



АФФИННОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ СОЕДИНЕНИЙ, СПЕЦИФИЧНЫХ К ТИРОКСИНУ, ИЗ ПРОРОСТКОВ ФАСОЛИ

Гарипова М.И., Федяев В.В.

Уфимский университет науки и технологий, Россия, 450076, Уфа, ул. Заки Валиди, 32
E-mail: margaritag@list.ru

Резюме

В последнее десятилетие значительные успехи были достигнуты в исследовании растительных аналогов гормонов млекопитающих и человека. Если, подобно тому, как это происходит в животной клетке, эти соединения выполняют роль регуляторов метаболизма, встает вопрос о существовании рецепторов к ним и возникает необходимость исследования механизмов внутриклеточного сигналинга. На аффинном сорбенте с иммобилизованным тироксином из проростков фасоли выделены соединения, которые, предположительно, принимают участие в рецепции растительных аналогов йодтиронинов. Процедуру аффинного выделения рецепторов к растительному аналогу тироксина с последующим определением концентрации трийодтиронина в выделенных фракциях повторяли 15 раз ($n=15$). Предполагали, что концентрация сайтов связывания аналогов тироксина равна концентрации гормона, определенной в пробе методом иммуноферментного анализа, таким образом, исходили из предположения о полной загруженности сайтов связывания гормоном. Вычисление среднего значения концентрации сайтов связывания в пробах и абсолютных ошибок проводили с использованием программы Statistica for Windows версии 10. Рассчитывали среднее количество сайтов связывания йодтиронина (A) в пикомолях в расчете на 1 грамм сырой массы ткани (пмоль/г) по формуле $A = (C \cdot V) / m$, где C - средняя концентрация сайтов связывания тироксина в ммоль/л, определенная методом иммуноферментного анализа, V - объем элюированной фракции, m - масса навески проростков фасоли в граммах. Показано, что выделенное соединение представляет собой нуклеопроteid с содержанием нуклеиновой кислоты около 11% и содержит сайты связывания не только тироксина, но и стероидных гормонов.

Ключевые слова: растительный аналог тироксина, внутриклеточный рецептор, аффинное выделение, нуклеопроteid.

Цитирование: Гарипова М.И., Федяев В.В. Аффинное выделение соединений, специфичных к тироксину, из проростков фасоли // Biomics. 2022. Т.14(4). С.349-352. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-36

© Авторы

AFFINITY PREPARATION OF THYROXINE-SPECIFIC COMPOUNDS FROM BEAN SEEDLINGS

Garipova M.I., Fedyaev V.V.

Ufa University of Science and Technology, 32 Zaki Validi str., Ufa, 450076, Russia
E-mail: margaritag@list.ru

Resume

In the last decade, significant progress has been made in the study of plant analogues of mammalian and human hormones. If, just as it happens in an animal cell, these compounds act as regulators of metabolism, the question arises about the existence of receptors for them and there is a need to study the mechanisms of

intracellular signaling. With help of affinity sorbent with immobilized thyroxine presumably take part in the reception of plant analogues of iodothyronines compounds were isolated from bean seedlings. The procedure of affinity isolation of receptors to the plant analogue of thyroxine with subsequent determination of the concentration of triiodothyronine in the isolated fractions was repeated 15 times ($n=15$). It was assumed that the concentration of binding sites of thyroxine analogues is equal to the concentration of the hormone determined in the sample by enzyme immunoassay, thus, it was assumed that the hormone binding sites were fully loaded. The calculation of the average concentration of binding sites in samples and absolute errors was carried out using the program Statistica for Windows version 10. The average number of iodothyronine (A) binding sites in picomoles per 1 gram of raw tissue mass (pmol/g) was calculated using the formula $A=(C*V)/m$, where C is the average concentration of thyroxine binding sites in mmol/l determined by enzyme immunoassay, V is the volume of the eluted fraction, m is the weight of the bean sprouts in grams. It is shown that the isolated compound is a nucleoprotein with a nucleic acid content of about 11% and contains binding sites not only of thyroxine, but also of steroid hormones.

Key words: plant thyroxine analog, intracellular receptor, affinity isolation, ribonucleoproteins

Citation: Garipova M.I., Fedyaev V.V. Affinity preparation of thyroxine-specific compounds from bean seedlings. *Biomics*. 2022. V.14(4). P. 349-352. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-36 (In Russian)

© Authors

Введение

Несмотря на очевидные различия в молекулярных механизмах гормональной регуляции роста, развития и метаболизма растений и животных, за последние десятилетия накоплены факты, свидетельствующие о существовании у растений структурных аналогов многих гормонов животных, в том числе гормонов щитовидной железы [Clouse 2011; Lima et al, 2012; Mondal et al, 2017; Куракин и др. (Kurakin et al), 2018; Gancheva et al, 2019; Гарипова М.И. и др. (Garipova et al.), 2020]. Исходя из предположения о том, что подобно тироксину животных, в растительном организме антигенподобные тироксину соединения также выполняют роль регуляторов метаболизма, мы поставили перед собой цель выделить рецепторы к ним из растительной ткани методом аффинной хроматографии на сорбенте с иммобилизованным тироксином.

Материалы и методы

Синтез сорбента с иммобилизованным тироксином проведен по ранее описанному методу [Гарипова и др. (Garipova et al.), 1993]. Для аффинного выделения рецепторов к растительному аналогу тироксина использовали лизат, полученный из семидневных проростков фасоли. 25 г проростков фасоли растирали с равным объемом сахарозного буфера с добавлением 1% лаурилсульфата натрия. Для аффинного выделения использовали надсадок, полученный после центрифугирования гомогената при 1 тыс./об./мин в течение 10 мин.

На аффинную колонку объемом 8 мл наносили 80 мл лизата, хроматографию проводили при скорости тока рабочего буфера 2 мл в минуту, не связанные компоненты отмывали 0,14 М сахарозой,

забуференной калий-фосфатным буфером до $pH=7,2$. Элюцию соединений, аффинных к тироксину, проводили 0,1 М уксусной кислотой. В элюате с объемом 10 мл после нейтрализации определяли содержание белка и нуклеиновых кислот спектрофотометрически, а также содержание аффинных к тироксину соединений и стероидов.

Иммуноферментное определение концентрации трийодтиронина и стероидов в пробах проводили с применением тест-систем «Т3 общий-ИФА-БЕСТ» и «Тестостерон общий-ИФА-БЕСТ» производства АО «Вектор-Бест» (Россия), основанных на методе одностадийного твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа с применением поликлональных антител к трийодтиронину.

Процедуру аффинного выделения рецепторов к растительному аналогу тироксина с последующим определением концентрации трийодтиронина в выделенных фракциях повторяли 15 раз ($n=15$). Предполагали, что концентрация сайтов связывания аналогов тироксина равна концентрации гормона, определенной в пробе методом иммуноферментного анализа, таким образом, исходили из предположения о полной загруженности сайтов связывания гормоном. Вычисление среднего значения концентрации сайтов связывания в пробах и абсолютных ошибок проводили с использованием программы Statistica for Windows версии 10. Рассчитывали среднее количество сайтов связывания йодтиронина (A) в пикомолях в расчете на 1 грамм сырой массы ткани (пмоль/г) по формуле $A=(C*V)/m$, где C - средняя концентрация сайтов связывания тироксина в ммоль/л, определенная методом иммуноферментного анализа, V - объем элюированной фракции, m - масса навески проростков фасоли в граммах.

Результаты и обсуждение

Показано, что аффинные к тироксину соединения, выделенные из лизатов семидневных проростков фасоли, являются нуклеопротеидами, с соотношением ОП_{260/280} 1,60±0,035, что соответствует 12,1 % нуклеиновой кислоты (Таблица 1). Методом иммуноферментного анализа показано, что концентрация растительных аналогов тироксина в

полученных пробах в среднем составляет 59,33±9,7 нмоль/л, что соответствует концентрации сайтов, аффинных к тироксину 23,9±2,7 пмоль/г. Заслуживает внимания тот факт, что в выделенном нуклеопротеидном комплексе обнаружено присутствие сайтов, аффинных к стероидам в концентрации 13,44 нмоль/л.

Таблица 1

Характеристика фракций, полученных при аффинном выделении рецепторов к тироксину из проростков фасоли
Table 1 - Properties of fractions obtained by affinity isolation of thyroxine receptors from bean seedlings

№ пробы Sample No.	ОП _{260/280} Optical density 260/280	Концентрация сайтов, аффинных к тироксину в пробе, пмоль/г Concentration of thyroxine specific sites in the sample, pmol/g	Концентрация, сайтов, аффинных к стероидам, пмоль/г Concentration of steroid specific sites in the sample, pmol/g
1	1,52	20,79	13,06
2	1,73	19,15	12,78
3	1,67	31,33	16,52
4	1,54	30,49	13,44
5	1,60	37,39	13,36
6	1,58	10,48	14,48
7	1,55	20,39	13,46
8	1,51	34,62	12,44
9	1,63	22,81	12,12
10	1,71	22,81	14,46
11	1,67	17,39	12,22
12	1,53	23,27	13,15
13	1,59	29,33	14,16
14	1,56	14,48	12,23
15	1,55	16,29	14,32
Среднее значение Average value	1,60±0,035	23,9±2,7 пмоль/г	13,44 пмоль/л

Заключение

На основании сложной нуклеопротеидной природы выделенного рецептора к растительному аналогу тироксина, сделано предположение о том, что

выделен сложный комплекс, принимающий участие в регуляции транскрипции, содержащий, наряду с сайтами связывания растительных аналогов

тиреоидных гормонов, также сайты связывания стероидов.

Литература

1. Гарипова М.И., Федяев В.В., Фархутдинов Р.Г., Сотникова Ю.М. Выявление соединения, антигеноподобного трийодтиронину, в клетках высших растений // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. 10(4). С.639-646. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-639-646>
2. Гарипова М.И., Фролова И.С., Клева О.Б., Кузнецов В.П. Новый иммуносорбент на основе поливинилового спирта для очистки интерферона // Доклады академии наук России. 1993. Т.328. № 6. С. 736-739.
3. Куракин Г.Ф., Лопина Н.П., Бордина Г.Е. Анализ механизма действия жасмонатов методами вычислительной химии // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018. №4. С.23-29. <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-04-05>
4. Clouse S.D. Brassinosteroid Signal Transduction: From Receptor Kinase Activation to Transcriptional Networks Regulating Plant Development // *The Plant Cell*. 2011.23(4). P.1219–1230. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.084475>
5. Lima STC, Merrigan TL, Rodrigues ED. Synthetic and plant derived thyroid hormone analogs. In: Ward LS. (ed.) *Thyroid and parathyroid diseases – new insights into some old and some new issues* // In Tech. 2012. Chapter 15. P. 221–235. <https://doi.org/10.5772/35134>
6. Mondal S, Mughesh G. Novel thyroid hormone analogues, enzyme inhibitors and mimetics, and their action // *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2017. 458. P. 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.04.006>
7. Gancheva MS, Malovichko YV, Poliushkevich LO, Dodueva IE, Lutova LA. Plant peptide hormones // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2019. 66 (2). P.171–189. <https://doi.org/10.1134/S1021443719010072>

References

1. Clouse S.D. Brassinosteroid Signal Transduction: From Receptor Kinase Activation to Transcriptional Networks Regulating Plant Development. *The Plant Cell*. 2011.23(4). P.1219–1230. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.084475>
2. Gancheva MS, Malovichko YV, Poliushkevich LO, Dodueva IE, Lutova LA. Plant peptide hormones. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2019. 66 (2). P.171–189. <https://doi.org/10.1134/S1021443719010072>
3. Garipova M.I., Fedyaev V.V., Farkhutdinov R.G., Sotnikova Yu.M. Detection of a compound, the antigen of o-triiodothyronine, in cells of higher plants. *News of universities. Applied chemistry and biotechnology*. 2020. V.10(4). P.639-646. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-639-646>
4. Garipova M.I., Frolova I.S., Kleeva O.B., Kuznetsov V.P. A new immunosorbent based on polyvinyl alcohol for interferon purification. *Reports of the Russian Academy of Sciences*.1993. vol. 328. No. 6. P. 736- 739.
5. Lima STC, Merrigan TL, Rodrigues ED. Synthetic and plant derived thyroid hormone analogs. In: Ward LS. (ed.) *Thyroid and parathyroid diseases – new insights into some old and some new issues*. In Tech. 2012. Chapter 15. P. 221–235. <https://doi.org/10.5772/35134>
6. Mondal S, Mughesh G. Novel thyroid hormone analogues, enzyme inhibitors and mimetics, and their action. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2017. 458. P. 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.04.006>
7. Kurakin GF, Lopina NP, Bordina GE. Analysis of the mechanism action of jasmonates using computational chemistry approaches. *Voprosy biologicheskoi, meditsinskoi i farmatsevticheskoi khimii* [Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry]. 2018. 21(4). P.23–29. <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-04-05>