



УДК 577.112 [012.6+017]

СТАБИЛИЗАЦИЯ СТРУКТУРЫ α -ФЕТОПРОТЕИНА САХАРОЗОЙ© 1996 г. М. Д. Киркитадзе, Н. В. Нарижнева, А. Ю. Томашевский*,
С. А. Потехин, В. Н. Уверский[#]

Институт белка РАН, 142292, Пушкино Московской обл.;

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, 142292, Пушкино Московской обл.

Поступила в редакцию 23.11.95 г.

Методами сканирующей микрокалориметрии и флуоресцентной спектроскопии показано, что добавление сахарозы оказывает стабилизирующее воздействие на структуру α -фетопротейна человека (АФП). Наблюдаемый стабилизирующий эффект не устраняется в ходе восьмидневного диализа раствора АФП против буфера, не содержащего сахарозу, однако он может быть существенно ослаблен путем обработки АФП специфическим ферментом – инвертазой, расщепляющей сахарозу на фруктозу и глюкозу. Это может означать, что α -фетопротейн человека способен *специфически* связывать сахарозу.

Ключевые слова: α -фетопротейн, конформационная стабильность, сахароза, специфическое связывание.

α -Фетопротейн (АФП) – гликопротеин с молекулярной массой 68 кДа, относящийся к классу онкоэмбриональных белков. Высокое содержание АФП обнаруживается в плазме эмбрионов и новорожденных, тогда как у здоровых взрослых – лишь следовые количества. Повышение концентрации АФП у взрослых отражает развитие патологии, в частности возникновение гепатоклеточной карциномы и тератобластомы [1]. Установлено, что АФП участвует в различных физиологических процессах, например в транспорте ненасыщенных жирных кислот [2] и эстрогенов [3, 4], играет иммуносупрессивную роль [5], регулирует клеточный метаболизм [6] и мультипликацию клеток [7], может эффективно взаимодействовать с макрофагами [5] и Т-лимфоцитами [8]. Показано, что АФП имеет 35% гомологии по первичной структуре с человеческим сывороточным альбумином [9]. Приведенные выше факты указывают на огромную биологическую важность АФП. Однако работ, посвященных изучению структурных свойств этого белка и исследованию воздействия на него различных условий среды, немного. В частности, установлено [10, 11], что понижение pH раствора приводит к трансформации молекулы АФП в компактное денатурированное состояние с выраженной вторичной структурой, известное как состояние расплавленной глобулы [12].

Первоначально целью нашей работы было изучение устойчивости структуры АФП по отношению к тепловой и индуцированной изменением

pH денатурации, а также к разворачиванию мочевиной. Однако в ходе экспериментов было обнаружено принципиальное различие конформационной стабильности свежeweделенного АФП и белка, лиофилизованного из 0.2% раствора сахарозы (сахароза – инертное соединение, часто используемое в качестве криопротектора для хранения коммерческих препаратов белков).

Первые работы по криопротекции белков были проведены почти 35 лет назад, когда Шикама и Ямазаки впервые провели количественный анализ степени денатурации очищенного фермента – каталазы – в процессе замораживания-оттаивания [13]. Ими также установлено, что добавление стабилизирующих компонентов может в разной степени восстанавливать активность фермента в процессе оттаивания. В дальнейшем оказалось, что способность к криопротекции не ограничивается определенным классом химических соединений – этим свойством обладают сахара, полиолы, некоторые соли и белки [13–21]. Показано, что в основе механизма криопротекции лежит способность данного химического соединения образовывать после удаления воды неспецифические комплексы белок–криопротектор. Эти комплексы стабилизированы главным образом водородными связями [22].

В отличие от вышеизложенного результаты, полученные нами в ходе изучения влияния сахарозы на структуру и конформационную стабильность АФП, позволяют предположить, что в нашем случае имеет место *специфическое взаимодействие* между белком и дисахаридом.

Сокращения: АФП – α -фетопротейн.

[#] Автор для переписки.

Исследование устойчивости свежeweделенного АФП к изменению температуры и рН среды

Для изучения конформационной устойчивости АФП к изменению температуры и рН среды был использован метод дифференциальной сканирующей микрокалориметрии. На рис. 1 показаны кривые зависимости парциальной молярной теплоемкости от температуры АФП человека при разных значениях рН. Характерный пик поглощения тепла, наблюдаемый на термограммах (в интервале рН 10.4–5.0), связан с кооперативным разрушением жесткой третичной структуры белка [23]. Известно, что анализ калориметрической кривой позволяет определить значения энтальпий – эффективной $\Delta H^{\text{эфф}}$, рассчитываемой по уравнениям Вант-Гоффа, и калориметрической $\Delta H^{\text{кал}}$, определяемой из площади под калориметрической кривой. Сравнение этих параметров дает возможность сделать вывод о механизме данного конформационного перехода [23]. Действительно, в том случае, когда $\Delta H^{\text{кал}}/\Delta H^{\text{эфф}} \cong 1$, структура белковой молекулы представляет собой единую кооперативную систему, разрушение которой осуществляется без каких-либо промежуточных состояний. При этом в образование этой структуры может быть вовлечена как вся полипептидная цепь белковой молекулы, так и ее часть. В тех случаях, когда третичная структура белка сформирована из независимых или слабо взаимозависимых кооперативных единиц – доменов, $\Delta H^{\text{кал}}$ может существенно превосходить $\Delta H^{\text{эфф}}$ [24]. Оказалось, что для плавления свежeweделенного АФП отношение значений $\Delta H^{\text{кал}}$ и $\Delta H^{\text{эфф}}$ близко к 1 (табл. 1). Следовательно, структура молекулы свежeweделенного АФП представляет собой единую кооперативную систему.

В области щелочных и нейтральных рН устойчивость белка к тепловой денатурации остается практически неизменной, при этом значения энтальпий составляют 460–500 кДж/моль (табл. 1). Однако понижение рН до 5.0 вызывает существенную дестабилизацию белка (температура плавления снижается на 11°C, и наблюдается уменьшение энтальпии почти вдвое). Падение энтальпии вызвано, вероятно, ее температурной зависимостью. Инкремент теплоемкости при этом должен составлять величину 0.3 Дж/(г град), которая лежит в диапазоне значений, характерных для глобулярных белков [23]. Дальнейшее понижение рН (до 3.1) приводит к исчезновению пика теплопоглощения. Ранее нами было показано, что в этих условиях белок находится в состоянии расплавленной глобулы, которая характеризуется отсутствием жесткой третичной структуры [10]. Проводить калориметрические измерения в области значений рН > 10.5 невозможно ввиду сильной агрегации белка. В то же время уменьшение ионной силы со 150 до 10 мМ при рН 10.0 практи-

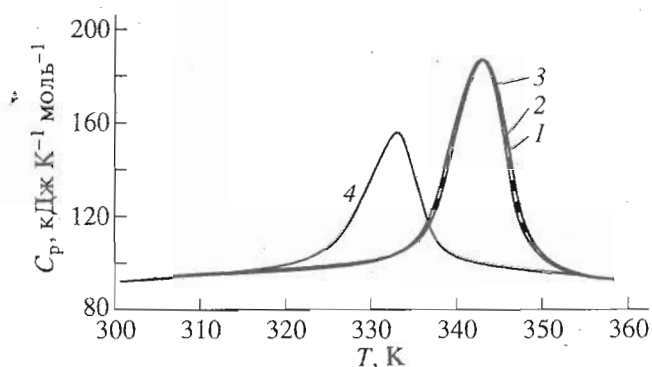


Рис. 1. Кривые зависимости парциальной молярной теплоемкости от температуры, полученные для свежeweделенного препарата АФП человека при рН 10.4 (1), 8.0 (2), 7.0 (3), 5.0 (4). Использовался PBS-буфер.

чески не изменяет ни температуру перехода, ни форму кривой.

Следует подчеркнуть, что полученные значения энтальпий тепловой денатурации свежeweделенного АФП достаточно низки для белка такой молекулярной массы (удельная энтальпия меньше 7.4 Дж/г). Обычно плавление таких глобулярных белков не является переходом типа “все или ничего” [24]. Эти факты можно было бы объяснить, предположив, что с самого начала мы имеем дело с частично денатурированным (расплавленным) белком (т.е. часть взаимодействий, поддерживающих третичную структуру, утрачена по каким-то причинам в процессе выделения или хранения) и увеличение температуры приводит к разрушению его остаточной жесткой третичной структуры. Поскольку и полная, и частичная денатурация белковой молекулы приводит к сильному возрастанию скорости протеолиза и увеличению числа протеолитических фрагментов [25], такое предположение легко проверяется с помощью ограниченного протеолиза. Однако оказалось, что АФП обладает чрезвычайно высокой устойчивостью по отношению к протеолитическим ферментам: заметной деградации не наблюдалось даже

Таблица 1. Термодинамические параметры тепловой денатурации свежeweделенного препарата АФП человека

рН	$T_d, ^\circ\text{C}$	$\Delta H_d^{\text{эфф}}$	$\Delta H_d^{\text{кал}}$	$\Delta H^{\text{эфф}}/\Delta H^{\text{кал}}$
		кДж/моль		
10.4	69.3	510 ± 20	480 ± 20	1.06
10.0	69.2	510 ± 20	490 ± 20	1.04
8.0	69.8	510 ± 20	490 ± 20	1.04
7.0	69.0	490 ± 20	460 ± 20	1.07
5.0	58.7	280 ± 10	270 ± 10	1.04

Примечание. Измерения проводили в PBS-буфере. Точность измерения температур составляет $\pm 0.3^\circ\text{C}$.

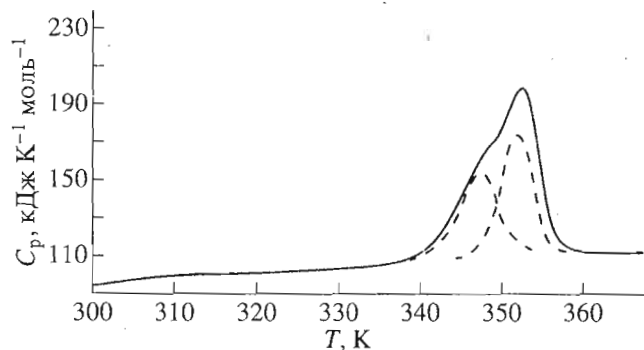


Рис. 2. Разложение функции парциальной молярной теплоемкости препарата АФП, лиофилизованного из 0.2% сахарозы. Измерения проводили в PBS-буфере, рН 7.0. Экспериментальная кривая изображена сплошной линией. Результаты разложения представлены штриховыми линиями.

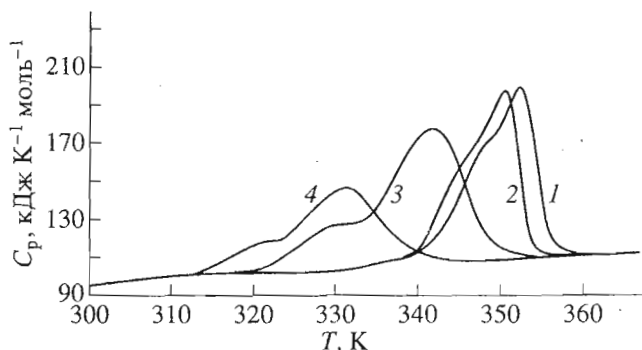


Рис. 3. Кривые зависимости парциальной молярной теплоемкости от температуры, полученные для препарата АФП человека, лиофилизованного из 0.2% сахарозы, при рН 10.0 (1), 7.0 (2), 6.0 (3), 5.0 (4). Использовался PBS-буфер.

после 3-часовой инкубации этого белка в присутствии трипсина, химотрипсина и ряда других протеиназ (данные не приведены) в условиях, когда развернутые белки полностью деградируют. Это, по-видимому, свидетельствует о том, что молекула свежесыделенного АФП не является частично расплавленной. Имеющиеся же особенности поведения этого белка при тепловой денатурации объясняются, вероятно, тем фактом, что структура белка в данном случае формируется при существенном участии лигандов, в частности ненасыщенных жирных кислот.

Исследование устойчивости АФП, лиофилизованного из сахарозы, к тепловой и рН-индуцированной денатурации

Совершенно другая картина наблюдалась при плавлении АФП, лиофилизованного из 0.2% сахарозы с последующим растворением в буфере

PBS (см. "Экспериментальную часть") и диализом в течение 1 сут против того же буфера (рис. 2). Опыт показал существенное изменение профиля калориметрической кривой: в данном случае наблюдается сложный процесс тепловой денатурации, который описывается двумя перекрывающимися по температуре простыми переходами (табл. 2). Помимо этого оказалось, что лиофильное высушивание из раствора сахарозы приводит к стабилизации белка по отношению к тепловой денатурации: заметно увеличиваются температура и энтальпия плавления (см. табл. 2). Сравнение данных, приведенных в табл. 1 и 2, показывает, что при нейтральных значениях рН энтальпия плавления комплекса модифицированного сахарозой АФП составляет ~900 кДж/моль, что почти в 2 раза больше соответствующей величины, полученной для свежесыделенного белка.

Из табл. 2 и рис. 3 видно, что плавление измененного сахарозой белка слабо зависит от рН в

Таблица 2. Термодинамические параметры тепловой денатурации препарата АФП человека, лиофилизованного из 0.2% сахарозы

рН	$T_d, ^\circ\text{C}$		ΔH_d		$\Delta H_{\text{общ}}^{**}$	$\Delta H_d^{\text{кал}}$
	1*	2*	кДж/моль			
			1*	2*		
10.0	72.1	78.0	330 ± 20	570 ± 20	900 ± 30	860 ± 30
8.0	72.3	78.2	310 ± 20	580 ± 20	900 ± 30	850 ± 30
7.0	72.0	76.7	340 ± 20	540 ± 20	890 ± 30	840 ± 30
6.0	63.2	72.3	200 ± 20	680 ± 30	880 ± 30	840 ± 30
5.0	56.7	60.1	110 ± 10	190 ± 20	300 ± 10	290 ± 10

Примечание. Измерения проводили в PBS-буфере. Точность измерения температур составляет $\pm 0.3^\circ\text{C}$.

* Температуры плавления и величины энтальпий получены путем разложения экспериментальных кривых на две составляющие (см. рис. 2).

** Величины энтальпий рассчитаны из площади под экспериментальными кривыми.

интервале 7–10, как и для свежевыделенного АФП (рис. 1). Понижение же рН до 5.0 приводит к изменению профиля кривой теплопоглощения – процесс денатурации в этом случае идет в более широком интервале температур. Калориметрическое исследование модифицированного белка в кислой области рН (2.2–4.0) показало отсутствие кооперативно разрушающейся третичной структуры, как и случае свежевыделенного АФП.

Исследование устойчивости АФП

к разворачиванию, индуцированному мочевиной

Известно, что увеличение температуры обычно не приводит к полному разворачиванию белковой молекулы, которая, будучи температурно денатурированной, т.е. лишенной жесткой третичной структуры, остается достаточно компактной и сохраняет заметную вторичную структуру [26]. Состояние статистического клубка для глобулярных белков обычно реализуется в растворах, содержащих высокие концентрации сильных денатурантов, таких, как мочевина или гуанидингидрохлорид [26]. Мы исследовали конформационную стабильность АФП по отношению к индуцированному мочевиной разворачиванию. Оказалось (см. рис. 4), что свежевыделенный белок обладает чрезвычайно высокой устойчивостью к воздействию денатуранта – переход из нативного в полностью развернутое состояние происходит в узком диапазоне концентраций мочевины (7.0–8.0 М) с точкой полуперехода около 7.5 М. При этом конформационный переход описывается сигмоидальной кривой. Принципиально иная картина наблюдалась для белка, модифицированного сахарозой. Из рис. 4 видно, что в данном случае разворачивание белка является более сложным процессом и происходит в две стадии. При этом стабильность АФП существенно возрастает.

Как видим, данные по равновесному разворачиванию мочевиной свежевыделенного белка и АФП, лиофилизованного из сахарозы, хорошо коррелируют с результатами, полученными для этих образцов методом сканирующей калориметрии: взаимодействие с сахарозой не только стабилизирует АФП человека по отношению к денатурирующему воздействию, но и приводит к существенным структурным изменениям в молекуле этого белка. Появление второго пика теплопоглощения при плавлении (рис. 2) и второго перехода при разворачивании мочевиной (рис. 4) свидетельствует о том, что в случае АФП, лиофилизованного из сахарозы, мы имеем дело с двухдоменным образованием. Если допустить, что сахароза – один из естественных лигандов данного белка, т.е. взаимодействует с ним специфически, то ее структурирующий эффект, с нашей точки зрения, подтверждает сделанное нами ранее предположение о существенной роли лигандов в стабилизации жест-

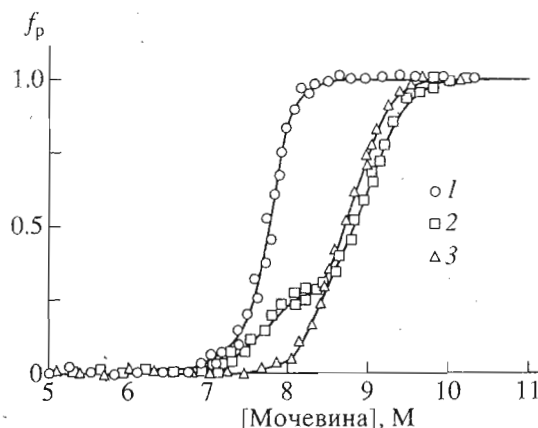


Рис. 4. Индуцированное мочевиной разворачивание АФП человека из сыворотки пуповины зародыша. 1 – свежевыделенный препарат белка; 2 – препарат белка, предварительно лиофилизованного из 0.2% сахарозы; 3 – лиофилизованный препарат после обработки инвертазой. f_p – доля развернутого состояния (см. “Экспериментальную часть”). Использовался PBS-буфер, рН 7.0.

кой пространственной структуры АФП. Далее мы покажем, что специфическое взаимодействие АФП – дисахарид действительно имеет место.

АФП связывает сахарозу специфически

Во всех проведенных до настоящего времени исследованиях указывалось, что добавление малых молекул-криопротекторов заметно увеличивает стабильность белков по отношению к тепловой денатурации. Следует подчеркнуть, что действие сахарозы на стабильность и структуру АФП существенно отличается от картины, обычно наблюдаемой для белков в присутствии криопротекторов. Действительно, как разворачивание мочевиной, так и тепловая денатурация свежевыделенного АФП могут быть описаны в рамках модели двух состояний. В то же время присутствие сахарозы не только стабилизирует белок, но и приводит к существенным изменениям в его структуре – белковая молекула из однодоменной превращается в двухдоменную. Значительное увеличение энтальпии плавления, вероятно, также свидетельствует об увеличении или изменении структурированной части молекулы. Это позволяет предположить, что в отличие от ранее исследованных белков, структура которых стабилизировалась криопротекторами за счет неспецифических взаимодействий (преимущественная сольватация), в случае АФП мы имеем дело с формированием специфического комплекса между белком и сахарозой.

Это предположение получило дополнительные подтверждения в ходе дальнейших исследований. Было известно, что криопротекторы оказывают

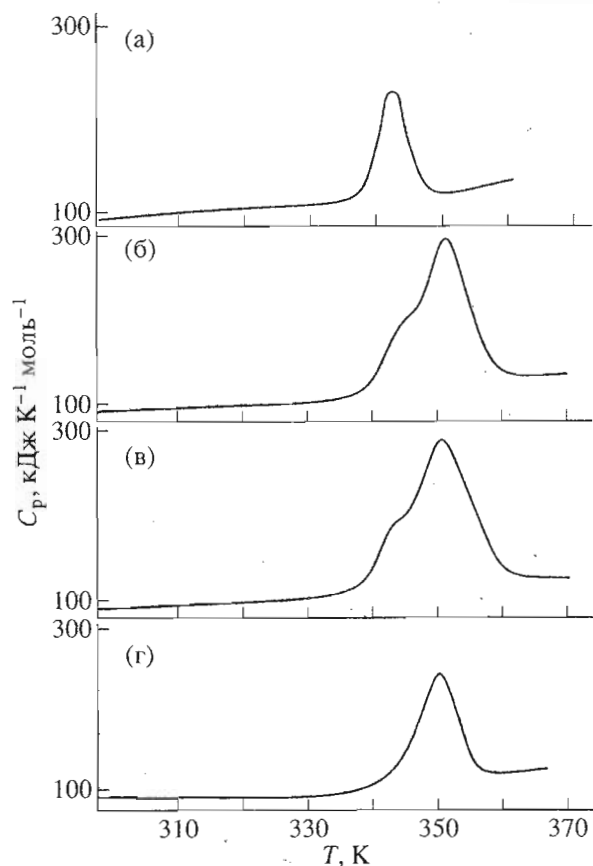


Рис. 5. Кривые зависимости парциальной молярной теплоемкости от температуры, полученные для АФП человека: (а) – свежевыделенный белок в PBS-буфере, не содержащем сахарозу, pH 8.0; (б) – свежевыделенный белок в буфере, содержащем 0.2% сахарозы; (в) – препарат, полученный растворением лиофильно высушенного из 0.2% сахарозы АФП с последующим длительным диализом против PBS-буфера, не содержащего сахарозу, pH 8.0; (г) – препарат из (в), обработанный инвертазой в PBS-буфере, pH 8.0.

стабилизирующий эффект только при достаточно высоких их концентрациях (50–70%). Оказалось, что в случае АФП можно добиться существенного стабилизирующего и структурирующего эффектов уже при миллимолярных концентрациях сахарозы (0.2%) (рис. 5в), т.е. при концентрациях в 200–500 раз меньше обычно используемых для криопротекции.

Следует также отметить, что длительный (в течение 8 сут) диализ раствора модифицированного сахарозой АФП против растворителя, не содержащего этот дисахарид, не привел к его полному удалению – калориметрические кривые, полученные до и после такой процедуры, были идентичны. В то же время обработка модифицированного АФП инвертазой – ферментом, специфически расщепляющим сахарозу на глюкозу и фруктозу, привела к существенным изменениям в термограмме. Из рис. 5г видно, что в этом случае

калориметрическая кривая описывает одностадийный процесс. Энтальпия данного перехода равна 400 кДж/моль, т.е. близка к соответствующей величине, полученной для свежевыделенного белка. В то же время температура плавления препаратов АФП, одного – модифицированного сахарозой, а другого – обработанного инвертазой, остается несколько более высокой по сравнению со свежевыделенным белком. Аналогичные данные были также получены и при изучении индуцированного мочевиной разворачивания АФП (рис. 4). Более высокая устойчивость обработанного инвертазой белка к денатурирующим воздействиям, по-видимому, обусловлена взаимодействием продуктов реакции (вероятнее всего, глюкозы) с молекулой АФП. Этот вывод подтверждается результатами качественной реакции на глюкозу, идентифицирующей присутствие этого сахара в препарате обработанного инвертазой АФП даже после пропускания его через колонку.

Суммируя, можно отметить, что существует эффект воздействия сахарозы на структуру АФП, который достигается при низких концентрациях этого дисахарида, не устраняется в ходе длительного диализа и может быть существенно ослаблен в ходе обработки модифицированного АФП специфическим ферментом – инвертазой. Таким образом, совокупность имеющихся данных позволяет предположить, что АФП человека способен связывать сахарозу с достаточно высокой константой связывания, что приводит к изменению его структуры.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали сефарозу 4В, Cibacron Blue 3GA, эпихлоргидрин, иминодиуксусную кислоту, боратгидрит для приготовления носителей металл-келатных колонок; триэтиламин, трифторуксусную кислоту и ацетонитрил (Sigma, США) для обращенно-фазовой хроматографии, реагенты для электрофореза (Bio-Rad, США), компоненты буферных растворов и мочевины (отечественного производства), инвертазу с удельной активностью 5000 ед./мг белка (выделенную А.Б. Циоменко в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов РАН). Все эксперименты проводились с использованием бидистиллированной воды с добавлением 0.15 М NaCl. Все компоненты буферов были использованы без дополнительной очистки. Необходимое значение pH устанавливалось добавлением 0.5–1.0 н. HCl или конц. KOH.

Концентрацию АФП в растворе определяли по поглощению при 280 нм с помощью спектрофотометра Cary-219 (Varian, Австралия). В измерениях использовался коэффициент поглощения $A_{1\text{ см}, 280}^{1\text{ мг/мл}} = 0.365$ [10]. При калориметрических измерениях концентрация белка варьировала от

0.7 до 2.0 мг/мл, тогда как флуоресцентные исследования проводились при концентрации АФП, равной 0.01 мг/мл. Концентрацию мочевины в растворе определяли рефрактометрически.

Очистка АФП человека из сыворотки пуповины зародыша проводилась с помощью аффинной хроматографии с использованием голубой сефарозы 6В (ЛКВ, Швеция) и металл-хелатных колонок, заряженных медью и никелем. На последнем этапе очистки белка была использована обращенно-фазовая хроматография на колонке С-3 (Bio-Rad, США).

Первый этап – очистка на голубой сефарозе. Сыворотку из пуповины зародыша центрифугировали на центрифуге G-21 (ротор GA-14) при 18000 об/мин. Собранный супернатант очищали с помощью GFC-фильтра и наносили на голубую сефарозу 6В, предварительно уравновешенную PBS-буфером, содержащим 20 мМ KH_2PO_4 , 150 мМ KCl , pH 7.5. Образец наносили на колонку в том же буфере в объеме, составляющем половину объема колонки. Наличие АФП в элюенте контролировали с помощью ракетного иммунофореза. Фракции, содержащие АФП, собирали и концентрировали с помощью Минитан-концентратора (Millipore, США).

Второй этап – очистка на сефарозе с иммобилизованным Ni^{2+} . Колонка с сефарозой 4В, предварительно обработанная эпихлоргидрином, заряжалась Ni^{2+} путем пропускания раствора, содержащего NiSO_4 в концентрации 1–5 мг/мл. Полученную металл-хелатную колонку уравновешивали PBS-буфером и на нее наносили раствор, обогащенный АФП. Содержание АФП во фракциях элюции определяли так же, как и на первом этапе.

Третий этап – очистка на сефарозе с иммобилизованным Cu^{2+} . Колонку с иммобилизованным Cu^{2+} , полученную способом, аналогичным вышеописанному, уравновешивали стартовым буфером 20 мМ KH_2PO_4 , pH 7.5, и на нее наносили раствор, полученный на втором этапе. АФП элюировали в линейном градиенте NH_4Cl (0–2 М). Фракции, содержащие АФП, определяли так же, как и на первых двух этапах.

Четвертый этап – обращенно-фазовая хроматография. АФП из выбранных фракций осаждали сульфатом аммония (440 г/л), осадок растворяли в минимальном количестве PBS и наносили на обращенно-фазовую колонку С-3, уравновешенную буфером, содержащим 0.1% TFA и 1 мМ триэтиламин. АФП элюировали линейным градиентом ацетонитрила (0–60%). Раствор белка был сконцентрирован и возвращен в PBS-буфер с помощью колонки PD-10 (Pharmacia, Швеция).

Степень чистоты полученного препарата АФП проверяли с помощью обращенно-фазовой хроматографии, электрофорезом в ПААГ в нативных и денатурирующих условиях, ELISA-тестом с анти-

телами против сывороточного альбумина человека, α -антитрипсина и трансферрина (“ДИАплюс”, Москва). Согласно этим тестам, чистота препарата составляет не менее 98%.

Модифицированный сахарозой АФП обрабатывали 1 ч при 37°C инвертазой (50 ед. акт.) в 3 мл 50 мМ натрий-ацетатного буфера, pH 5.8, содержащего 150 мМ NaCl . Концентрация АФП составляла 5 мг/мл. После обработки препарат белка пропускали через колонку PD-10 (Pharmacia, Швеция) для удаления продуктов, не связанных с молекулой АФП.

Калориметрические измерения осуществляли на прецизионном сканирующем микрокалориметре ДАСМ-5 (НПО “Биоприбор”, Пушино) с объемом ячейки 1 мл. Сканирование проводили со скоростью 1 К/мин при избыточном давлении 3.6 атм. Парциальную теплоемкость белка и форму кривой плавления определяли стандартным способом [27]. Парциальный объем белка полагали равным 0.72 $\text{cm}^3/\text{г}$.

Разворачивание АФП, индуцированное мочевиной, исследовали по характерному красному сдвигу собственной триптофановой флуоресценции белка на спектрофлуориметре SPF-1000cs (Aminco, США). При этом белок инкубировали в течение 1 сут при 23°C в буфере, содержащем 20 мМ KH_2PO_4 (pH 7.2) и мочевины в желаемой концентрации. Долю развернутого состояния (f_p) рассчитывали согласно соотношению [28]

$$f_p = \frac{y_n - y}{y_n - y_p},$$

где y – исследуемый параметр (положение максимума флуоресценции) при данных условиях, y_n и y_p – значения этого параметра для нативного и развернутого состояний, которые определяются методом наименьших квадратов из исследования поведения кривой до и после конформационного перехода.

Авторы выражают глубокую благодарность Г.И. Абелеву (Институт канцерогенеза, Онкологический научный центр РАМН), О.Б. Птицыну и Г.В. Семисотнову (Институт белка РАН) за обсуждение результатов и ценные указания.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 93-04-6635) и Научной программы “Человеческие границы” (грант № RG-331/93).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abelev G.I. // Adv. Cancer Res. 1971. V. 14. P. 295–358.
2. Parmelee D., Evenson M.A., Deutsch H.F. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. P. 2114–2119.

3. Uriel J., de Nechaud B., Dupiers M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972. V. 46. P. 1175–1180.
4. Nishi S., Matsue H., Yoshida H., Yamamoto R., Sakai M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. P. 3102–3105.
5. Lu C.Y., Changelian P.S., Unanue E.R. // *J. Immunol.* 1984. V. 132. P. 1722–1727.
6. Nunez E.A., Cristef N., Auclair M.C., Benessay C., Carli A. // *Tumor Biol.* 1987. V. 8. P. 273–280.
7. Hirai H. // *Biochemical Markers for Cancer* / Ed. T. Ming Chu. N. Y.: Marcel Dekker, 1985. P.25.
8. Torres J.M., Laborda J., Naval J., Darracq N., Calvo M., Mishal Z., Uriel J. // *Mol. Immunol.* 1989. V. 26. P. 851–857.
9. Morinaga T., Cakai M., Wegmann G., Tamaoki T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983. V. 80. P. 4604–4608.
10. Uversky V.N., Kirkitadze M.D., Narizhneva N.V., Potekhin S.A., Tomashevskii A.Yu. // *FEBS Lett.* 1995. V. 364. P. 165–167.
11. Ptitsyn O.B., Bychkova V.E., Uversky V.N. // *Phil. Trans. Roy. Soc. (London). Ser. B.* 1995. V. 348. P. 35–41.
12. Ptitsyn O.B. // *Adv. Prot. Chem.* 1995. V. 47. P. 83–229.
13. Shikama K., Yamasaki I. // *Nature.* 1961. V. 190. P. 83–84.
14. Back J.F., Oakenfull D., Smith M.B. // *Biochemistry.* 1976. V. 18. P. 5191–5196.
15. Gekko K., Timasheff S.N. // *J. Biochem.* 1981. V. 90. P. 39–50.
16. Gekko K., Timasheff S.N. // *Biochemistry.* 1981. V. 20. P. 4667–4676.
17. Lee J.C., Timasheff S.N. // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. P. 7913–7201.
18. Timasheff S.N. // *Biophysics of Water* / Eds F. Frank, S. Mathias. N. Y.: Wiley, 1982. P. 70–72.
19. Arakawa T., Timasheff S.N. // *Biochemistry.* 1982. V. 21. P. 6545–6552.
20. Arakawa T., Timasheff S.N. // *Biophys. J.* 1985. V. 47. P. 411–414.
21. Carpenter J.F., Crowe J.H. // *Cryobiology.* 1988. V. 25. P. 244–255.
22. Carpenter J.F., Crowe J.H. // *Biochemistry.* 1989. V. 28. P. 3916–3922.
23. Privalov P.L. // *Adv. Prot. Chem.* 1979. V. 33. P. 167–241.
24. Privalov P.L. // *Adv. Prot. Chem.* 1982. V. 35. P. 1–104.
25. Mihalyi E. *Application of Proteolytic Enzymes to Protein Structure Study.* Cleveland: Chem. Rubber Co., 1972. P. 364.
26. Tanford C. // *Adv. Prot. Chem.* 1968. V. 23. P. 121–282.
27. Privalov P.L., Potekhin S.A. // *Methods Enzymol.* 1986. V. 131. P. 4–51.
28. Aune K.C., Tanford C. // *Biochemistry.* 1969. V. 8. P. 4586–4590.

Stabilization of α -Fetoprotein Structure by Sucrose

M. D. Kirkitadze*, N. V. Narizhneva*, A. Yu. Tomashevskii**,
S. A. Potekhin*, and V. N. Uverskii*¹

* *Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia*

** *Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia*

Abstract—By means of scanning microcalorimetry and fluorescent spectroscopy, the addition of sucrose was shown to stabilize the structure of human α -fetoprotein (AFP). The stabilizing effect was not eliminated during eight-day dialysis of AFP against a buffer containing no sucrose, but it can be substantially weakened by treating AFP with a specific enzyme, invertase, which splits sucrose into fructose and glucose. This indicates that human AFP is capable of specific sucrose binding.

Key words: α -fetoprotein, conformational stability, sucrose, specific binding.

¹ To whom correspondence should be addressed.