липопротеинов из плазмы крови человека проводили методом изоплотного ультрацентрифугирования в растворах KBr в присутствии 3 мМ ЭДТА- Na_2 на центрифуге OptimaL-90K (Beckman-Coulter, Австрия) с использованием ротора 70.1 Ti. [4]. Получали три основные фракции липопротеинов: ЛПОНП ($0,94 < d < 1,006$ г/мл), ЛПНП ($1,006 < d < 1,063$ г/мл) и ЛПВП ($1,063 < d < 1,21$ г/мл). Фракцию липопротеинов высокой плотности разделяли на два подкласса: ЛПВП₂ ($1,063 < d < 1,125$ г/мл) и ЛПВП₃ ($1,125 < d < 1,21$ г/мл).

Делипидирование липопротеинов проводили охлажденной смесью хлороформа и метанола (1:1) из расчета 20 мл смеси на 1 мл липопротеинов с последующей многократной отмывкой эфиром. Для получения аполипипропротеина А-I (апо А-I) суммарные белки ЛПВП в растворе 3%-го додецилсульфата натрия (Ds-Na) и 0,1%-го меркаптоэтанола наносили на колонку ($1,6 \times 100$ см) с сефарозой CL-2B («Pharmacia», Швеция) и элюировали 5мМ Трис-НСl буфером, рН 8,6, содержащим 6М мочевины, 0,01 % азида натрия и 1мМ фенолметансульфонилфторид.

Скорость потока – 10 мл/ч, скорость самописца – 9 мм/ч. Профиль элюции регистрировали на УФ-детекторе 2151 (LKB, Швеция) при длине волны 280 нм. Чистоту апо А-I проверяли с помощью электрофореза в 10 %-м полиакриламидном геле с Ds-Na. Белковые полосы визуализировали 0,1%-м Кумасси G-250 в смеси метанола и 10%-й уксусной кислоты (1 : 1). При электрофорезе апо А-I мигрировал в геле одной полосой и не содержал примесей других белков. В качестве маркеров использовали набор низкомолекулярных белков-стандартов (фосфоорилаза – 94 кДа, альбумин – 67 кДа, овальбумин – 43 кДа, карбоангидраза – 30 кДа и лактальбумин – 14,4 кДа).

Фракции ЛП и апо А-I обессоливали методом гель-фильтрации (колонка: $40 \times 0,8$ см, сефадекс G-25 (Pharmacia, Швеция), элюент: 5мМ трис-НСl буфер, рН 7,4, содержащий 0,15М NaCl, скорость элюции – 30 мл/ч, скорость самописца – 9 см/ч). Профиль элюции регистрировали на УФ-детекторе при длине волны 280 нм. Концентрацию белка определяли на спектрофотометре Evolution 300 («ThermoScientific», США) в ЦКП «Спектрометрические измерения» на базе НИИ биохимии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины (г. Новосибирск). Концентрация белка в обессоленных пробах составляла 0,1 мг/мл.

В работе использовали ^{125}I - T_4 со специфической активностью 750–1250 МКи/мг (Amerham, Великобритания). Рабочий раствор (1 мМ) немеченного L- T_4 (Calbiochem, США) в 96%-м этаноле готовили из 10мМ маточного раствора, содержащего 0,05н NaOH, и охлаждали до -20 °С. После обессоливания фракции ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП (по 0,5 мл, 0,5–1,5 мг белка) смешивали, инкубировали с ^{125}I - T_4 (0,1–0,3 нмоль/л) в течение 30 минут при 20 °С и подвергали хроматографическому разделению на колонке ($1,6 \times 100$ см, сефароза CL-2B), не содержащей 6М мочевины. Полученные фракции анализировали на гамма-счетчике WIZARD-1470 (Wallac, Финляндия) в ЦКП «Современные оптические системы» НИИ экспериментальной и клинической медицины ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины (г. Новосибирск).

Расчет констант ассоциации осуществляли методом тушения триптофановой флуоресценции [1]. Измерения проводили на спектрофлуориметре RF-5301PC (Shimadzu, Япония) при длине волны возбуждения 285 нм и эмиссии в диапазоне от 300 до 600 нм. Титрование выполняли в термостатируемой кювете при температуре 20 °С с добавлением аликвот рабочего раствора (1 мМ) немеченного L- T_4 (по 1 мкл) к 2 мл ЛПВП и апо А-I. Концентрация этанола в конце опыта не

превышала 0,5 %. Тушение флуоресценции, обусловленное этанолом, составляло ~5 % от общего снижения флуоресценции и учитывалось при построении соответствующих кривых. Молекулярные массы ЛПВП₂, ЛПВП₃ и апо А-I принимались за 400, 200 и 28 кДа соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения взаимодействия фракций ЛП (ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП) с тироксином использовали метод хроматографического разделения на колонке с сефарозой CL-2В без присутствия 6М мочевины. Меченый T₄ элюировался двумя основными пиками (рис. 1). Первый пик совпадал с объемом выхода ЛПВП, а второй пик соответствовал объему выхода «свободного» гормона. На фракции ЛПОНП и ЛПНП приходилось менее 10–15 % радиоактивности. Процесс носил обратимый характер. Введение в данную систему избыточного количества (10⁻⁶–10⁻⁷ М) немеченного T₄ приводило к вытеснению ¹²⁵I-T₄ из комплексов с ЛПВП, что может свидетельствовать об определенном взаимодействии типа «белок – лиганд» (рис. 2). Отмечена зависимость связывания от температуры. Повышение температуры до 40 °С приводило к более чем 50%-му снижению выхода радиоактивности с белком. Образование комплексов несколько уменьшалось при 4 °С, однако при этом они отличались наибольшей устойчивостью. Комплексы ЛПВП-T₄ были довольно устойчивы и не разрушались в процессе хроматографического разделения при физиологических значениях рН. Характерно, что основная часть меченого T₄ связывалась с подфракцией ЛПВП₃,

а не с ЛПВП₂. Данный факт, по нашему мнению, может также свидетельствовать о том, что в подфракциях ЛПВП₃ и ЛПВП₂ основной структурообразующий частицу белок (апо А-I) находится в конформациях, отличающихся по способности связывать T₄ амфипатными областями полипептидной цепи.

Для анализа взаимодействий типа «белок – лиганд» используются данные спектра поглощения или излучения. Спектральные способы обусловлены различием спектральных характеристик комплексов и транспортирующего «лиганд» белка. Высокая специфичность и чувствительность флуоресцентных методов позволяет широко применять их при изучении подобных процессов. Из трех флуоресцирующих аминокислот (триптофан, тирозин, фенилаланин) только триптофан дает наиболее богатую информацию о структуре макромолекулы. Считается, что триптофан является естественной «меткой-репортером», поэтому исследование параметров его флуоресценции дает представление о характере микроокружения аминокислоты, его изменениях при определенных воздействиях, в частности, в данном случае при взаимодействии ЛПВП с T₄.

Изучение спектров флуоресценции разных классов липопротеинов показало, что они различаются по форме и по значениям длин волн максимумов. Класс ЛПВП имел самый короткий максимум – 333 нм, у ЛПНП этот показатель был сдвинут на 2 нм в красную область, а у ЛПОНП максимум флуоресценции составлял 338 нм. Интересно, что сам триптофан в водном растворе имел максимум флуоресценции 354 нм. Характерный коротковолновый сдвиг флуоресценции

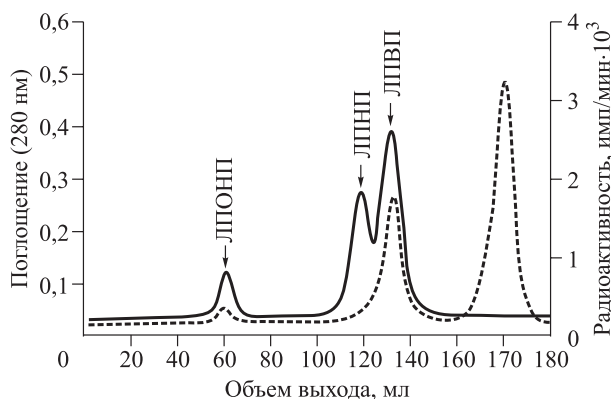


Рис. 1. Связывание ¹²⁵I-T₄ с фракциями ЛП плазмы крови человека. Колонка: сефароза CL-2В (1,6 × 100 см). Элюент: 0,05 М Трис/Ац, рН 8,0, 5 мМ ЭДТА. Сплошная линия – поглощение белка при 280 нм. Пунктирная линия – радиоактивность

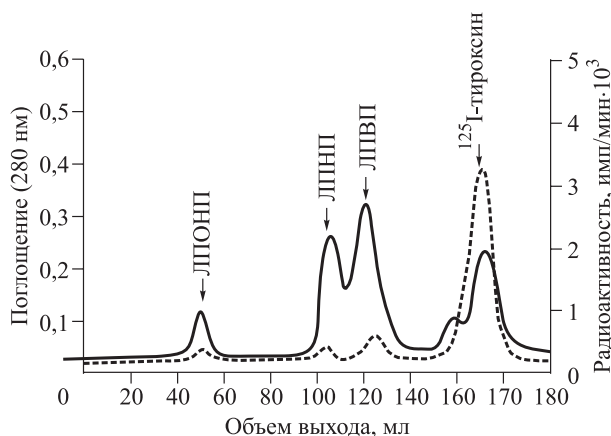


Рис. 2. Ингибирование связывания ¹²⁵I-T₄ с ЛПВП плазмы крови человека в присутствии 500-кратного избытка немеченного гормона. Колонка: сефароза CL-2В (1,6 × 100 см). Элюент: 0,05 М Трис/Ац, рН 8,0, 5 мМ ЭДТА. Сплошная линия – поглощение белка при 280 нм. Пунктирная линия – радиоактивность

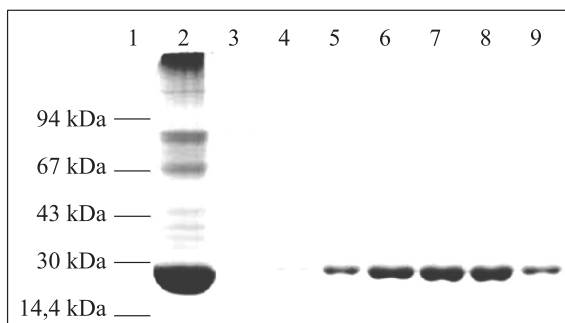


Рис. 3. Электрофореграмма хроматографической очистки аполипопротеина А-I. 1 – низкомолекулярные белки-стандарты; 2 – суммарные белки ЛПВП; 3–9 – стадии очистки апо А-I

триптофанилов во фракциях липопротеинов можно объяснить особенностями микроокружения: полярного (водного) для раствора триптофана и неполярного (липидного) в структуре белкового компонента липопротеинов.

Во фракции ЛПВП главным и основным структурообразующим компонентом является белок апо А-I. В связи с этим мы изучили взаимодействие T_4 с выделенным из ЛПВП плазмы крови и хроматографически очищенным апо А-I. На электрофореграмме (рис. 3) показаны суммарные белки, входящие в состав ЛПВП, а также стадии хроматографической очистки апо А-I. При электрофорезе белок мигрировал в геле одной полосой с молекулярной массой около 28 кДа, что соответствует литературным данным. Взаимодействие T_4 с фракциями ЛПВП, а также с изолированным апо А-I сопровождалось тушением флуоресценции триптофанилов (рис. 4). При

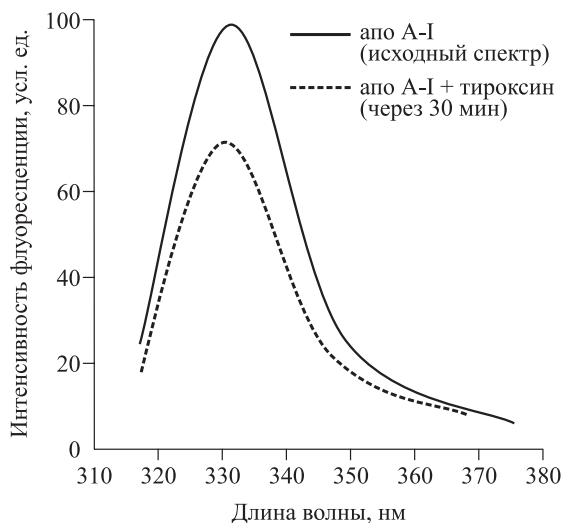


Рис. 4. Спектры флуоресценции остатков триптофана аполипопротеина А-I при взаимодействии с тироксином

Таблица

Константы ассоциации и количество центров связывания для фракций ЛПВП и аполипопротеина А-I при взаимодействии с тироксином

Класс ЛП	$K_{асс} \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	Число центров связывания
ЛПВП ₃	$40,0 \pm 20,1$	5
ЛПВП ₂	$3,60 \pm 1,28$	3
Апо А-I	$6,45 \pm 2,11$	1

Примечание. Величины $K_{асс}$ представлены как среднее арифметическое величин показателя и его среднеквадратическое отклонение ($M \pm SD$) после серии 4 измерений.

этом форма спектров, их полуширина практически не изменялись. Наблюдался сдвиг на 1–3 нм в коротковолновую область спектра, что объясняется локальными конформационными перестройками белкового компонента ЛПВП после взаимодействия с гормоном. Следует отметить, что для фракции ЛПВП₃ наблюдалось наибольшее снижение флуоресценции в точке эквимоллярности (60 %), менее выраженным оно было для ЛПВП₂ (43 %) и изолированного апо А-I (32 %).

На основании полученных кривых тушения флуоресценции титрования были рассчитаны величины констант ассоциации и количество центров связывания (таблица). Константа ассоциации комплексов «апо А-I – T_4 » оказалась несколько ниже, чем для комплексов «ЛПВП – T_4 ». Это, по всей вероятности, обусловлено удалением липидов, которые необходимы для стабилизации конформационной структуры апо А-I и придания ему свойств поверхностно-активного соединения. Кроме того, различия в связывании T_4 между ЛПВП₂ и ЛПВП₃ обусловлены, как мы полагаем, особенностями состава полярной фосфолипидной оболочки этих частиц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе изучалась способность различных фракций липопротеинов плазмы крови человека (ЛПОНП, ЛПНП, ЛПВП₂ и ЛПВП₃) связываться с тироксином (T_4). Методами хроматографии на сефарозе CL-2В показано, что значительная часть меченого $^{125}\text{I}-T_4$ элюируется в объеме выхода фракции ЛПВП, что может свидетельствовать о возможности образования комплексов ЛПВП с T_4 . Процесс носил обратимый характер, поскольку введение в данную систему избыточного количества (10^{-6} – 10^{-7} М) немеченого T_4 приводило к вытеснению $^{125}\text{I}-T_4$ из комплексов с ЛПВП, что может свидетельствовать о взаимодействии типа

«белок – лиганд». Исследовано влияние условий среды на образование комплексов T_4 с ЛПВП. Повышение температуры до 40 °С приводило к более чем 50%-му снижению выхода радиоактивности с фракцией ЛПВП. Образование комплексов уменьшалось при 4 °С, однако при этом они отличались наибольшей устойчивостью. Методом тушения триптофановой флуоресценции получены основные физико-химические характеристики взаимодействия T_4 с подфракциями ЛПВП₂, ЛПВП₃. Константы комплексообразования ЛПВП с T_4 составили порядка 10^6 – 10^7 М⁻¹. Наибольшее сродство к T_4 обнаружено для частиц подфракции ЛПВП₃. Установлено, что в комплексообразовании с T_4 принимает участие основной белковый компонент ЛПВП – аполипопротеин А-I, у которого имеется один центр связывания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Attalah N.A., Lata G.F. Steroid-protein interactions studied by fluorescence quenching // *Biochim. Biophys. Acta*. 1968. 168. (2). 321–333.
2. Benvenega S., Robbins J. Enhancement of thyroxine entry into low density lipoprotein (LDL) receptor-competent fibroblasts by LDL: an additional mode of entry of thyroxine into cells // *Endocrinology*. 1990. 126. (2). 933–941.
3. Bernal J., Guadaño-Ferraz A., Morte B. Thyroid hormone transporters – functions and clinical implications // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2015. 11. (7). 406–417.
4. Hatch F.T., Lees R.S. Practical method for plasma lipoprotein analysis // *Adv. Lipid Res.* 1968. 6. 2–68.
5. Hulbert A.J. Thyroid hormones and their effects: a new perspective // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2000. 75. (4). 519–631.
6. Hulbert A.J. Transthyretin as a thyroid hormone carrier: function revisited // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2002. 40. (12). 1292–1300.
7. Palha J.A., Fernandes R., de Escobar G.M., Episkopou V., Gottesman M., Saraiva M.J. Transthyretin regulates thyroid hormone levels in the choroid plexus, but not in the brain parenchyma: study in a transthyretin-null mouse model // *Endocrinology*. 2000. 141. (9). 3267–3272.
8. Ramos H.E. Thyroid hormone cell membrane transport defect // *Endocr. Dev.* 2014. 26. 108–117.
9. Van der Deure W.M., Peeters R.P., Visser T.J. Molecular aspects thyroid hormone transporters, including MCT8, MCT10, and the effects of genetic variation in these transporters // *J. Mol. Endocrinol.* 2010. 44. (1). 1–11.
10. Van Herck S.L., Delbaere J., Bourgeois N.M., McAllan B.M., Richardson S.J., Darras V.M. Expression of thyroid hormone transporters and deiodinases at the brain barriers in the embryonic chicken: Insights into the regulation of thyroid hormone availability during neurodevelopment // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2015. 214. (4). 30–39.

CHARACTERISTICS OF BINDING TYROXINE WITH FRACTIONS OF HIGH DENSITY LIPOPROTEINS AND APOLIPOPROTEIN A-I

**Lev Mikhaylovich POLYAKOV, Roman Aleksandrovich KNYASEV,
Aleksandr Vladimirovich RYABCHENKO, Nataliya Viktorovna TRIFONOVA,
Mariya Vladimirovna KOTOVA**

*Institute of Biochemistry of Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

The aim of the study was to study the binding of various fractions of human blood plasma lipoproteins (VLDL, LDL, HDL₂ and HDL₃) with thyroxine (T₄). Chromatography on Sepharose CL-2B showed that a significant portion of the labeled ¹²⁵I-thyroxine eluted in the volume of the output of the HDL fraction, which may indicate the possibility of formation of HDL-T₄ complexes. The process was reversible, since the introduction of an excessive amount (10⁻⁶–10⁻⁷ M) of unlabeled T₄ into the system resulted in the displacement of ¹²⁵I-T₄ from complexes with HDL, which indicates a «protein – ligand» type interaction. The effect of environmental conditions on the formation of complexes of T₄ with HDL is investigated. An increase in temperature to 40 °C resulted in a more than 50 % decrease in the release of radioactivity with a fraction of HDL. Complexation decreased at 4 °C, however, the complexes showed the greatest stability. The main physicochemical characteristics of the interaction of T₄ with subfractions of HDL₂ and HDL₃ were obtained by quenching tryptophan fluorescence. The complexation constants of HDL with T₄ were of the order of 10⁶–10⁷ M⁻¹. The greatest affinity for T₄ was found for particles of subfraction of HDL₃. It was established that the main protein component of HDL – apolipoprotein A-I takes part in complexation with T₄, on which has one binding center.

Key words: high density lipoproteins, thyroxin, apolipoprotein A-I.

*Polyakov L.M. – doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory of medical biotechnology,
e-mail: plm@niibch.ru*

*Knyazev R.A. – candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory of medical biotechnology,
e-mail: Knjazev_roman@mail.ru*

*Ryabchenko A.V. – candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory of medical biotechnology,
e-mail: borrelia@mail.ru*

Trifonova N.V. – junior researcher of laboratory of medical biotechnology, e-mail: nataliya-tverdohleb@yandex.ru

Kotova M.V. – junior researcher of laboratory of medical biotechnology, e-mail: zerokiri@mail.ru