



УДК 612. 018. 023

**СВЯЗЫВАНИЕ ЭСТРАДИОЛА И ЕГО АНАЛОГОВ
С ЦИТОЗОЛЬНЫМИ И ЯДЕРНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ
МАТКИ КРОЛИКА****Черняев Г. А., Баркова Т. И., Ананченко С. Н.,
Сорокина И. Б.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва***Матарадзе Г. Д., Розен В. Б.***Лаборатория эндокринологии, Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова*

Изучено связывание [6, 7-³H]эстрадиола (³H-E₂), немеченого эстрадиола (E₂) и его производных с рецепторами экстракта ядер и цитозола матки кролика. Ядра экстрагировали буфером с 0,4 М KCl, свойства цитозола изучали в присутствии 0,4 М KCl (цитозол-KCl) и в отсутствие соли. Добавление соли к цитозолу вызывало уменьшение сродства рецептора к ³H-E₂ и концентрации связывающих мест. Сродство рецепторов экстракта ядер и цитозола-KCl было одинаковым. ³H-E₂ образовывал со всеми формами рецептора стойкие комплексы. Изменение строения молекулы эстрадиола влияло одинаково на связывание со всеми формами рецептора. Средства немеченых производных E₂ к рецептору определяли по ингибированию связывания ³H-E₂. Все изученные производные E₂ оказались конкурентными ингибиторами ³H-E₂. Одинаковые связывающие свойства рецептора цитозола и ядер и их одинаковая лигандная специфичность предполагают близкое сходство разных форм эстрадиольного рецептора матки кролика.

Известно, что эстрадиол проявляет свое специфическое гормональное действие в органах-мишенях (матка, влагалище, молочная железа, гипофиз), проникая внутрь клетки и оказывая влияние на процессы синтеза белка. Это характерно для всех стероидных гормонов и отличает их от белковых и пептидных гормонов, которые воздействуют на уровне клеточных мембран [1, 2].

Согласно общепринятой точке зрения, ключевым этапом механизма действия эстрогенов и других стероидных гормонов является образование комплексов со специфическими внутриклеточными белками-рецепторами. Изучение динамики связывания [6, 7-³H]эстрадиола в клетке матки *in vivo* и *in vitro* показало, что гормон вначале связывается с цитоплазматическим рецептором и затем появляется в ядре, где его взаимодействие с хроматином инициирует различные клеточные процессы [3-7]. Растворы с высокой ионной силой ($\geq 0,3$ М KCl) экстрагируют значительную часть гормон-рецепторных комплексов из ядер [8]. Подобное увеличение ионной силы среды вызывает изменение физико-химических свойств цитоплазматического рецептора, сопровождаемое, как полагают, диссоциацией сложной белковой молекулы [9, 10].

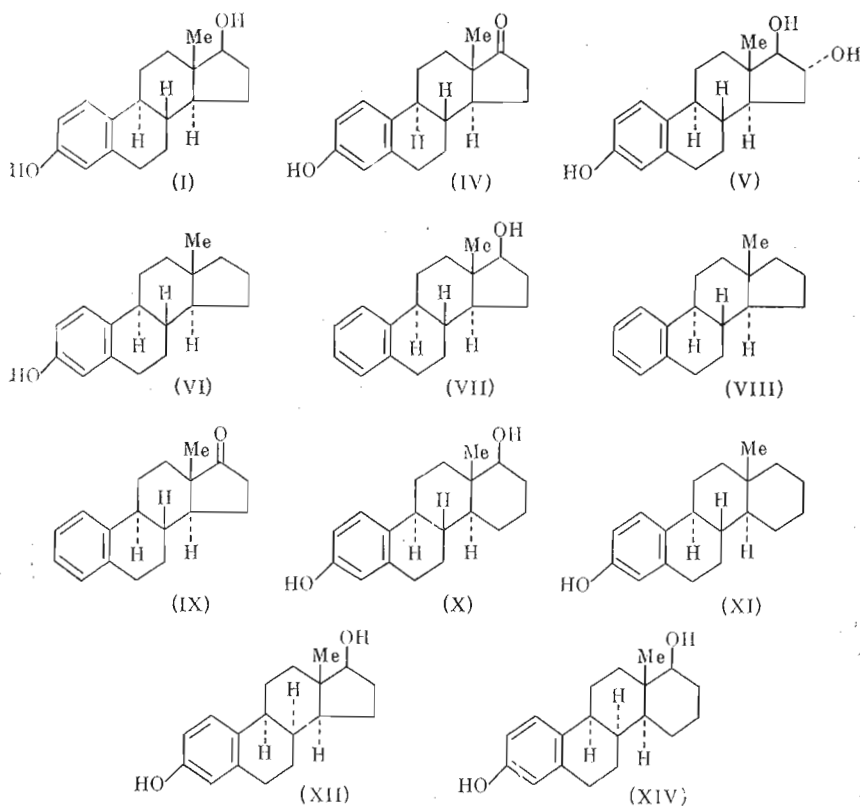
Ранее нами изучались свойства ряда аналогов эстрадиола — их эстрогенная активность и способность связываться с цитозольным рецептором матки кролика в условиях низкой ионной силы. Было показано, что сродст-

во стероидов к рецептору соответствует их биологической активности и что связывание стероидов зависит от наличия в молекуле гормона гидроксильных групп, от характера сочленения колец В и С и от размера кольца D [11].

Целью данной работы было: 1) изучение связывания аналогов эстрадиола с рецептором, содержащимся в КС1-экстракте ядер; 2) сравнение связывающих свойств ядерного и цитозольного рецепторов в одипаковых условиях и цитозольного рецептора в присутствии КС1 или без него; 3) выяснение возможности проявления взаимных влияний функциональных групп в молекуле эстрогена при комплексообразовании стероидов с эстрадиольными рецепторами матки.

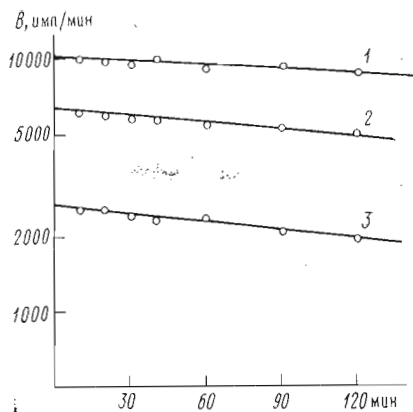
В отличие от предыдущей работы [11] о сродстве стероидов с рецептором судили по константе ассоциации, для расчета которой была выведена соответствующая формула.

В работе изучались природный *D*-эстрадиол (I) и его аналоги: *L*-эстрадиол (II), *D, L*-эстрадиол (III), *D*-эстрон (IV), *D*-эстриол (V), *D*-17-дезоксизэстрадиол (VI), *D*-3-дезоксизэстрадиол (VII), *D*-эстратриен-1,3,5 (10) (VIII), *D*-3-дезоксизэстрон (IX), *D, L*-D-гомоэстрадиол (X), *D, L*-17-дезоксизэстрадиол (XI), *D*-8 α -эстрадиол (XII) и *D, L*-8 α -эстрадиол (XIII) и *D, L*-8 α -D-гомоэстрадиол (XIV).



Сродство немеченых стероидов к рецепторам определялось по их способности ингибировать связывание [6,7- $^3\text{H}_2$]эстрадиола. Связывание меченого эстрадиола с рецептором определялось после адсорбции свободного гормона углем. Эта методика оказалась удобной для определения большого числа проб. Однако в процессе адсорбции свободного гормона углем нарушается равновесие, установившееся за время инкубации между рецепторными комплексами, с одной стороны, и рецепторами и несвязанным

Рис. 1. Диссоциация комплексов [$^3\text{H}_2$]эстрадиола с цитозольным рецептором без KCl (1) и в присутствии KCl (2), а также с KCl-экстрактом ядер (3) в зависимости от времени адсорбции несвязанного гормона углем (см. «Эксперим. часть»)



гормоном — с другой. Это приводит к частичной диссоциации комплексов, и концентрация связанного гормона (B_t) оказывается ниже, чем при равновесии (B_0). Для учета времени адсорбции был применен один из методов, предложенных Местером и Робертсоном для изучения скорости диссоциации [12]: после инкубации рецепторсодержащих клеточных фракций с [$^3\text{H}_2$]эстрадиолом несвязанный гормон адсорбировался углем в разные промежутки времени. Адсорбция углем свободного гормона не зависела от времени, и полнота адсорбции (x) составляла 98–99%. Концентрация связанного гормона рассчитывалась по формуле, учитывающей неполноту адсорбции [13]:

$$B_t = T - \frac{T - B_e}{x}, \quad (1)$$

где T — полная концентрация меченого гормона, B_e — концентрация связанного гормона, определенная по радиоактивности пробы.

Результаты, представленные на рис. 1, показывают, что при инкубации с минимальной концентрацией меченого гормона, насыщающей эстрадиольный рецептор, и в цитозоле, и в экстракте ядер матки кролика образуется только один тип комплексов, диссоциирующих очень медленно. Скорость диссоциации комплексов совпадает в случае цитозола-KCl и KCl-экстракта ядер и несколько меньше для цитозола низкой ионной силы.

В дальнейшем при определении параметров связывания и констант ингибирования немеченых стероидов диссоциация меченых комплексов за время адсорбции учитывалась приведением величины связывания [$^3\text{H}_2$]эстрадиола к нулевому времени адсорбции. Для адсорбции было выбрано время 30 мин.

Для определения параметров связывания (константы ассоциации и концентрации связывающих мест) изучалось связывание рецепторов с возрастающими дозами [$^3\text{H}_2$]эстрадиола (от 0,025 до 1 нг). Кривые насыщения различных форм рецептора показаны на рис. 2а. Результаты эксперимента, выраженные в координатах Скэтчарда (рис. 2б), свидетельствуют об образовании только одного типа специфических комплексов. Из этих же графиков определялись константы ассоциации и число связывающих мест. В таблице сопоставлены величины $K_{асс}$ и числа связывающих мест, принадлежащих на 1 мг белка, для цитозола, цитозола-KCl и KCl-экстракта ядер матки кролика: При добавлении соли к цитозолу уменьшается константа ассоциации и несколько снижается число связывающих мест. Аналогичные данные по влиянию KCl на связывание эстрадиола с рецептором цитозола матки кролика получены Кореняном с сотр. [14]. Константа ассоциации для экстракта ядер равна константе ассоциации для цитозола-KCl, число связывающих мест при пересчете на 1 мг белка почти в 2 раза выше в экстракте ядер, чем в цитозоле (с солью или без нее).

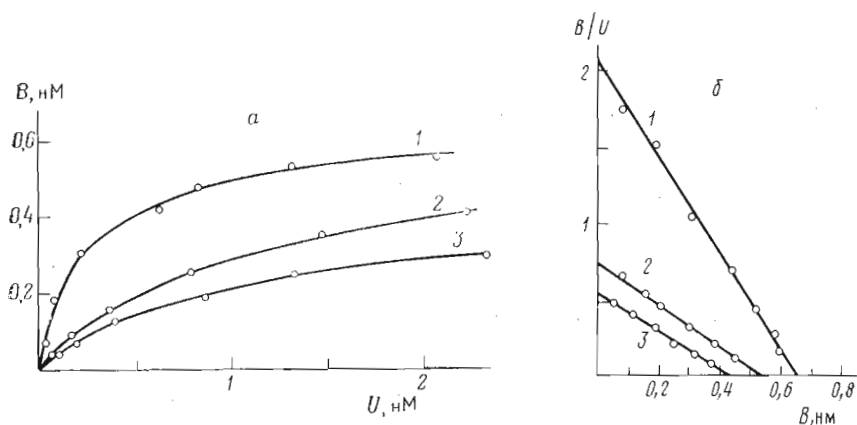


Рис. 2. Связывание [$^3\text{H}_2$]эстрадиола с цитозольным рецептором без KCl (1) и в присутствии KCl (2), а также с KCl-экстрактом ядер (3): а — в зависимости от концентрации гормона, б — та же зависимость в координатах Скэтчарда [15]. В и U — концентрации связанного и свободного гормона соответственно (с учетом диссоциации за время адсорбции 30 мин, см. рис. 1)

Указанные выше формы рецепторов эстрадиола с $K_{асс}$ порядка 10^9 M^{-1} и низкой концентрацией связывающих мест обладают избирательной специфичностью сродства к эстрогенам, так как ни тестостерон, ни прогестерон не ингибируют связывание [6, 7- $^3\text{H}_2$]эстрадиола.

В отличие от тестостерона и прогестерона все производные эстрадиола, изучавшиеся нами, ингибировали связывание [$^3\text{H}_2$]эстрадиола.

Для выяснения характера ингибирования [$^3\text{H}_2$]эстрадиол в различных дозах инкубировали с рецептором в присутствии немеченого стероида в постоянной концентрации. Результаты опытов представлены в координатах Лайнуивера — Берка на рис. 3. Как видно, прямые, полученные для различных концентраций немеченых стероидов (L-эстрадиола, D-эстрогена и D-эстрадиола), пересекают ось ординат в одной точке с прямой для связывания меченого эстрадиола в отсутствие ингибитора. Это указывает на то, что D-эстрон, L-эстрадиол, как и немеченый D-эстрадиол, являются конкурентными ингибиторами [$^3\text{H}_2$]эстрадиола. Ингибирование связывания меченого эстрадиола всеми другими изучавшимися производными эстрадиола также носило конкурентный характер; это справедливо применить для расчета констант ассоциации немеченых стероидов с эстрадиольными рецепторами формулу, предложенную для случая конкурентного ингибирования [13]:

$$\frac{K_H}{K_I} = \frac{C}{U \left(\frac{N}{B} - 1 \right) - \frac{1}{K_H}} - \frac{B}{U}, \quad (2)$$

где K_H — константа ассоциации меченого гормона; K_I — константа ассоциации ингибитора; C — концентрация ингибитора; N — концентрация связывающих мест; B — концентрация связанного гормона; U — концентрация несвязанного меченого гормона в присутствии ингибитора.

В опытах по определению констант ассоциации немеченых стероидов инкубировали 0,1–0,5 нг [$^3\text{H}_2$]эстрадиола и различные дозы конкурентов. Для оказавшихся относительно сильными конкурентов (соединения I, III–V, X, XII–XIV) применялись дозы от 0,1 до 5 нг; для более слабых конкурентов (II, VI, VII) — от 5 до 100 нг и для очень слабых конкурентов (VIII, IX и XI) — от 100 до 1000 нг.

Константа ассоциации, рассчитанная для немеченого эстрадиола по приведенной выше формуле, практически совпадает с константой ассоциа-

**Влияние строения стероида на константу ассоциации
с различными формами эстрадиольного рецептора матки кролика**

Стероид	Цитозол		Цитозол-KCl		KCl-экстракт ядер	
	$K_{асс}$	Отн. средство	$K_{асс}$	Отн. средство	$K_{асс}$	Отн. средство
[3H_2]эстрадиол *	3,1±0,3 (9,0±0,9)		1,5±0,2 (6,4±0,7)		1,6±0,3 (15,7±1,7)	
(I) <i>D</i> -Эстрадиол **	3,9±0,6	100	2,0±0,3	100	2,3±0,5	100
(II) <i>L</i> -Эстрадиол		3,4±0,4		3,0±0,5		3,4±0,3
(III) <i>D, L</i> -Эстрадиол		42±2		45±2		46±3
(IV) <i>D</i> -Эстрон		22±2		20±2		21±2
(V) <i>D</i> -Эстриол		9,8±0,7		8,1±0,5		8,2±0,7
(VI) <i>D</i> -17-Дезокси-эстрадиол		3,4±0,4		4,4±0,5		3,6±0,5
(VII) <i>D</i> -3-Дезокси-эстрадиол		1,3±0,2		1,1±0,3		1,2±0,2
(VIII) <i>D</i> -эстратриен		0,013± ±0,001		0,016± ±0,002		0,016± ±0,003
(IX) <i>D</i> -3-Дезокси-эстрон		0,0091± ±0,0015		0,0099± ±0,0012		0,0068± ±0,0020
(X) <i>D, L</i> -D-Гомо-эстрадиол		5,1±0,5		8,5±0,6		7,0±0,7
(XI) <i>D, L</i> -17-Дезокси-D-гомо-эстрадиол		0,51±0,03		0,61±0,07		0,71±0,09
(XII) <i>D</i> -8α-Эстрадиол		69±3		64±3		66±3
(XIII) <i>D, L</i> -8α-Эстрадиол		24±2		23±2		25±3
(XIV) <i>D, L</i> -8α-D-гомо-эстрадиол		10±1		11±1		14±2

* Константа ассоциации ($K_{асс} \cdot 10^{-6}, M^{-1}$) [3H_2]эстрадиола определена из графиков Скэтчарда; в скобках приведены концентрации связывающих мест n , 10^{-13} моль/мг белка.

** Константы ассоциации немеченых стероидов рассчитаны по формуле (2).

ции меченого эстрадиола, полученной из графика, построенного в координатах Скэтчарда [15].

Сродство немеченого аналога эстрадиола к рецептору выражали в виде отношения константы ассоциации ингибитора к рассчитанной константе немеченого *D*-эстрадиола.

Как видно из таблицы, любые изменения в строении молекулы природного эстрадиола вызывают уменьшение константы ассоциации.

Важным результатом представляется одинаковое изменение константы ассоциации стероида при изменении строения его молекулы во всех трех случаях: для ядерного рецептора, присутствующего в 0,4 М KCl-экстракте ядер, и для цитозольного рецептора в присутствии 0,4 М KCl и без него.

Изменение строения молекулы эстрадиола по-разному влияет на связывание стероида с белком, и поэтому сравнение величин степени сродства аналогов эстрадиола позволяет выяснить важность структурных и пространственных особенностей гормона для комплексообразования.

Необходимость пространственного соответствия молекулы лиганда месту связывания на рецепторе четко показывает сравнение констант ассоциации природного *D*-эстрадиола (I) и его энантиомера *L*-эстрадиола (II). Сродство последнего ко всем формам рецептора приблизительно в 30 раз меньше, чем у природного гормона. Сродство рацемической формы — *D, L*-эстрадиола (III) приблизительно в 2 раза меньше, чем у *D*-эстрадиола.

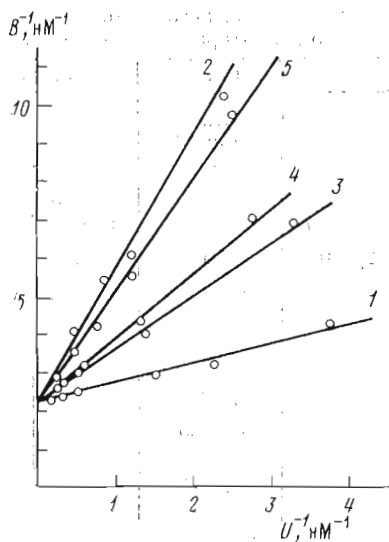
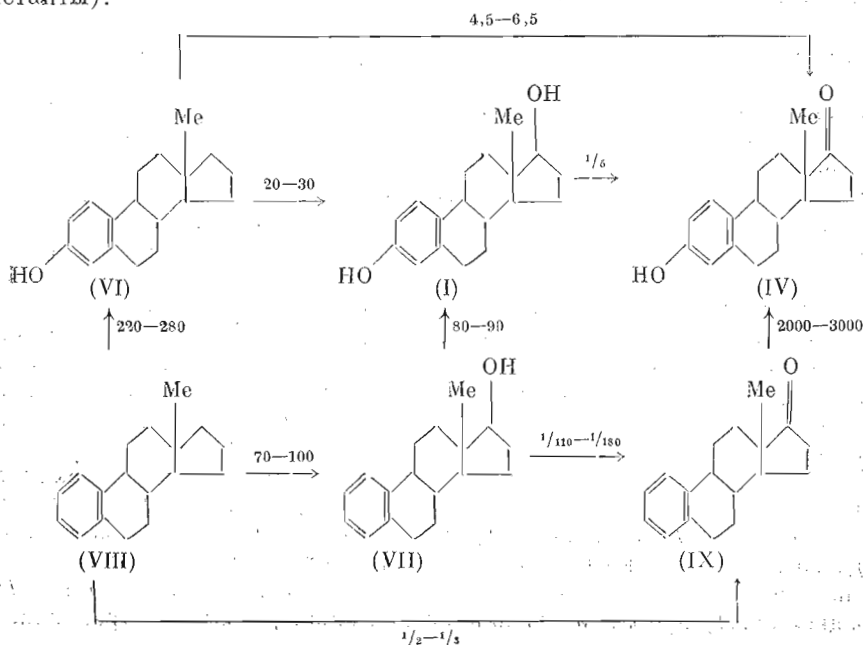


Рис. 3. Связывание [^3H]эстрадиола с рецептором КС1-экстракта ядер в отсутствие ингибитора (1) и в присутствии 1,2 нМ *D*-эстрадиола (2), 1,2 нМ *D*-эстрона (3) и *L*-эстрадиола в концентрации 6,1 (4) и 15,3 нМ (5)

Полученные результаты еще раз подтверждают участие гидроксильных групп при связывании стероида с рецептором, так как *D*-эстратриен-1,3,5(10) (VIII) имеет константу ассоциации в 6000–8000 раз меньше, чем *D*-эстрадиол (I). Введение в кольцо *D* молекулы эстрадиола дополнительной гидроксильной группы также вызывает уменьшение связывания стероида: константа ассоциации *D*-эстриола (V) приблизительно в 10^6 раз меньше константы ассоциации *D*-эстрадиола (I). Более важной для связывания представляется фенольная гидроксильная группа при $\text{C}_{(3)}$, так как *D*-17-дезоксистероид (VI) обладает большим сродством к рецепторам, чем *D*-3-дезоксистероид (VII).

Из рассмотрения способности стероидов связываться с рецептором можно сделать вывод, что изменение характера заместителя при $\text{C}_{(3)}$ влияет на реакционную способность заместителя при $\text{C}_{(17)}$.

На схеме представлены эти соединения (I, IV, VI–IX) и показаны изменения констант ассоциации (число в виде дроби означает уменьшение константы).



Из схемы видно, что для 3-оксистероидов (VI) → (I) → (IV) наблюдаемые изменения величин констант ассоциации отличны от изменения этих величин для аналогичного ряда 3-дезоксистероидов (VIII) → (VII) → (IX). Следует отметить, что окисление 17-ОН-группы у эстрадиола (переход к эстрону) приводит к снижению константы ассоциации в 4,5–5 раз, тогда как окисление *D*-3-деоксиэстрадиола (VII) до *D*-3-деоксиэстрона (IX) сопровождается более резким уменьшением сродства к рецептору. Таким образом, оказывается, что 3-деоксиэстрон (IX), имеющий карбонильную группу, связывается с рецептором хуже, чем эстрадиен-1,3,5(10).

Следовательно, фенольная гидроксильная группа влияет на свойства 17-кетогруппы: в присутствии 3-ОН-группы введение кетогруппы вызывает увеличение константы ассоциации с рецептором, а в отсутствие 3-гидроксила эта кетогруппа, видимо, препятствует связыванию.

В свою очередь 17-гидроксильная группа в молекуле эстрадиола способна влиять на реакционную способность 3-ОН-группы. Об этом свидетельствует влияние фенольного гидроксила на связывание стероидов, имеющих различные заместители при C₍₁₇₎. Так, введение 3-ОН-группы в молекулу эстрадиена-1,3,5(10) (VIII → VI) увеличивает константу ассоциации в 220–280 раз: переход от 3-деоксиэстрадиола к эстрадиолу приводит к увеличению константы ассоциации в 80–90 раз; аналогичная трансформация 3-деоксиэстрона увеличивает сродство к рецептору в 2000–3000 раз.

Ранее, при исследовании кинетики как химического, так и ферментативного окисления производных эстрадиола, нами было показано, что реакционная способность 17-ОН-группы зависит от электронной природы заместителя при C₍₃₎, размера кольца D и характера сочленения колец B и C [16]. С другой стороны, степень диссоциации фенольного гидроксила при C₍₃₎ также зависит от размера кольца D и характера заместителя при C₍₁₇₎ (гидроксильная или кетонная группа). Была обнаружена линейная корреляция констант скорости химического окисления и констант диссоциации. Это подтверждает наличие взаимодействия между заместителями при C₍₃₎ и C₍₁₇₎, обусловленного эффектом «дальнодействия» («long range effect»), наблюдаемым в жестко сочлененной полициклической системе.

Таким образом, изучение связывания аналогов эстрадиола с рецепторами матки кролика показывает, что эти эффекты «дальнодействия» проявляются и при комплексообразовании стероидов с рецепторами. Об этом свидетельствует и наблюдаемое влияние размера кольца D и сочленения колец B и C в молекуле эстрадиола на связывание с рецепторами.

Так, увеличение кольца D до шестичленного вызывает уменьшение сродства стероида к рецептору: константа ассоциации *D*, *L*-*D*-гомоэстрадиола приблизительно в 12–20 раз меньше константы ассоциации *D*-эстрадиола (или в 8–10 раз меньше константы *D*, *L*-эстрадиола).

Интересно, что удаление у *D*, *L*-*D*-гомоэстрадиола (X) 17-гидроксильной группы влияет на сродство ко всем формам рецептора почти так же, как и у природного гормона. Константа ассоциации *D*, *L*-17-деокси-*D*-гомоэстрадиола (XI) меньше в 10–15 раз, чем у *D*, *L*-*D*-гомоэстрадиола (X), тогда как удаление 17-ОН-группы в молекуле *D*-эстрадиола (I) приводит к уменьшению константы ассоциации в 20–30 раз.

К уменьшению константы ассоциации приводит также и изменение конфигурации в молекуле эстрадиола при C₍₈₎. Сродство к рецепторам *D*-8α-эстрадиола почти в 1,5 раза меньше по сравнению с *D*-эстрадиолом (I); примерно такое же изменение наблюдается и у рацематов — константа ассоциации *D*, *L*-8α-эстрадиола (XIII) меньше константы ассоциации *D*, *L*-эстрадиола (III) в 1,8–2 раза. Это указывает на приблизительно одинаковое соотношение между связывающими свойствами *D*- и *L*-форм эстрадиола и 8α-эстрадиола.

По-иному влияет изменение конфигурации при C₍₈₎ на связывание *D*, *L*-*D*-гомоэстрадиола. Если подобное изменение у *D*-эстрадиола и *D*, *L*-эстрадиола приводит к снижению константы ассоциации — *D*-8α-эстра-

диол (XII) и *D, L*-8 α -эстрадиол (XIII), — то константа ассоциации *D, L*-8 α -*D*-гомоэстрадиола (XIV) оказывается выше константы ассоциации *D, L*-*D*-гомоэстрадиола (X) в 1,5–2 раза. Такие же соотношения между свойствами аналогов эстрадиола наблюдались и при изучении эстрогенной активности [11].

Возможно, что при изменении размера кольца D и сочленения колец B и C на связывание стероида с рецептором оказывает влияние изменение не только реакционной способности OH-групп, но и расстояний между ними. Как было показано нами ранее [11], у 8 α -эстрадиола и 8 α -*D*-гомоэстрадиола расстояние между O-атомами при C₍₃₎ и C₍₁₇₎, определенное с помощью моделей Дрейдинга, меньше на 0,2–0,4 Å, чем у природного эстрадиола, а у *D*-гомоэстрадиола это расстояние больше на 0,2 Å. Можно предположить, что увеличение этого расстояния вызывает более резкое снижение сродства стероида к рецептору, в результате чего константа ассоциации *D*-гомоэстрадиола оказывается меньше константы ассоциации 8 α -*D*-гомоэстрадиола. То, что взаимодействие стероидов с рецепторами все-таки не определяется полностью этим фактором, хорошо видно на примере *L*-эстрадиола (II), имеющего такое же расстояние между O-атомами, как и *D*-эстрадиол (I), но противоположную конфигурацию всех асимметрических центров.

Таким образом, сродство эстрогена к ядерным и цитозольным рецепторам матки кролика определяется реакционной способностью функциональных групп в молекуле эстрогена, расстоянием между 3- и 17-гидроксильными группами и пространственной структурой стероида.

Важным представляется и сравнение связывающих свойств различных форм эстрадиольного рецептора матки кролика: ядерного, экстрагируемого из ядер 0,4 М KCl, и цитоплазматического, присутствующего в цитозоле с низкой ионной силой и в цитозоле, содержащем 0,4 М KCl.

Одинаковая лигандная специфичность, наблюдаемая у этих форм при использовании структурных и пространственных аналогов эстрадиола (см. таблицу), а также сходные константы ассоциации [³H₂]эстрадиола и константы скорости диссоциации меченых комплексов у разных форм рецепторов позволяют предположить существенное сходство изученных форм эстрадиольного рецептора. Эта точка зрения подтверждается последними работами Дженсена, в которых показано, что ядерный и внеядерный эстрадиольные рецепторы матки обладают одинаковыми иммунохимическими свойствами [17].

Экспериментальная часть

В опытах применяли меченый гормон фирмы Amersham (Англия) [6,7-³H₂]эстрадиол (45 Ки/ммоль), *D*-эстрадиол, *D*-эстрон, *L*-эстрадиол и *D*-эстриол фирмы Jena Pharm, *D, L*-эстрадиол [18], *D, L*-*D*-гомоэстрадиол, *D, L*-8 α -*D*-гомоэстрадиол [19], *D, L*-8 α -эстрадиол [20], *D*-8 α -эстрадиол [21] получены одним из авторов. *D*-17-Дезоксиэстрадиол, *D*-3-дезоксистероид, *D*-эстратриен-1,3,5(10) и *D*-3-дезоксистерон синтезированы согласно литературным методикам [22–24]. *D, L*-17-дезоксид-*D*-гомоэстрадиол получен по методу, описанному для *D*-17-дезоксистероидола [23], т. пл. 185–187° (из *n*-гексана), λ_{max} 282 нм (ϵ 2236).

Опыты проводили на самках кроликов шиншилла весом 2–2,5 кг. После декапитации животных матки освобождали от жировой ткани, измельчали ножницами, промывали в TE-буферном растворе (0,02 М трис-HCl, 1,5 мМ EDTA, pH 7,5) и гомогенизировали в 10 объемах того же буферного раствора. Полученный гомогенат фильтровали через четыре слоя марли и центрифугировали 15 мин при 2000 об/мин (центрифуга «ЦЛР», угловой ротор). Надосадочную жидкость центрифугировали при 40 000 об/мин в течение 90 мин (Beckman L5-50, ротор Ti 42) и полученный цитозол использовали в опыте.

Ядерно-миофибриллярный осадок после двукратной промывки в ТЕ-буфере состоял, согласно фазово-контрастной микроскопии, преимущественно из неразрушенных ядер. Осадок суспендировали в ТЕ-буферном растворе, содержащем 0,4 М КСl, и перемешивали в течение 1 ч. Супернатант после ультрацентрифугирования суспензии ядер (ротор Тi 42, 40 000 об/мин, 60 мин) использовали как «экстракт ядер».

Дальнейшая очистка ядер (обработка тритоном X-100 и центрифугирование в 2,2 М сахарозе) не влияла на связывающие свойства экстракта ядер. Экстракция при различных рН (6,8–8,8) также не влияла на результаты.

Под действием КСl из суспензии ядер, имевшей соотношение белок — ДНК 4–7, экстрагировалось 30% белка и 1% ДНК. Содержание белка в цитозоле и экстракте ядер определяли по методу Лоури [25], ДНК — по методу Бартона [26]. Все операции проводили при 2–4°.

Сразу же после получения экстракт ядер, цитозол и цитозол, к которому добавляли КСl до концентрации 0,4 М (цитозол-КСl), инкубировали со стероидами при 4°. Для этого в пластмассовых пробирках (центрифужные пробирки Polyallomer для ротора Тi 50) смешивали 500 мкл клеточной фракции (цитозол, цитозол-КСl или КСl-экстракт ядер) и 200 мкл раствора стероида. [³H₂]эстрадиол и немеченые стероиды растворяли в ТЕ-буферном растворе, содержащем 1% этанола, так что конечная концентрация спирта в инкубационной среде не превышала 0,3%. Пробы инкубировали 20 ч при 4°. Предварительные эксперименты показали, что равновесие наступает после 8 ч инкубации и связывание сохраняется на одном уровне до 30 ч, что указывает на высокую стабильность связывающей системы.

После окончания инкубации в пробы для адсорбции свободных стероидов добавляли 30 мкл суспензии 6% угля Norit и 0,6% декстрана (M 80 000) в ТЕ-буферном растворе. Пробы встряхивали (оптимальное время адсорбции 30 мин) и центрифугировали для удаления угля при 3000 об/мин (ЦЛР, откидной ротор). После удаления угля 500 мкл образца смешивали с 10 мл сцинтиллятора Вгау и радиоактивность образцов измеряли на жидкостно-сцинтилляционном счетчике Mark II, эффективность счета для ³H ~ 20%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lübke K., Schillinger E., Töpert M. (1976) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **15**, 741–748.
2. Jensen E. V., DeSombre E. R. (1972) *Annu. Rev. Biochem.*, **41**, 203–230.
3. Edelman I. S. (1975) *J. Steroid Biochem.*, **6**, 147–159.
4. O'Malley W., Means A. R. (1974) *Science*, **183**, 640–620.
5. Jensen E. V., Suzuki T., Kawashima T., Stumpf W. E., Jungblut P. W., DeSombre E. R. (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **59**, 632–638.
6. Jensen E. V., Mohla S., Gorell T. A., DeSombre E. R. (1974) *Vitamins and Hormones*, **32**, 89–127.
7. King R. J. B., Mainwaring W. I. P. (1974) *Steroid-Cell Interactions*. Butterworths, London.
8. Puca G. A., Bresciani F. (1968) *Nature*, **218**, 967–969.
9. Erdos T. (1968) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **32**, 338–343.
10. Rochefort H., Baulieu E. E. (1971) *Biochimie*, **53**, 893–907.
11. Chernyaev G. A., Barkova T. I., Egorova V. V., Sorokina I. B., Ananchenko S. N., Matardze G. D., Sokolova N. A., Rozen V. B. (1975) *J. Steroid Biochem.*, **6**, 1483–1488.
12. Mester J., Robertson D. M. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, **230**, 543–549.
13. Черняев Г. А. (1979) *Биоорганическая химия*, **5**, 861–868.
14. Sanborn B. M., Rao B. R., Korenman S. G. (1971) *Biochemistry*, **10**, 4955–4962.
15. Scatchard G. (1949) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**, 660–672.
16. Egorova V. V., Zakharychev A. V., Ananchenko S. N. (1973) *Tetrahedron*, **29**, 301–307.
17. Green G. L., Closs L. E., Flemming H., DeSombre E. R., Jensen E. V. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 3684–3685.
18. Серебрякова Т. А., Захарычев А. В., Мальгина М. А., Ананченко С. Н., Торгов И. В. (1973) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1916–1917.
19. Лиманов В. Е., Ананченко С. Н., Торгов И. В. (1963) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1814–1819.

20. Сорокина И. Б., Баркова Т. И., Захарычев А. В., Чигирь Р. Н., Ананченко С. Н., Торгов И. В. (1973) Изв. АН СССР. Сер. биол., 664-670.
21. Физер Л., Физер М. (1964) Стероиды, с. 476, «Мир», М.
22. Caspi E., Cullen E., Grover P. K. (1963) J. Chem. Soc., 212-217.
23. Franqouis P., Levisalles J. (1963) Bull. Soc. Chem. France, 318-320.
24. Donnenberg H., Kochler T. (1964) Chem. Ber., 97, 140-150.
25. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A., Randall R. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265-275.
26. Burton K. (1956) Biochem. J., 56, 315-323.

Поступила в редакцию
29.IX.1978

После доработки
1.XII.1978

BINDING OF ESTRADIOL AND ITS ANALOGS TO THE CYTOSOL AND NUCLEAR RECEPTORS OF RABBIT UTERUS

CHERNYAEV G. A., BARKOVA T. I., ANANCHENKO S. N.,
SOROKINA I. B., MATARADZE G. D., ROZEN V. B.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow; Laboratory of Endocrinology,
M. V. Lomonosov State University, Moscow*

The binding of [6,7- $^3\text{H}_2$]estradiol ($^3\text{H}_2\text{-E}_2$) as well as of unlabeled estradiol and its derivatives to the receptors from rabbit uterus nuclear extracts and cytosol has been studied. The nuclei were extracted by 0.4 M KCl containing buffer, whereas the cytosol properties were examined in the absence or presence of 0.4 M KCl (in the latter case the cytosol designated as cytosol-KCl). The addition of salt to cytosol caused a fall both in the receptor affinity for $^3\text{H}_2\text{-E}_2$ and in the concentration of binding sites. Receptors from nuclear extracts and cytosol-KCl manifested the same affinities. The stable complexes were formed by $^3\text{H}_2\text{-E}_2$ with the all receptor preparations. The alterations in the estradiol structure exerted the same effect on the binding of respective steroids with the all three receptor forms. The affinity of unlabeled E_2 derivatives for the receptor was assessed from their ability to inhibit $^3\text{H}_2\text{-E}_2$ binding, all of them being competitive inhibitors. Similarity in binding properties and ligand specificity of cytosol and nuclear receptors implies close resemblance between various forms of the estradiol receptor from rabbit uterus.
