

## БИОХИМИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

УДК 577.171.6:[5 77.175.62

©Попов

### ИЗУЧЕНИЕ КООПЕРАТИВНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК РЕЦЕПТОРА АНДРОГЕНОВ

*Е.Г. Попов*

Институт радиобиологии НАН Беларуси, 220141 Минск, ул. Купревича, 2;  
тел.: 2644672, факс: + 375(0172)642315, эл. почта: IRB@RADBIO.BAS-NET.BY

Проведено изучение молекулярных характеристик рецептора андрогенов (РА) из цитозолей семенников молодых крыс 6-мес возраста. Методами гельфильтрации на колонке с Toyopearl-NW-55F и радиолигандного анализа специфического связывания [<sup>3</sup>H]-5- $\alpha$ -дигидротестостерона в координатах Скэтчарда и Хилла было подтверждено существующее представление о том, что функциональные андроген-рецепторные комплексы (АРК) являются димерными, проявляющими при взаимодействии с гормоном кооперативные свойства как при 4°C (коэффициент Хилла = 2,08), так и при физиологической температуре 36°C (коэффициент Хилла = 1,95). Мономеризацию РА и снижение его кооперативных свойств (коэффициент Хилла = 1,03) в определенных условиях можно вызвать разведением цитозоля и/или добавлением в среду инкубации Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (10 мМ). Внесение микроколичеств взятой у животных утром сыворотки крови (1:20) в образцы цитозоля с пулом молекул мономеризованного рецептора потенцирует его кооперативность, что свидетельствует о восстановлении димерной конформации РА. Если провести 15-часовую (0-4°C) предобработку 2,5%-ной суспензией активированного угля, покрытого декстраном, то сыворотка сохраняет способность усиливать кооперативные способности РА. Установлено, что не оказывают потенцирующего эффекта на кооперативность РА пробы сыворотки крови, взятой у молодых крыс и старых крыс (28-мес) в разное время суток.

**Ключевые слова:** тестикулярная ткань, связывание <sup>3</sup>H-5- $\alpha$ -дигидротестостерона, цитозольные рецепторы андрогенов (РА), модулятор кооперативной активности РА.

**ВВЕДЕНИЕ.** Эффекты андрогенов, как установлено, реализуются в клетках-мишенях тканей (печени, мышц, простаты и др.) посредством специализированных рецепторов [1-3]. Известно также, что ткань семенников является гормон-(андроген)-зависимой, и рецепторы андрогенов (РА) функционируют во всех типах клеток данного органа (Лейдига, Сертоли, миоидных, сперматидях, сперматоцитах) [4,5]. При этом в самих клетках Лейдига происходит основной синтез андрогенов в организме [6]. Оценка ряда параметров внутриклеточных стероид-рецепторных белков тестикулярной ткани представляет собой один из высокочувствительных маркерных тестов для анализа функционального состояния клеток репродуктивной сферы и позволяет проследить интегральные показатели динамики эндокринных процессов в гонадах [5,7,8].

Целью настоящей работы явилось изучение кооперативных характеристик РА семенников и выяснение новых возможностей их регуляции в различных экспериментальных условиях.

**МЕТОДИКА.** В работе использовали: 5- $\alpha$ -дигидро-/1,2,6,7-[<sup>3</sup>H<sub>4</sub>]-тестостерон ([<sup>3</sup>H]-ДГТ; удельная активность 2760 ТБк/моль), ("Изотоп", Россия);

## КООПЕРАТИВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕЦЕПТОРОВ АНДРОГЕНОВ

17- $\alpha$ -[ $^3\text{H}$ ]-метилтриенолон ([ $^3\text{H}$ ]-R1881; удельная активность 3182 ТБк/моль) ("NEN", США); тестостерон (Т), 5- $\alpha$ -дигидротестостерон (ДГТ), эстрадиол ( $\text{E}_2$ ), прогестерон (Пр), кортикостерон (К), триамцинолонацетонид (ТА) ("Serva", ФРГ), метилтриенолон (R1881) ("NEN", США); мерсалиловую к-ту и  $\alpha$ -монотиоглицерол, активированный уголь Norit A и декстран Т70 ("Sigma", США); голубой декстран и дитиотрейтол ("Reanal", Венгрия), трис(гидроксиэтил)аминометан (трис-НСI) и набор маркерных белков с известной молекулярной массой "MS-II" ("Serva", ФРГ), контрикал ("Arzneimittelwerk", ФРГ); Toyoparl-HW-55F ("Toyo Soda", Япония); сцинтилляционную жидкость ЖС-8 ("Монокристаллреактив", Украина).

Исследования выполнены на самцах крыс-альбиносов Вистар 6- и 28-мес возраста. Крыс декапитировали, как правило, утром в 8.30 до кормления, а также, для отбора крови в 10.30 и 14.30. Кровь животных собирали в пробирки с последующим центрифугированием (2000 г, 15 мин) и надосадочную жидкость (сыворотку) непосредственно использовали в экспериментах.

Все процедуры анализов подробно описаны ранее [2,7-9]. Цитозоль получали из гомогенатов декапсулированных тестикул (после выделения семенников, освобождения их от соединительной капсулы и гомогенизации ткани в гомогенизаторе "стекло-тефлон" при соотношении ткань:буфер = 1:6, по объему) на холоду (4°C). Аналогичным образом готовили гомогенаты печени, а в случае вентральной простаты использовали гомогенизатор "стекло-стекло". В процессе гомогенизации использовали стандартный буферный раствор следующего состава: 20 мМ трис-НСI, 10<sup>5</sup> МЕ/л контрикал, 10% глицерин (об/об), 300 мкМ мерсалил натрия (мерсалиловую кислоту растворяли добавлением в буферный раствор 1 м. NaOH), pH 7,4 (20°C) и далее центрифугировали (105000 г, 60 мин, 4°C), используя ротор "Ti-50" (Beckman L8-50M/E, США). Супернатант (цитозоль) отбирали шприцем во избежание загрязнения липидами. Адсорбцию эндогенных андрогенов осуществляли согласно [2] обработкой сыворотки и/или цитозоля при 4°C в течение  $\geq 30$  мин декстранпокрытым активированным углем (соотношение 9:1, конечная конц. угля - 2,5%) на шейкере 358S (Польша). Уголь осаждали центрифугированием (5000 г, 4°C, 4 мин). Далее аликвоты препаратов цитозоля (по 1 мл) в буфере (20 мМ Трис-НСI, 10%-ный (об/об) глицерин, 10<sup>5</sup> МЕ/л контрикал, 25 мМ  $\alpha$ -моно-тиоглицерол, pH 7,4 при 20°C) для быстрого достижения стационарного состояния прогревали 12 мин при 24°C с [ $^3\text{H}$ ]-ДГТ в диапазоне "физиологических" концентраций ( $T_{\text{add}}$ ) 0,2-4,0 нМ и 120 мин инкубировали при 4°C [8]. Использование  $\alpha$ -монотиоглицерола необходимо для восстановления нативной конформации РА [9]. Сочетанное применение мерсалила и  $\alpha$ -монотиоглицерола, позволяющее избавиться от эндогенных стероидов и влияния примесных андроген-специфичных нерцепторных белков крови и семенников (транспортные ТеСГ, АСБ [6,9]), на порядок ускоряет андроген-рецепторный анализ (рис.1,2). Так при 24°C (после удаления эндогенных андрогенов) насыщение сайтов рецепции гормона в реакционной системе устанавливалось примерно за 10 мин инкубации (рис.3). Несвязанный белком стероид удаляли при 4°C 3-х минутной твёрдофазной адсорбцией суспензией активированного угля Norit A (0,5%) с декстраном Т70 (0,05%). Эффективность удаления стероидов была  $\geq 99,8\%$ . Пробы исполняли в дубликатах. Уголь осаждали центрифугированием (5000 г, 4°C, 4 мин). Надосадки по 0,5 мл переносили во флаконы из безкалиевого стекла и после добавления 10 мл ЖС-8 измеряли радиоактивность на  $\beta$ -счетчике "Mark-III" (Tracor Analytic, США).

Концентрации сайтов специфического ( $B_{\text{макс}}$ , пМ) и удельного ( $N_{\text{a}}$ , фмоль/мг белка) связывания [ $^3\text{H}$ ]-ДГТ рассчитывали в координатах Скэгггарда [2]. Для этого величины специфического связывания ( $B = B_{\text{sp}}$ ) измеряли как разность между связываниями общим ( $B$ ) и неспецифическим ( $B_{\text{нсп}}$ , в условиях инкубации с 200-кратными избытками немеченого ДГТ). Несвязанный с РА [ $^3\text{H}$ ]-ДГТ ( $U$ ) вычисляли как разность между  $T_{\text{add}}$  и  $B$ . Равновесные константы диссоциации и ассоциации

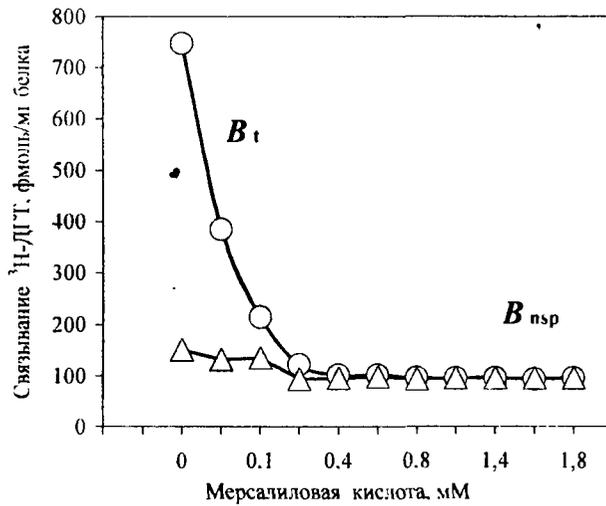


Рисунок 1.

Диссоциация  $[^3\text{H}]$ -ДГТ из андроген-рецепторных комплексов (АРК) цитозоля семенников крысы в зависимости от концентрации мерсапиловой кислоты после 30 мин инкубации при  $4^\circ\text{C}$ . Цитозоль выделен из гомогената с использованием стандартного буферного раствора (с 0,5 мМ дитиотрейголом без мерсапила), предобработан активированным углем ( $4^\circ\text{C}$ , 15 ч на шейкере) для удаления эндогенных гормонов, а меченые АРК получены инкубацией ( $4^\circ\text{C}$ , 18 ч) цитозоля и  $[^3\text{H}]$ -ДГТ (4 нМ) с определением величин  $B_t$  (общего) и  $B_{nsp}$  (неспецифического) связывания метки.

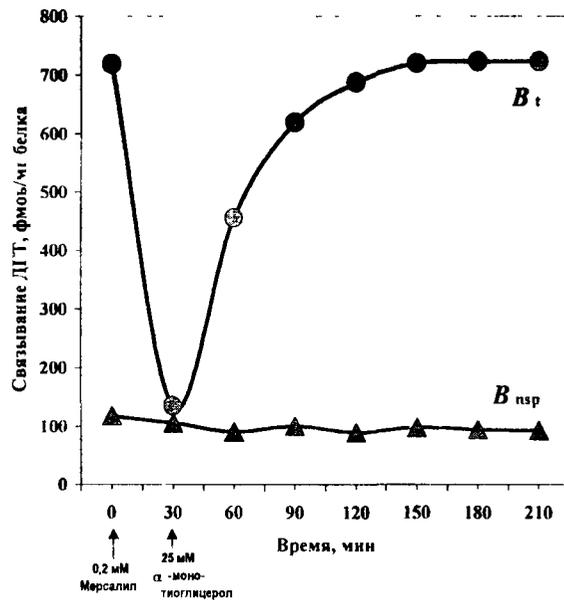


Рисунок 2.

Временная динамика обратимости диссоциации гормона из андроген-рецепторного комплекса при инкубации с  $\alpha$ -монотиоглицеролом тестикулярного цитозоля предварительно меченого  $[^3\text{H}]$ -ДГТ (4 нМ,  $4^\circ\text{C}$ ) на основании измерений величин  $B_t$  (общего) и  $B_{nsp}$  (неспецифического) связывания метки.

( $K_d = 1/K_a$ , нМ), а также кооперативные характеристики (коэффициенты Хилла,  $\eta_H$ ) рецепторов андрогенов, характеризующие его конформационные состояния, измеряли согласно [7]. Концентрацию белка в пробах определяли по Lowry [10]. Данные обрабатывали статистически [11].

Хроматографический анализ РА проводили методом гельфильтрации с применением колонки из стекла (2x22 см), после заполнения ее суспензией гранул

### КООПЕРАТИВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕЦЕПТОРОВ АНДРОГЕНОВ

Toyoparl HW-55F при 70°C в 20 мМ трис-НСl буфере (с 0,5 мМ дитиотрейтолом без мерсалила и глицерина), согласно инструкции фирмы изготовителя. После пропускания 300 мл буфера колонку использовали в дальнейшей работе. Предварительно, вслед за удалением эндогенных стероидов (15 ч, 4°C), РА метили инкубируя цитозоли (18 ч, 4°C) в системе с синтетическим андрогеном [<sup>3</sup>H]-R1881 (50 нМ) с добавлением 1000-кратных избытков немеченого триамцинолон-ацетонида (во всех пробах для предотвращения связывания этого меченого лиганда с рецептором прогестерона [12]) и ДГТ (в пробах с подавлением связывания метки с РА), что позволяет избавиться от влияния на анализ андроген-связывающих нерепетиторных (транспортных) белков [6,13]. На колонку наносили 400-600 мкл анализируемого образца цитозоля и элюировали буферным раствором с помощью перистальтического насоса "НП-1М" (СССР) со скоростью 1 мл/мин. Калибровку колонки проводили с помощью коммерческого набора MS-II, содержащего альдолазу (160 кДа), альбумин (67 кДа), овальбумин (45 кДа), химотрипсиноген (25 кДа), миоглобин С (17,8 кДа). Свободный объем колонки (V<sub>0</sub>), определяемый с помощью голубого декстрана, составлял 28 мл. Фракции по 1,5 мл отбирали при помощи коллектора фракций "FCC-60" (Чехия). Аликвоты фракций переносили во флаконы для счета и добавляли ЖС-8. Радиоактивность проб просчитывали на "Mark-III".

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Основную проблему при радиолигандном анализе РА в семенниках создают повышенные концентрации эндогенного тестостерона и требуется около полутора суток для предварительной сорбции немеченых стероидов и последующего насыщения сайтов рецепции меченым андрогеном [4,6,7]. Для решения этой проблемы и ускорения достижения равновесного состояния в системе инкубации при измерениях характеристик рецепторного связывания применили предложенную ранее модификацию процедуры определения [9] с использованием (перед удалением стероидов активированным углем) мерсалиловой кислоты для быстрой диссоциации эндогенных гормонов из исходных андроген-рецепторных комплексов. - реакции далее обратимой α-моноглицеролом. На основании серии экспериментов (рис.1,2,3) была подобрана оптимальная схема проведения анализов, позволяющая корректно рассчитывать параметры РА.

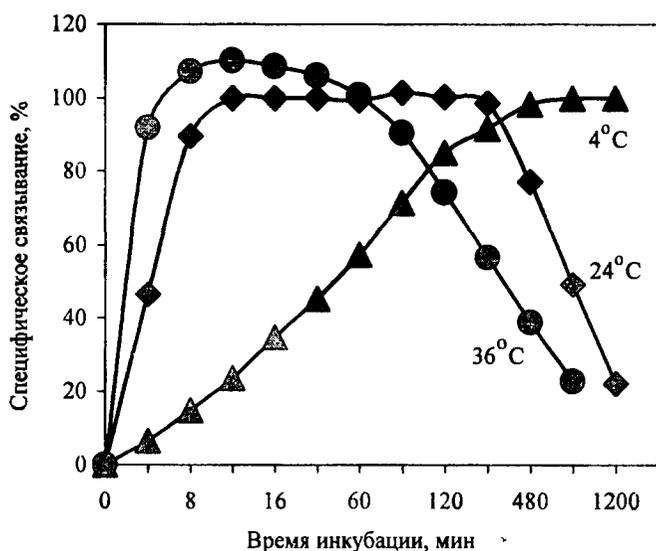


Рисунок 3.

Динамика андроген-рецепторных взаимодействий после освобождения тестикулярного цитозоля от эндогенных стероидов в зависимости от температуры инкубации на основании измерений специфического связывания [<sup>3</sup>H]-ДГТ (4 нМ)

Общую оценку андроген-специфичных белков тестикулярного цитозоля проводили путем гельфильтрации на Toyopearl HW-55F (рис.4). В ходе фракционирования выделяются три пика радиоактивности, два из которых совпадают с профилем элюции белка. Предварительная инкубация цитозолей с ДГТ приводит к исчезновению первого пика (I) и существенному уменьшению второго (II). Полученные результаты, наряду с анализом стероидспецифичности связывания андрогенов (табл.1), указывают на наличие в образцах нескольких форм рецепторов, вероятно, олиго-, ди- и мономеров РА во фракциях I-го и II-го пика. Кроме того одной из причин такого распределения является присутствие в анализируемых образцах переходных форм рецепторных молекул (см ниже). Что

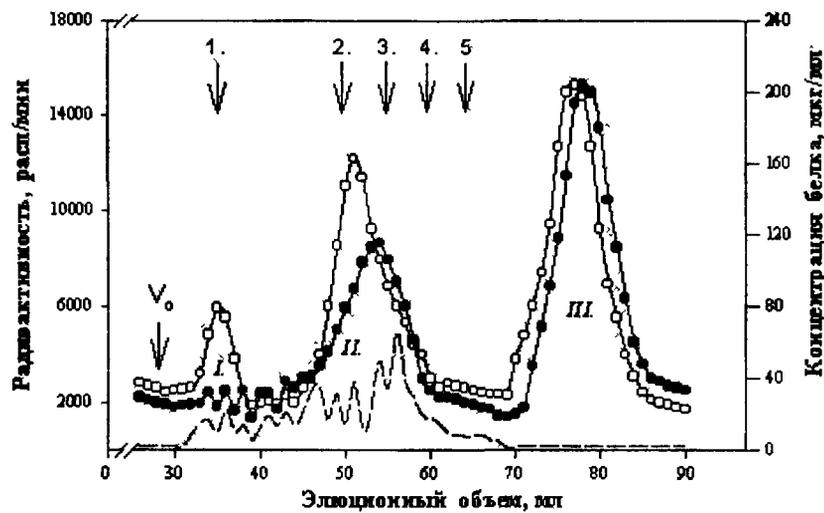


Рисунок 4.

Гельфильтрация образцов тестикулярного цитозоля, предварительно проинкубированного с метилтриенолоном ([3H]-R1881, 50 нМ) в присутствии 1000-кратного избытка триамцинолонацетонида на колонке с Toyopearl HW-55F. Обозначения: -o-o- без добавления избытка немеченого дигидротестостерона (ДГТ); ••• с добавлением 1000-кратного избытка немеченого ДГТ; ----- профиль элюции белков цитозоля; Маркеры молекулярной массы: 1. - альдолаза (160 кДа); 2. - альбумин (67 кДа); 3. - овальбумин (45 кДа).

Таблица 1. Сравнительный анализ специфичности цитозольных андроген-рецепторных взаимодействий в печени, вентральной простате и семенниках 6-мес крыс

Объект	Ингибирование специфического связывания (%) <sup>3</sup> H-5-α-дигидротестостерона (3,5 нМ) 250-кратными избытками различных немеченых стероидов*							
	Т	ДГТ	МТ	Е <sub>2</sub>	Пр	К	ТА	Х
Печень крысы:								
цитозоль	22,2	97,8	58,9	1,8	0,7	0,6	0,8	0,2
Простата крысы:								
цитозоль	22,0	97,4	59,9	2,4	1,1	0,6	0,7	0,1
Семенник крысы:								
цитозоль	22,4	94,7	58,6	2,2	1,8	0,7	0,9	0,3
РА (пик I)**	22,3	100,0	58,4	2,1	0,8	0,5	0,6	0,0
РА (пик II)**	22,8	100,0	59,4	2,0	1,3	0,4	0,5	0,2

Примечание: \*Конкурирующие стероиды: Т - тестостерон; ДГТ - 5-α-дигидротестостерон; МТ - метилтриенолон (R1881); Е<sub>2</sub> - эстрадиол; Пр - прогестерон, К - кортикостерон; ТА - триамцинолона ацетонид, Х - холестерин. \*\*Для фракций рецептора андрогенов (РА) после гельфильтрации на Toyopearl HW-55F.

### КООПЕРАТИВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕЦЕПТОРОВ АНДРОГЕНОВ

касается третьего пика (*III*), то он, по-видимому, представляет собой свободную форму [<sup>3</sup>H]-R1881, образующуюся в процессе дилуции при диссоциации стероида из лиганд-белковых комплексов. После калибровки хроматографической колонки белками-стандартами с известной молекулярной массой была определена молекулярная масса РА-белков пиков *I* и *II*, - 120-240 кДа и 50-80 кДа.

Как известно, для многих белков характерны перестройки мономерных форм в димерные и олигомерные. Они происходят самопроизвольно или под действием регуляторных механизмов, но при этом они приобретают способность к кооперативному взаимодействию со своими лигандами, например, в случае "гемоглобин-кислородной" системы [3,14]. Выяснение особенностей андроген-белкового взаимодействия и анализ специфического связывания [<sup>3</sup>H]-ДГТ с РА в координатах Скэтчарда и Хилла подтвердили эту закономерность (рис.5,6, табл.2). Так, в исходном "нативном" цитозоле рецепция гормона характеризуется высокой положительной кооперативностью специфического связывания лиганда, т.к. коэффициент Хилла достигает 2,03-2,36, и это предполагает наличие димерного состояния РА [7,14,15]. Разведение цитозоля, по-видимому, приводит к разрушению димеров и потере кооперативности связывания [<sup>3</sup>H]-ДГТ, поскольку значения коэффициента Хилла снижаются до 0,96-1,03. Реакция обратима. Так, ранее сообщалось о димеризации РА (4,5S→8S) в простате у мышей, вызываемой экзогенными инъекциями пролактина (24 кДа, 198 аминокислотных остатков), и при этом также отмечалась потеря стероид-связывающей способности одной из РА-субъединиц [16]. Мы в экспериментах на крысах получили аналогичные данные о возможности формирования в определенных условиях димерных форм андроген-рецепторных комплексов (АРК), связывающих лишь одну молекулу гормона-стероида, зажимая её между сайтами посадки андроген-связывающих доменов по типу "одна вещь спрятана между двух ладоней" [7].

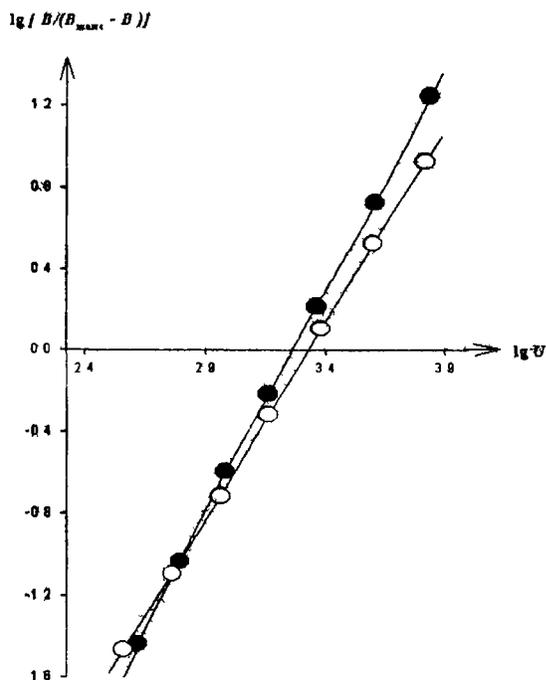


Рисунок 5.

Сравнительный анализ в координатах Хилла при разных температурах специфического цитозольного связывания [<sup>3</sup>H]-ДГТ у 6-месячных крыс. Обозначения: -●- исходный цитозоль (концентрация белка 2,81 мг/мл), при температуре инкубации равной 4° С, -○- исходный цитозоль (концентрация белка 2,81 мг/мл), при температуре инкубации равной 36° С.

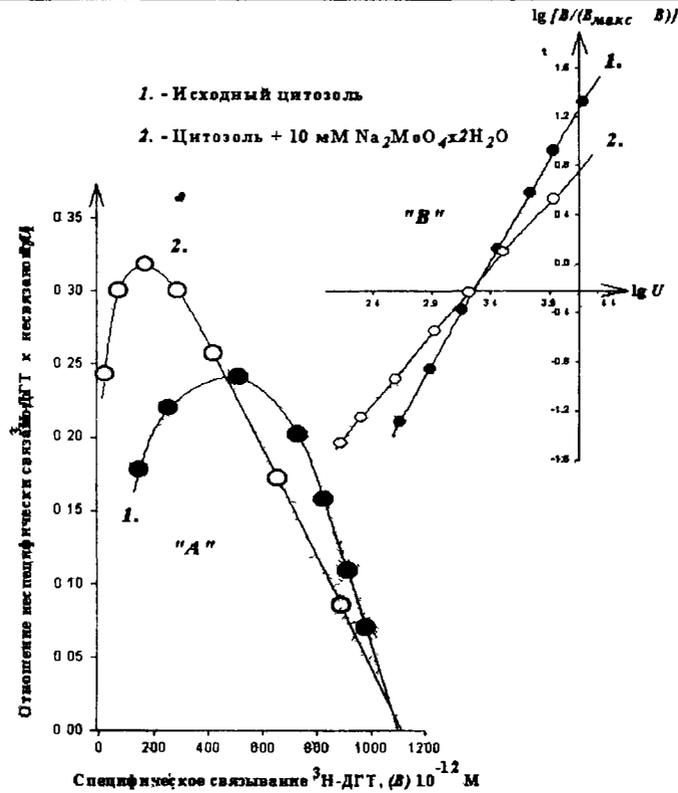


Рисунок 6.

Анализ в координатах Скэтчарда ("А") и Хилла ("В") специфического связывания [3H]-ДГТ рецептором андрогенов в тестикулярном цитозоле крыс 6-месячного возраста

Таблица 2. Влияние добавления микроколичеств (1/20) различных образцов сыворотки крови на кооперативные характеристики тестикулярного РА крыс 6-мес возраста

Условия эксперимента	Белок <sup>†</sup> , мг/мл	Изучаемые характеристики РА		
		N <sub>a</sub> , фмоль мг белка	K <sub>d</sub> , нМ	η <sub>нш</sub>
Контроль "А" (исходный цитозоль)	2,81	594 ± 18	1,96 ± 0,08	2,08 ± 0,07
Контроль "В" (цитозоль разведен)	0,24	532 ± 14*	2,51 ± 0,48	1,02 ± 0,15*
Контроль "В" + интактная сыворотка (8.30) <sup>#</sup> от 6-мес крыс	0,26	562 ± 18	1,79 ± 0,38	2,21 ± 0,06*
Контроль "В" + сыворотка (8.30) от 6-мес крыс после 15 ч (0-4°C) предобработки актив. углем	0,25	580 ± 15	1,64 ± 0,33	2,18 ± 0,14*
Контроль "В" + интактная сыворотка (10.30) от 6-мес крыс	0,26	531 ± 22	2,08 ± 0,17	1,12 ± 0,07
Контроль "В" + интактная сыворотка (14.30) от 6-мес крыс	0,26	605 ± 46	2,04 ± 0,32	1,09 ± 0,03
Контроль "В" + интактная сыворотка (8.30) от 28-мес крыс	0,27	583 ± 41	1,96 ± 0,39	1,04 ± 0,05
Контроль "В" + интактная сыворотка (14.30) от 28-мес крыс	0,27	576 ± 40	1,96 ± 0,35	1,04 ± 0,07

Примечания. N<sub>a</sub> - содержание сайтов специфического связывания гормона; K<sub>d</sub> - равновесная константа ассоциации; K<sub>d</sub> - равновесная константа диссоциации; η<sub>нш</sub> - коэффициент кооперативности Хилла, индикатор конформационного состояния РА. † Концентрация белка в системе инкубации. В скобках указано время отбора крови у живогных. \* Различия статистически достоверны при p < 0,05 (n=8) по отношению к контролю.

## КООПЕРАТИВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕЦЕПТОРОВ АНДРОГЕНОВ

Задаваясь вопросом о том, насколько близка к нативной природной димерная конформация рецептора *in vitro*, мы провели сравнительный анализ рецепции [<sup>3</sup>H]-ДГТ при 4°C и 36°C в координатах Хилла (рис.5). В итоге было выявлено, что димерная конформация рецептора "работает" и при физиологической температуре (36°C), так как снижение величин  $\eta_n$  по серии опытов составило всего около 7-10%. В связи с этим представлялось важным оценить параметры андроген-рецепторного взаимодействия в координатах Скэтчарда и Хилла при добавлении в инкубационную среду  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (10 мМ). Это соединение используется для предотвращения инактивации стероидных рецепторов, так как  $[\text{MoO}_4]^{2-}$  способен экранировать тиольные группы [17]. Наши результаты подтверждают идентичность величин  $B_{\text{макс}}$  и  $K_d$  в опыте и контроле, но при этом, судя по кооперативности ( $\eta_n = 1,05$ ), они свидетельствуют о том, что молибдат-ион "искажает" исходную "нативную" димерную конформацию (рис.6).

Исследованная нами ранее зависимость кооперативных свойств рецептора от степени разведения цитозольных систем позволила предположить, что активная конформация РА поддерживается не только стероидом, но возможно и каким-то внеклеточным фактором регуляции, причем проверка этого предположения показала, что нативный димер не восстанавливается при добавлении к цитозолу, содержащему мономеризованный РА, микроколичеств концентрированного интактного цитозоля и исходного концентрированного цитозоля с липидной фракцией [7]. Однако добавления микроколичеств сыворотки крови восстанавливало димерную конформацию тестикулярного РА (табл. 2) и повышало значения  $\eta_n$  от 1,04 до 2,21. В ходе дополнительных экспериментов было установлено, что сыворотка старых самцов (28-мес) не обладает способностью восстанавливать димерную форму РА и димеризационный эффект отсутствует также при использовании сыворотки крови, отобраной не в ранние утренние часы, а в более позднее время суток (табл.2). В то же время после проведения 15 ч (0-4°C) предобработки сыворотки 6-мес крыс 2,5%-ной суспензией активированного угля она сохраняла способность вызывать эффект димеризации РА. Значительно более высокое (чем в цитозоле) содержание в сыворотке несорбируемого декстран-покрытым углем фактора димеризации указывает, что несмотря на гемато-тестикулярный барьер, кооперативные свойства внутриклеточного РА могут регулироваться сывороточным нестероидным модулятором конформационного состояния (МРА), однако природа этого фактора остается неизученной. Исходя из данных об АРК [16,18,19], молекулярная масса МРА может составить не более  $[237\text{кДа} - (2 \times 110\text{ кДа})] = 17\text{ кДа}$ , следовательно, данный фактор пролактину (24 кДа) не идентичен. В связи с этим интересна работа [20], в которой сообщается о выделении из клеток раковой опухоли простаты человека РА-ассоциированного белка (необходимого для рецептора энхансера андроген-зависимой транскрипционной активности), состоящего из 70 аминокислотных остатков (молекулярная масса = 8,4 кДа, т.е. вдвое меньше 17 кДа). Этот белок практически не изменял эстроген-, прогестерон-, и глюкокортикоид-зависимые транскрипционные активности в клеточной системе DU145 *in vitro*. Фактор димеризации или модулятор конформационной активности (МСА) не может быть ни ингибитором, блокирующим превращение РА в ДНК-связывающую форму, ни фактором F, активирующим рецептор, так как все они имеют внутриклеточное происхождение [17]. На наш взгляд, МРА-фактор сыворотки крови содействует реактивации поступающих из ядра клетки мономеров АРК, фиксируя стабилизированную стероидом активную конформацию рецепторной молекулы, и, таким образом, участвует в запуске нового цикла челночного механизма андроген-рецепторного аппарата клетки.

Автор выражает благодарность своему научному руководителю доктору медицинских наук, профессору, академику Евгению Фёдоровичу Конопле за существенную помощь, оказанную в ходе обсуждения результатов экспериментов и подготовки рукописи.

Эта работа была поддержана грантом БРФФИ № 99Р-216.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мейнуоринг У. (1979) Механизмы действия андрогенов. М.: Мир.
2. Конопля Е.Ф., Попов Е.Г. (1987) Проблемы эндокринологии, **33**, (3), 75-79.
3. Кольман Я., Рем К.Г. (2000) Наглядная биохимия. - М.: Мир.
4. Wilson E.M., French F.S. (1976) J. Biol. Chem., **251**, 5620-5629.
5. Vornberger W., Prins G., Musto N.A., Suarezquian C.A. (1994) Endocrinology, **134**, 2307-2316.
6. Розен В.Б. (1994) Основы эндокринологии. М.: МГУ.
7. Конопля Е.Ф., Попов Е.Г. (1993) Докл. НАН Беларуси, **37**, (3), 77-81.
8. Попов Е.Г., Куц Ф.И., Белоусов О.Л. (2002) Радиационная биология. Радиоэкология, **42**, 86-91.
9. Traish A.M., Muller R.E., Wotiz H.H. (1981) J. Biol. Chem., **256**, 12028-12033.
10. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
11. Лакин Г.Ф. (1990) Биометрия. М.: Высш. школа.
12. Wilbert D.M., Griffin J.E., Wilson J.D. (1983) J. Clin. Endocr. & Metabol., **56**, 113-120.
13. Конопля Е.Ф., Лукша Г.Л. (1991) Гормоны и старение. Цитоплазматическая рецепция стероидных гормонов. Минск: Наука и техника.
14. Владимиров Ю.А., Роцупкин Д.И., Потапенко А.Я., Деев А.И. (1983) Биофизика. М.: Медицина.
15. Nemoto T., Oharanemoto Y., Shimazaki S. et al. (1994) J. Steroid Biochem. & Mol. Biol., **50**, 225-233.
16. Colvard D.S., Wilson E.M. (1981) Endocrinology, **109**, 496-504.
17. Конопля Е.Ф., Лукша Г.Л. (1987) Гормоны и старение. Стероидные гормоны и геном клетки. Минск: Наука и техника.
18. Rossini G.P., Liao Sh. (1982) Biochem. J., **208**, 383-392.
19. Colvard D.S., Wilson E.M. (1987) Endocrinology, **121**, 931-940.
20. Yeh S.Y., Chang C.S. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 5517-5521.

Поступила 09.02.2003

STUDY OF ANDROGEN RECEPTOR COOPERATIVE CHARACTERISTICS

*E. H. Popoff*

Institute of Radiobiology, Belarus Nat. Acad. Sci., Kuprevich st.2., Minsk, 220141 Belarus.  
tel.: 2644672, fax : +375 (0172) 642315, e-mail: IRB@RADBIO.BAS-NET.BY )

Molecular characteristics of the androgen receptor (AR) from 6-months old albino rat testes were studied. Using radioligand methods, gel filtration on Toyopearl HW-55F column and analyses of specific testicular cytosol 5- $\alpha$ -dihydrotestosterone binding in Scatchard and Hill plots it was shown that functional androgen receptor complexes (ARC's) are dimers exhibiting positive cooperativity during hormone ligand binding. The cooperative properties of AR were stable not only at 4°C (Hill coefficient = 2.11) but also at physiological temperature of 36°C (Hill coefficient = 1.95).

Presence of Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (10 mM) and/or dilution of cytosols reduced Hill coefficient to 1.03. Addition of morning (but not afternoon) blood sera microquantities (1:20) to monomerized AR preparations resulted in the AR dimerization and restoration of their positive cooperative properties for hormone binding. The effect of morning sera persisted through their pretreatment (15-h at 4°C) with suspensions of 2.5% dextran coated charcoal. Sera from 28-months old rats lacked AR dimerizing activity.

**Key words:** testicular tissue, [<sup>3</sup>H]-5- $\alpha$ -dihydrotestosterone binding, cytosol androgen receptors (AR), modulator of AR cooperative activity.