



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.17

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДНК-СЕФАРОЗЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ РЕЦЕПТОРА ДЕКСАМЕТАЗОНА ИЗ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС

*Ахрем А. А., Барай В. Н., Зипченко А. И.,  
Марцев С. П., Чащин В. Л.*

*Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск*

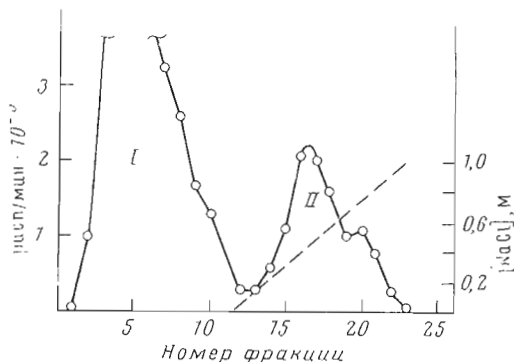
В настоящее время известно, что взаимодействие стероидных гормонов с клеткой-мишенью протекает по многостадийному механизму, который включает в себя проникновение стероида в клетку, связывание его с цитоплазматическим белком-рецептором, температурную активацию образовавшегося комплекса, сопровождающуюся трансформацией его в форму с повышенной аффинностью к ядру, и транслокацию комплекса в ядро, где он связывается с хроматином [1—3].

Дальнейшая детализация механизма регуляции стероидными гормонами экспрессии генов требует всестороннего изучения структуры и физико-химических свойств рецепторных белков. Однако выделение рецепторов стероидных гормонов в чистом виде — чрезвычайно сложная задача, что обусловлено исключительной лабильностью, а также крайне низким содержанием их в биологическом материале. Поэтому использование таких методов фракционирования, как ионообменная и гельпроникающая хроматография, электрофорез и т. п., в данном случае неэффективно. В этой связи более перспективным методом выделения рецепторов может оказаться биоспецифическая хроматография на сорбентах, представляющих собой иммобилизованные на полимерных матрицах стероиды или ДНК.

Среди сорбентов на основе ДНК до настоящего времени при очистке рецепторов применяли исключительно ДНК-целлюлозу [4—6]. Гораздо более перспективный сорбент — ДНК-сефароза не использовалась из-за недоступности сорбентов с емкостью, превышающей 0,16 мг ДНК/г сухого веса сорбента [7].

Целью данной работы явилась попытка использовать биоспецифическую хроматографию на ДНК-сефарозе в качестве одного из возможных этапов очистки рецептора глюкокортикоидных гормонов из печени крыс. Для этого мы воспользовались предложенным в самое последнее время методом синтеза ДНК-сефарозы [8], позволившим нам получить сорбент, содержащий в 1 г сухого веса сефарозы 3,5 мг иммобилизованной ДНК.

Эксперименты по связыванию комплексов гормон — рецептор с ДНК-сефарозой и подбору условий их элюции (рисунков) свидетельствуют, что при пропускании цитозола, содержащего активированные комплексы гормон — рецептор, через колонку с аффинным сорбентом часть их остается на колонке в связанном состоянии. Элюция комплексов с использова-



Хроматография комплексов  $[^3H]$ дексаметазон — рецептор на ДНК-сефарозе. На колонку ( $0,6 \times 2$  см) с ДНК-сефарозой, уравновешенной буфером для гомогенизации, нанесли 2 мл цитозола, содержащего активированные комплексы гормон — рецептор. Элюент — градиент концентрации NaCl; скорость элюции 4 мл/ч; объем фракций 0,5 мл. Пик I —  $[^3H]$ дексаметазон, не задержанный колонкой; пик II —  $[^3H]$ дексаметазон в комплексе с рецептором

нием линейного градиента концентрации NaCl позволила установить, что 0,45 M NaCl разрушает связь комплексов гормон — рецептор с иммобилизованной ДНК и, таким образом, может быть использован для их десорбции с ДНК-сефарозы. Контрольные эксперименты показали, что свободный  $[^3H]$ дексаметазон не сорбируется ДНК-сефарозой. При помощи описанной процедуры нами была достигнута 50-кратная очистка рецептора. В целях сокращения продолжительности процедуры хроматографии мы решили использовать ее «batch»-вариант с последующим осаждением сорбента через слой 15% глицерина. Продолжительность процедуры очистки в этом варианте ~45 мин, что в 2—3 раза меньше времени, затрачиваемого на колоночную хроматографию.

Известно, что помимо рецептора глюкокортикоидных гормонов цитозол печени крыс содержит ряд белков, обладающих повышенным сродством к ДНК [9]. Ввиду того что большинство ДНК-связывающих белков элюируются с ДНК повышенными концентрациями NaCl, одностадийная хроматография на ДНК-сефарозе не может привести к значительной очистке рецептора дексаметазона. Учитывая, что только комплекс рецептор — гормон (но не свободный рецептор) способен связываться с ДНК [10], мы попытались удалить по крайней мере часть сопутствующих ДНК-связывающих белков путем хроматографии на ДНК-сефарозе препарата цитозола до внесения в него радиоактивного стероида. Как видно из таблицы, введение в процедуру очистки дополнительной стадии позволило получить препарат рецепторного белка, очищенного в 200 раз.

Таким образом, данные настоящей работы свидетельствуют о том, что ДНК-сефароза может быть с успехом использована при выделении рецептора глюкокортикоидных гормонов из печени крыс.

#### Частичная очистка рецептора дексаметазона

Препарат	$[^3H]$ Дексаметазон, связаный с белком, пмоль/мл	Белок, мг/мл	Удельное связывание, пмоль стероида/мг белка
Цитозол	9,6	30,0	0,32
Элюат 0,45 M NaCl	0,97	0,015	64,3

## Экспериментальная часть

Исходным материалом для выделения рецептора служила 105 000 g надосадочная жидкость (цитозол) гомогената печени адреналэктомированных крыс. Гомогенизацию ткани проводили в трехкратном объеме 0,02 M Трис-НСl-буфера (рН 7,5), содержащего 0,001 M EDTA, 0,001 M дитиотреит и 10% (об./об.) глицерина. Все процедуры, за исключением специально оговоренных, проводили при 0—4°.

2 мл цитозола смешивали на мелкопористом стеклянном фильтре с 0,5 мл суспензии ДНК-сефарозы и полученную смесь инкубировали 20 мин при слабом перемешивании. Далее сорбент отделяли фильтрованием, а в фильтрат вносили [1(2)-<sup>3</sup>H]дексаметазон (уд. акт. 28 Ки/ммоль, Amersham, Англия) до конечной концентрации  $2 \cdot 10^{-8}$  M. С целью активации образовавшихся комплексов гормон — рецептор цитозол прогревали 20 мин при 20°, затем в него вносили 0,1 мл суспензии ДНК-сефарозы и после 20 мин инкубации сорбент отделяли от не связанных с ним белков осаждением через раствор 15% глицерина. Элюцию связанных с ДНК комплексов проводили, обрабатывая 20 мин сорбент Трис-НСl-буфером, содержащим 0,45 M NaCl.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Baulieu E. (1975) *Mol. and Cell. Biochem.*, 7, 157—174.
2. Edelman I. S. (1975) *J. Steroid Biochem.*, 6, 147—159.
3. O'Malley B. W., Schrader W. T. (1976) *Sci. Amer.*, 234, 32—43.
4. Yamamoto K. R., Alberts B. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, 7076—7086.
5. Irving R., Mainwaring W. I. P. (1974) *J. Steroid Biochem.*, 5, 711—716.
6. Eisen H. J., Glinsmann W. (1975) *J. Steroid Biochem.*, 6, 1171—1173.
7. Poonian M. S., Schlabach A. J., Weissbach A. (1971) *Biochemistry*, 10, 424—427.
8. Arndt-Jovin D. J., Jovin T. M., Bahr W., Frichauf A., Marquardt M. (1975) *Eur. J. Biochem.*, 54, 411—418.
9. Schweiger A., Mazur G. (1974) *FEBS Lett.*, 46, 255—259.
10. Rousseau G. G., Higgins S. J., Baxter J. D., Gelfand D., Tomkins G. M. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 6015—6021.

Поступило в редакцию  
12.IV.1977

## USE OF DNA-SEPHAROSE FOR PURIFICATION OF DEXAMETHASONE RECEPTOR FROM RAT LIVER

AKHREM A. A., BARAY V. N., ZINCHENKO A. I.,  
MARTSEV S. P., CHASHCHIN V. L.

*Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences  
of the BSSR, Minsk*

DNA-Sepharose has been examined in relation to its possible use for the purification of glucocorticoid receptor from rat liver. [<sup>3</sup>H]Dexamethasone-receptor complex was purified 200-fold by a rapid two-step procedure. At a first step, free receptor was separated from cytosol proteins that bind to DNA-Sepharose with high affinity, whereas at the second step heat-activated glucocorticoid-receptor complex was resolved from the proteins of low affinity for DNA.