

УДК 577.1: 547.97
©Коллектив авторов

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ВЗАИМОСВЯЗИ В МОЛЕКУЛЕ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА: ЕГО КОНФОРМАЦИОННЫЕ СОСТОЯНИЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Н.Т. Молдогазиева¹, А.А. Терентьев¹, К.В. Шайтан²

¹Российский государственный медицинский университет,
117997, Москва, ул. Островитянова, д.1,
тел./факс: (095)434-05-88, (095)434-41-01;
эл. почта: nmoldogazieva@yahoo.com

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119899, Москва, Воробьевы горы, д.1, тел.: 939-23-74

Альфа-фетопроtein (АФП) является основным сывороточным белком, характерным для эмбрионального периода развития всех представителей класса млекопитающих, и достаточно хорошо изученным опухолевым маркером. В настоящем обзоре обобщены данные по изучению структуры и функций этого белка. Особое внимание уделено АФП человека, который в последнее время является объектом интенсивных исследований. В течение последнего десятилетия рядом групп исследователей активно изучаются функционально важные участки АФП человека, выявленные, в основном, путем сравнительного анализа его первичной структуры со структурой физиологически активных белков. Часть из выявленных участков получена в виде отдельных пептидных фрагментов с помощью химического синтеза на твердой фазе и изучена в различных тестах биологической активности. Биомодулирующие свойства пептидов АФП могут быть использованы для создания на их основе лекарственных средств, обладающих, в том числе, противоопухолевым действием.

Интенсивные исследования конформационных изменений АФП, проведенные в течение последних лет показали, что, несмотря на стабильность в растворе, АФП обладает достаточной конформационной подвижностью и может образовывать форму расплавленной глобулы. Показано, что в нативной молекуле АФП часть его биологически активных участков скрыты внутри белковой глобулы и недоступны для взаимодействия с лигандами или с другими белками. Они выявляются и становятся доступными лишь при изменениях конформации молекулы. Изучение конформационных изменений АФП под воздействием различных факторов позволяет понять молекулярные механизмы его функционирования. Целью настоящего обзора является описание и анализ взаимосвязи между конформационными состояниями АФП и его биологической активностью. Представлена физико-химическая и функциональная характеристика нескольких пептидных фрагментов АФП с подтвержденной биологической активностью.

Ключевые слова: альфа-фетопроtein, конформационные изменения, пептидные фрагменты, биологическая активность.

ВВЕДЕНИЕ. Альфа-фетопроtein (АФП) был впервые обнаружен в 1956 году Бергстрандом и Кзаром в сыворотке крови плода человека как белковая фракция, обладающая электрофоретической подвижностью α -1-глобулинов [1]. В 1961 году

его иммунохимически идентифицировали Мюраль и Руле [2]. Интенсивные исследования этого белка начались после обнаружения его Ю.С. Татариновым в 1963 году в сыворотке крови взрослых людей, больных первичным раком печени [3]. Несколько ранее синтез АФП в процессе канцерогенеза был продемонстрирован Г.И. Абелевым в организме взрослых мышей с химически индуцированной гепатомой [4]. К настоящему времени выделены и очищены разными способами, охарактеризованы физико-химически, иммунохимически и функционально АФП человека и некоторых видов животных, в том числе мыши, крысы, кролика, морской свинки и др. Полностью расшифрована первичная структура АФП семи видов млекопитающих: человека, шимпанзе, гориллы, лошади, собаки, мыши и крысы (международная база данных "SwissProt").

Изучена структура гена, кодирующего синтез АФП, и механизмы его регуляции [5-9]. Получены рекомбинантные АФП человека и мыши, которые имеют ту же аминокислотную последовательность и молекулярную массу, что и интактный АФП [10-11].

Однако, биологическая роль АФП в эмбрио- и канцерогенезе остается до конца невыясненной. В многочисленных моделях *in vitro* и *in vivo* показано, что АФП человека и разных видов животных обладают несколькими видами функциональной активности. На этом основании сформировано представление о его полифункциональности. В течение последних десяти лет осуществляются попытки изучения биологической роли АФП путем идентификации его функционально важных участков. С помощью сравнения первичной структуры АФП и ряда физиологически активных белков показано существование в их полипептидных цепях сходных участков, и на этом основании сделано предположение о том, что они обладают сходными (одинаковыми) функциями. В настоящее время предсказано существование в полипептидной цепи АФП множества функционально важных участков, что подтверждает предположение о множественности функций этого белка.

Показано, что в нативной молекуле АФП часть его биологически активных участков скрыты внутри белковой глобулы и недоступны для взаимодействия с лигандами или с другими белками. Они выявляются и становятся доступными лишь при изменениях конформации молекулы, происходящих под воздействием различных факторов.

Конформационные варианты АФП изучаются с начала 1980-х годов, но особенно впечатляющие результаты были получены в течение последних десяти лет. Настоящий обзор посвящен анализу структурно-функциональных взаимосвязей в молекуле АФП, описанию и обобщению результатов экспериментов по изучению зависимости между его конформационными состояниями и биологической активностью. Представлена физико-химическая и функциональная характеристика нескольких пептидных фрагментов АФП, исследованных в последнее время, с учетом современных уточнений строения его молекулы.

1. Строение альфа-фетопротенна.

АФП – основной сывороточный белок, характерный для эмбрионального периода развития всех представителей класса млекопитающих, а, возможно, и всех позвоночных. Он синтезируется печенью плода и висцеральной эндодермой желточного мешка, а также, частично, эмбриональной почкой, поджелудочной железой и эндодермой желудочно-кишечного тракта [12-14]. АФП обнаруживается в сыворотке крови плода и матери, и его концентрация в сыворотке крови плода достигает максимального значения (до 10 мг/мл) на 12-16-ой неделе внутриутробного развития. К моменту рождения уровень АФП резко снижается и в сыворотке крови взрослых особей он обнаруживается лишь в следовых количествах – до 20 нг/мл [15-17]. Значительные изменения уровня АФП в материнской сыворотке наблюдаются при некоторых нарушениях развития плода. Так, существенные повышения уровня АФП происходят при дефектах развития

нервной трубки у плода, а снижение его количества характерно для синдрома Дауна [18,19].

Увеличение концентрации АФП в сыворотке крови у взрослых особей является признаком возникновения патологических состояний, в первую очередь, опухолевых заболеваний, таких как первичный рак печени и тератокарцинома [20-23]. Повышение уровня АФП наблюдается также при остром и хроническом гепатите, циррозе печени, панкреатобластоме и раке желудка [24-28].

По химической структуре АФП является гликопротеином, содержащим около 4% углеводов. Молекулярная масса этого белка колеблется в пределах 68-73 кДа, в зависимости от содержания углеводов и вида животного, из которого он выделен. Первичная структура АФП была установлена на основе анализа нуклеотидной последовательности его мРНК, продукт трансляции которой содержит у человека 609 аминокислотных остатков (а.о.) [29]. Первоначально было показано, что в ходе процессинга вновь синтезированной полипептидной цепи АФП человека происходит отщепление сигнального пептида, состоящего из 19 аминокислот, в результате чего образуется зрелая молекула АФП, состоящая из 590 а.о. Однако впоследствии было установлено, что N-концевой аминокислотой в молекуле АФП, выделенного из культуральной жидкости АФП-продуцирующих клеток гепатомы человека HepG2, является аргинин, который ранее не включали в состав зрелой молекулы [30]. Следовательно, в ходе процессинга отщепляется 18 аминокислот, а в состав зрелой молекулы АФП человека входит 591 а.о. Эти данные были впоследствии подтверждены также для эмбрионального АФП [31]. Полипептидная цепь АФП человека содержит 32 остатка цистеина, образующих 15 равномерно расположенных дисульфидных связей: четыре – в домене I, пять – в домене II и шесть – в домене III. При этом два первых остатка цистеина, расположенные у N-конца полипептидной цепи, сохраняют свободные SH-группы, т.е. не участвуют в образовании дисульфидных связей. В составе АФП человека обнаружен также один участок гликозилирования, в то время как для АФП мыши и крысы характерно по три таких участка [29, 32].

АФП принадлежит к семейству белков альбуминоидных генов, в состав которого также входят: сывороточный альбумин, витамин Д-связывающий белок и относительно недавно обнаруженный альфа-альбумин (афамин) [33-35]. Представители этого семейства обладают примерно одинаковой молекулярной массой (от 66 до 82 кДа) и демонстрируют относительно высокую степень сходства первичной структуры (например, 39% идентичности аминокислотных последовательностей АФП и сывороточного альбумина) с характерным расположением остатков цистеина [29, 36]. Они имеют также сходную α -спиральную вторичную структуру (до 65-67% α -спиральных участков характерно для АФП и около 50 % - для альбумина) [29, 37, 38]. Для этих белков характерна сходная пространственная организация, представленная тремя гомологичными доменами (I-III), каждый из которых состоит из двух глобулярных субдоменов (IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB), сшитых межспиральными дисульфидными связями [39]. Подобная пространственная структура обеспечивает возможность существования различных конформационных вариантов белка в зависимости от вида междоменных связей, что может иметь функциональное значение.

Трехдоменная пространственная организация молекулы АФП была продемонстрирована методом электронной микроскопии, показавшим существование U-образной структуры с тремя областями плотности масс: одна на вершине и две по краям молекулы [37]. С-концевая область домена II представляет собой гибкий шарнирный участок, который придает всем доменам подвижность и, тем самым, может способствовать взаимодействию АФП с лигандами или с другими белками. Этот участок характеризуется отсутствием дисульфидных связей и свойственен только молекуле АФП. Другие белки семейства альбуминоидных генов не содержат такого участка.

АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИН

В состав доменов I и II АФП человека входят по 186 а. о. (2 -187 и 194 -379 соответственно), а домен III состоит из 192 а. о. (386-577). Нумерация аминокислотных остатков АФП человека здесь и в последующем дается с учетом последних уточнений аминокислотного состава зрелой молекулы (SwissProt 02771).

Наибольшая степень идентичности (48%) первичных структур АФП и сывороточного альбумина человека наблюдается в домене II, наименьшая (16%) - в субдомене IA [40, 41]. Сравнительное изучение первичных структур АФП человека, крысы и мыши показало, что АФП разных видов животных характеризуются высокой степенью сходства. Так, аминокислотные последовательности АФП человека и мыши проявляют 66% идентичности. При этом, первичные структуры аналогичных доменов АФП разных видов животных (например, домена I АФП человека и мыши) проявляют достаточно высокую степень сходства: наибольшая степень идентичности характерна для домена III (72%), наименьшая - для домена I (59%), при 67% идентичности между доменами II [40].

На основе сравнения степени сходства аналогичных доменов АФП или альбумина разных видов животных и отдельных доменов этих белков внутри одного вида животных было сделано предположение о ходе эволюции генов АФП и альбумина. Исходя из допущения о том, что гены, кодирующие эти два белка, произошли от одного гена-предшественника, были предложены две возможные модели [41]. Согласно первой модели, ген-предшественник образовался путем удлинения некоего начального гена, кодирующего полипептидную цепь, соответствующую одному домену, т.е. ген-предшественник состоял из трех повторяющихся частей. Затем произошла дупликация гена-предшественника с образованием двух независимых генов, каждый из которых через серию дупликаций образовал гены АФП и альбумина. В этом случае, аналогичные домены разных белков должны быть более сходны, чем отдельные домены внутри одного белка. Согласно второй модели, вначале ген, кодирующий отдельный домен, подвергся дупликации с образованием двух независимых генов, которые затем подверглись удлинению и образовали гены-предшественники АФП и альбумина. В таком случае, отдельные домены внутри одного белка должны быть более сходны, чем аналогичные домены разных белков. Показано, что отдельные домены АФП и альбумина одного вида животных обладают меньшим сходством друг с другом (до 28% идентичности), чем аналогичные домены разных видов животных [42]. Отсюда был сделан вывод о том, что эволюция генов этих белков шла согласно первой модели.

Попытка ответить на вопрос, являются ли топологически различные домены АФП структурно и функционально независимыми, была предпринята с использованием метода ограниченного протеолиза [31]. В результате кратковременного (в течение 30 мин.) протеолитического расщепления АФП человека под воздействием пепсина было получено три пептидных фрагмента с молекулярными массами 38 (P38), 32 (P32) и 27 (P27) кДа. Более длительный протеолиз (в течение 3-х часов) приводил к дальнейшей деградации фрагментов P38 и P32 с образованием новых пептидных фрагментов с молекулярными массами 26 (P26), 23 (P23) и 12 (P12) кДа. Фрагменты P26 и P23 оказались стабильными и не подвергались дальнейшей деградации, в то время как P12 полностью распался при продолжении протеолиза. Локализация полученных пептидов в первичной структуре АФП производилась с помощью N-концевого анализа. Выяснилось, что N-концевая аминокислотная последовательность интактного эмбрионального АФП человека - NH₂-Арг-Тре-Лей-Гис-Арг-Асп-Глу-Тир-Гли-Иле- (RTLHRNEYGI), - полностью соответствует N-концевой последовательности АФП, продуцируемого клетками гепатомы человека HepG2 [25]. Определение молекулярных масс и N-концевых а. о. полученных фрагментов показало, что фрагменты P38 и P32 образовались путем расщепления пептидной связи между Лей-312 и Асп-313. В дальнейшем, от фрагмента P38 отщеплялся C-концевой участок размером около 15 кДа с образованием P23.

Пептидный фрагмент P32 подвергался деградации с N-конца с образованием сначала P27, а затем P26.

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии позволяет изучать изменения пространственной структуры белка при вариации температуры [43, 44]. Для интактного АФП человека и его стабильных пептидных фрагментов P23 и P26 были получены калориметрические кривые с одним пиком теплового поглощения с максимумом, находящимся в интервале от 70 до 80°C. Это, по-видимому, означает, что в данном интервале температур происходит их эндотермическая денатурация. Калориметрическая кривая, полученная для молекулы интактного АФП, имела выраженное плечо при 65°C. Деконволюционный анализ кривой выявил существование двух независимых переходов, показывающих наличие двух термодинамически независимых кооперативных единиц, которые могут соответствовать отдельным структурным доменам. Теоретически рассчитанные энтальпии перехода для каждого из этих единиц (290 и 414 кДж/моль) были близки к значениям, полученным экспериментально для изолированных фрагментов P23 и P26 (231 и 430 кДж/моль, соответственно). Авторами данных исследований было сделано предположение о том, что низкотемпературный переход показывает плавление N-концевого домена I, который соответствует фрагменту P23, а высокотемпературный переход показывает плавление C-концевого домена III, который соответствует фрагменту P26. Энтальпия перехода для целой молекулы АФП (661 кДж/моль) в пределах экспериментальной точности (5-7%) была равна сумме энтальпий фрагментов P23 и P26 (677 кДж/моль), что свидетельствует о том, что эти пептиды и соответствующие им домены I и III плотно упакованы и сохраняют нативную третичную структуру.

Спектры кругового дихроизма в дальней УФ-области (180-250 нм) показали, что фрагменты P23 и P26, т.е. соответствующие им домены I и III, сохраняют близкую к нативной вторичную структуру и содержат 68% и 71% α -спирали соответственно. Содержание α -спирали в центральной части АФП (в домене II), рассчитанное на основании разницы значений молярной эллиптичности интактного АФП и фрагментов P23 и P26, составляло 50-55% [31].

Эти эксперименты подтверждают существование трехдоменной пространственной организации молекулы АФП. Они показывают, что домены имеют сходную, близкую к нативной, вторичную структуру, однако отличаются по параметрам третичной структуры. Домены I и III имеют жесткую, компактно упакованную третичную структуру и связаны между собой протеолитически лабильным, гибким доменом II. Конформация домена II соответствует *форме расплавленной глобулы* (MGF - molten globule form). Эти результаты подтвердили полученные ранее методом электронной микроскопии данные о существовании гибкого участка в области домена II [37]. Возможно, что такая гибкая конформация этой части молекулы необходима для регуляции структуры и подвижности всей молекулы альфа-фетопротеина. Было показано, что участок связывания гидрофобных лигандов в молекуле АФП человека расположен именно в домене II, поблизости от Лиз-224, так же как участок гликозилирования – Асн-233 [45].

2. Функциональная активность.

Биологическая роль АФП интенсивно изучалась в течение последних трех десятилетий, однако, остается до сих пор до конца невыясненной. Установлено, что АФП, выделенный из разных источников способен связывать и транспортировать различные гидрофобные лиганды, включая эстрогены, полиненасыщенные жирные кислоты (в частности арахидоновую, C20:4, и докозагексаеновую, C22:6), билирубин, ретиноиды, флавоноиды, фитоэстрогены, экотоксиканты, разные красители, ионы металлов, а также лекарства [46-58].

Особый интерес представляло изучение эстрогенсвязывающей способности АФП, так как, связывая эстрогены, АФП в условиях *in vivo* может регулировать уровень свободных, т.е. активных гормонов. Однако в течение длительного

АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИН

времени высокоэффективное связывание, как свободных, так и иммобилизованных природных эстрогенов удавалось показать лишь для АФП мыши и крысы [51, 59-61]. Методом аффинной хроматографии нами было показано, что АФП человека, выделенный из биологического материала мягкой обработкой бутанолом, способен *in vitro* связывать с высокой эффективностью и аффинностью иммобилизованный эстрон и синтетический аналог эстрогенов - диэтилстильбэстрол [62-64]. Предварительная инкубация бутанольного экстракта биологического материала, содержащего АФП, со свободными природными эстрогенами не уменьшала связывания АФП с иммобилизованными гормонами. Однако преинкубация со свободным диэтилстильбэстролом сопровождалась уменьшением почти в два раза связывания АФП с иммобилизованным гормоном, что говорило в пользу того, что АФП способен связываться как со свободным, так и с иммобилизованным гормоном. При этом связывание с иммобилизованным гормоном было достаточно сильным, так как связавшийся АФП элюировался с колонки лишь 10% раствором бутанола в 0,01 М веронал-медиаловом буфере, pH 8,6 и не элюировался 1 М и 2 М растворами NaCl и различными органическими растворителями. Нами было выявлено, что большое значение имеет способ иммобилизации, т.е. пространственная ориентация молекулы гормона, и было сделано предположение о том, что, возможно, в условиях *in vivo* взаимодействие АФП с эстрогенами происходит с участием некоего белка -- посредника.

Интенсивно изучается иммунорегуляторная роль АФП. Показано, что АФП способен эффективно взаимодействовать с макрофагами и Т-лимфоцитами и оказывает иммуносупрессивное действие на пролиферирующие лимфоциты [65-72]. Предполагается также, что АФП принимает участие в регуляции процессов размножения и дифференцировки клеток. Показано, что он, в отличие от других представителей семейства белков, кодируемых альбуминоидными генами, содержит в составе домена II короткие аминокислотные последовательности, сходные с последовательностями, представляющими собой сигнальные адгезивные участки в молекулах белков экстрацеллюлярного матрикса (ламинины, коллагена и фибронектина). Возможно, что АФП обладает аналогичной биологической активностью, а именно участвует в процессах клеточной адгезии, пролиферации, дифференцировки и миграции клеток, ингибировании роста и метастазирования опухолей [73].

На различных линиях опухолевых клеток человека показано, что АФП вызывает ингибирование роста опухолей и программированную гибель клеток в концентрациях, превышающих 0,1-0,2 г/л [74, 75]. О том, что цитотоксический эффект АФП обусловлен индукцией апоптоза свидетельствуют изменение морфологии клеток, фрагментация ДНК и активация каспазы-3, приводящая к расщеплению поли-(ADP-рибозо)-полимеразы. Активация каспазы-3 наблюдалась спустя 4 часа после добавления АФП в культуру клеток Раджи в концентрации 15 мкМ. Активации каспазы-1, каспазы-8 или каспазы-9 не наблюдалось в течение 0,5-17 часов инкубации. При этом имело место увеличение концентрации белка Bcl-2, что свидетельствует о том, что индукция апоптоза АФП не связана с супрессией гена Bcl-2. Инкубация АФП-чувствительных клеток (Нер G2 или клеток Раджи) с нейтрализующими антителами против Fas-антигена или против рецепторов фактора некроза опухолей (TNFR)1 и (TNFR)2 не предотвращала индукцию апоптоза. Предполагается, что АФП вызывает запуск апоптоза путем активации каспазы-3 независимо от Fas/FasL и TNF/TNFR-опосредованной передачи сигнала. Обнаружено также, что опухолевые клетки, резистентные к TNF-индуцированному (клетки Раджи) или Fas-индуцированному (MCF-7) апоптозу, проявляют чувствительность к АФП-опосредованной цитотоксичности. И, наоборот, опухолевые клетки, чувствительные к Fas-индуцированному апоптозу (клетки Джиркат), полностью резистентны к АФП-опосредованной цитотоксичности [76].

В последующих экспериментах было показано, что добавление АФП в культуру опухолевых клеток приводит к высвобождению цитохрома с из митохондрий в цитоплазму [77]. В бесклеточной системе АФП вызывает активацию каспазы-3 и каспазы-9 путем взаимного усиления дозо-зависимого цитохром с-опосредуемого сигнала. В клеточных экстрактах, лишенных цитохрома с или каспазы-9, АФП теряет способность регулировать активность каспазы-3. С использованием хроматографии высокого разрешения было показано, что альфа-фетопроtein способствует цитохром с/дезоксиг-АТР-опосредованному образованию апоптосомных комплексов с участием каспаз и Араф-1 и стимулирует высвобождение активных каспаз-3 и 9 из апоптосом. Показано также, что очищенный АФП человека почти полностью прерывает ассоциацию активных каспаз-3 и 9 с внутриклеточным белком - ингибитором апоптоза (сIAP-2 – cellular inhibitor of apoptosis protein). Возможно, регуляция апоптоза альфа-фетопроteinом осуществляется путем выброса сIAP-2 из апоптосом и, как следствие, активации каспазы-3 и её высвобождения из комплекса.

Показано также, что АФП подавляет эстрогензависимую пролиферацию клеток и рост эстрогензависимых опухолей. Тест ингибирования эстрогензависимой пролиферации клеток основан на обнаружении, что внутрибрюшинная инъекция 0,5 мкг 17-β эстрадиола в 0,1 мл буфера 14-18-дневным неполовозрелым самкам мышей приводит к увеличению на 70% веса матки с одновременным повышением митотического индекса в течение 22 часов. Если же за 1 час до инъекции 17-β эстрадиола мышам ввести 100 мкл АФП (200-300 мМ), то наблюдается снижение этого, стимулирующего пролиферацию клеток, эффекта гормона [78]. Показано также, что АФП также ингибирует *in vitro* эстрогензависимый рост опухоли молочной железы MCF-7 и простаты у человека [79]. Противоопухолевая активность АФП подтверждается эпидемиологическими исследованиями, показавшими, что беременность существенно снижает риск возникновения рака молочной железы и этот эффект сохраняется у женщин в течение нескольких лет после родов [80, 81].

Детальный механизм, с помощью которого АФП ингибирует эстрогензависимую пролиферацию клеток и рост опухолей, не известен. Предполагается, что этот эффект обусловлен наличием на поверхности опухолевых клеток рецепторов для АФП, связываясь с которыми он проникает внутрь клеток. Показано существование рецепторов для АФП на поверхности клеток гепатомы и рака молочной железы MCF-7, а также эндотелиальных клеток легких, сердца и клеток репродуктивной и иммунной систем [82-86].

Свойство АФП проникать внутрь опухолевых клеток с помощью рецептор-опосредованного механизма, наряду с его способностью связывать различные цитотоксические лекарства, создает основу для его применения в противоопухолевой терапии [87-93].

3. Конформационные изменения молекулы АФП.

Изучение изменений конформации белков под воздействием различных факторов способствует пониманию молекулярных механизмов их функционирования. Конформационные изменения могут обуславливать доступность различных функционально важных участков в молекуле белка и, следовательно, влиять на его биологическую активность. Например, конформационное состояние белка может влиять на его способность связываться со специфическим рецептором на поверхности клетки и, тем самым, определять его способность проникать внутрь клетки или участвовать в передаче гормонального сигнала через мембрану клеток [94]. Кроме того, предполагается, что изменения конформации влияют на возможность определения белка в биологических жидкостях с помощью различных иммунодиагностикумов.

Конформационные изменения АФП стали интенсивно изучаться с начала 1980-х годов. В частности, было показано, что высокие концентрации полиненасыщенных жирных кислот вызывают конформационные изменения и

АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИН

соответствующие изменения функциональных свойств АФП человека и крысы [95-97]. Так, с помощью равновесного анализа было обнаружено, что под воздействием высоких концентраций докозагексаеновой кислоты в молекуле АФП крысы происходит изменение количества эстрадиолсвязывающих мест и соответствующих значений равновесной константы диссоциации. Кроме того, происходит сдвиг минимума поглощения УФ-спектров АФП человека и крысы, инкубированных с ненасыщенными жирными кислотами, в красную область; при этом спектры поглощения становятся более широкими и менее выраженными. После инкубации с высокими концентрациями жирных кислот АФП человека и крысы теряют способность связываться со специфическими поликлональными антителами к ним. Антитела к нативному АФП выявляют меньше эпитопов на конформационно измененной молекуле, чем на нативной. Антитела к конформационно измененному АФП не связываются с нативной молекулой [95].

Обнаружено также, что под воздействием полиненасыщенных жирных кислот количество АФП человека, выявляемое в сыворотке плода, гепатомной жидкости и пуповинной сыворотке с помощью радиоиммунологического или иммуоферментного методов, уменьшается на 80, 50 и 5% соответственно. Эти изменения коррелируют с соответствующими изменениями концентраций жирных кислот в этих биологических жидкостях и, видимо, обусловлены изменениями конформации АФП под их воздействием [95].

Показано, что добавление высоких концентраций эстрогенов в раствор АФП или его домена III также приводит к изменениям конформации молекулы [78, 79, 98]. Конформационные изменения ответственны за увеличение способности АФП ингибировать рост эстрогензависимой опухоли молочной железы (MCF-7) и простаты, а также пролиферацию клеток матки неполовозрелых самок мышей [61, 78, 79, 99]. Рекombинантный АФП человека также обладает способностью ингибировать рост эстрогензависимой опухоли молочной железы [10, 11]. При этом он также может претерпевать конформационные изменения, сопровождающиеся увеличением его способности ингибировать рост эстрогензависимых опухолей. В культуре клеток эстроген-независимой опухоли MDA-MB-231 рекombинантный АФП не проявляет противоопухолевой активности.

Изменение pH среды в кислую или щелочную сторону также сопровождается изменениями конформации молекулы АФП. Это приводит к открытию гидрофобных участков, которые при нейтральных значениях pH скрыты внутри белковой глобулы [100]. Показано, что в кислой среде происходит уменьшение доли α -спиральных участков во вторичной структуре АФП до 47%, и эти изменения носят необратимый характер [101].

Для понимания механизмов, лежащих в основе конформационных изменений молекулы АФП, изучалось изменение его структурных свойств и конформационная стабильность в присутствии и отсутствии природных лигандов [102]. АФП выделяли из сыворотки пуповинной крови человека с использованием аффинной хроматографии на колонке с иммобилизованным Cibacron Blue с последующей хроматографией на колонке с NiCl_2 - и CuCl_2 -сефарозой 4В и хроматографией с обращенной фазой C-3. Методом газовой хроматографии было показано, что очищенный препарат АФП сохраняет, по крайней мере, часть из своих естественных лигандов. Хроматографический профиль показал наличие двух небелковых пиков, соответствующих двум полиненасыщенным жирным кислотам - арахидоновой и докозагексаеновой.

Изменения пространственной структуры АФП, вызванные удалением лигандов, изучали методами кругового дихроизма, флуоресцентной спектроскопии и сканирующей микрокалориметрии. Известно, что спектры кругового дихроизма (КД-спектры) в ближней УФ-области (250-350 нм) отражают степень асимметрии в окружении ароматических аминокислот и, следовательно, сохранности третичной

структуры белка. Уменьшение интенсивности спектров является показателем нарушения уникальной третичной структуры белка [102]. КД-спектры нативной молекулы АФП, полученные в присутствии лигандов при 23°C в ближней УФ-области, характеризовались относительно небольшой интенсивностью, но демонстрировали асимметрию в окружении ароматических аминокислот, что свидетельствовало о наличии жесткой пространственной структуры. В то же время, при 87°C наблюдалось уменьшение интенсивности КД-спектров и были получены спектры, присущие для конформации случайного клубка, т.е. имело место нарушение уникальной третичной структуры. Аналогичные данные были получены при удалении лигандов обработкой активированным углем или воздействием гексана, а также 9,5 М раствора мочевины. Конформационные нарушения носили необратимый характер, что подтверждалось данными, показывающими, что восстановление третичной структуры АФП не происходит ни при снижении температуры, ни при добавлении вновь лигандов.

Эти результаты были подтверждены методом сканирующей микрокалориметрии. Для АФП, связанного с лигандами, была получена типичная калориметрическая кривая с одним пиком теплового поглощения с максимумом при 70°C. Наличие одного или нескольких пиков на калориметрической кривой обычно используется как доказательство кооперативного нарушения жесткой третичной структуры белка [43, 44, 103]. Следовательно, повышение температуры вызывает кооперативное нарушение пространственной структуры АФП, которая, по-видимому, стабилизируется в присутствии его природных лигандов. Калориметрическая кривая для свободной от лигандов формы АФП характеризовалась отсутствием пика теплового поглощения, что свидетельствует об отсутствии кооперативного нарушения третичной структуры, т.е. денатурации белка.

Для изучения изменений во вторичной структуре белка используются КД – спектры в дальней УФ-области (180-250 нм). В этой области при 23°C обе формы АФП, связанная и несвязанная с лигандами, имеют идентичные спектры, характерные для нативного белка. Выраженные КД-спектры сохранялись даже при температуре 87°C. Эти данные свидетельствуют о том, что при высвобождении лигандов АФП сохраняет близкую к нативной вторичную структуру, которая не изменяется при повышении температуры [102].

Метод флуоресцентной спектроскопии позволяет изучать процесс разворачивания белковой молекулы. Известно, что молекула триптофана в водном растворе имеет максимум флуоресценции при 350 нм. Внедрение остатков триптофана внутрь гидрофобного ядра глобулярного белка сопровождается характерным сдвигом спектра флуоресценции в голубую область, т.е. положение спектра флуоресценции триптофана отражает степень полярности его окружения и, как следствие, степень компактности белковой глобулы. В присутствии 9,5 М раствора мочевины наблюдается хорошо выраженный сдвиг максимума спектра флуоресценции триптофана в молекуле АФП от 330 до 350 нм, а также снижение интенсивности флуоресценции. Эти данные свидетельствуют о том, что под воздействием 9,5 М раствора мочевины происходит полное разворачивание молекулы белка. После удаления денатурирующего агента молекула АФП снова сворачивается и является практически такой же компактной, как и нативная, однако, обладает меньшей конформационной стабильностью [102].

Для определения компактности молекулы белка использовали метод вискозиметрии [104]. Определение коэффициентов внутренней вязкости и радиусов Стокса показало, что свободная от лигандов форма АФП является практически такой же компактной, как и нативная, связанная с лигандами форма. При воздействии 9,5 М раствора мочевины происходит значительное снижение компактности молекулы [105].

Таким образом, показано, что любое нарушение третичной структуры АФП является необратимым процессом. Изменение pH среды, воздействие органического растворителя, повышение температуры или удаление лигандов

приводит к потере уникальной третичной структуры белка. Однако при этом молекула АФП остается достаточно компактной и сохраняет близкую к нативной вторичную структуру. Такое конформационное состояние АФП соответствует форме расплавленной глобулы (или MGF), которая является равновесным состоянием, образуемым в мягких денатурирующих условиях и характерных для многих белков [106]. В форме MGF белки находятся в состоянии, промежуточном между уникальным, нативным и денатурированным, полностью развернутым. В этой форме белковая молекула компактна и сохраняет все важные свойства нативной вторичной структуры, однако, теряет жесткую третичную структуру [107]. Форма расплавленной глобулы может образовываться также в физиологических условиях. Так, показано, что значения эффективной диэлектрической постоянной и pH среды вблизи клеточной мембраны низки и соответствуют значениям, при которых может образоваться MGF форма [108]. Возможно, что в нативной, свернутой форме белки секретируются в кровь и обнаруживаются в биологических жидкостях, а внутри клеток они находятся именно в форме расплавленной глобулы. Такое состояние белка характеризуется большой внутренней подвижностью, включая вращательную изомеризацию боковых аминокислотных радикалов. Вероятно, в этой форме белки проникают через мембраны, и именно такое подвижное состояние помогает белкам подстраиваться к различным условиям, существующим в цитоплазме клеток и во внутриклеточных органеллах. Кроме того, возможно, что MGF форма способствует взаимодействию АФП с другими белками, в том числе с шаперонами.

Как уже отмечалось, нам удалось показать, что АФП человека способен *in vitro* связывать с высокой эффективностью и аффинностью иммобилизованные природные эстрогены и их синтетический аналог - диэтилстильбэстрол [62-65]. В наших экспериментах АФП выделялся из биологического материала мягкой обработкой бутанолом, что приводило к делипидации белка. Ранее нами было сделано предположение, что обработка бутанолом приводит к диссоциации комплексов АФП с эстрогенами или жирными кислотами и это способствует освобождению эстрогенсвязывающих участков в молекуле АФП. В свете новых данных можно предположить, что удаление жирных кислот приводит к конформационным изменениям молекулы АФП с образованием формы расплавленной глобулы. При этом, возможно, происходит частичное разворачивание белковой глобулы, и гидрофобные эстрогенсвязывающие участки становятся доступными для взаимодействия с гормонами. Конформационные изменения в молекуле АФП могут происходить также при его взаимодействии с иммобилизованным гормоном или могут быть обусловлены взаимодействием АФП с функциональными группами сорбента.

4. Структурно-функциональное картирование.

Структурно-функциональное картирование белков осуществляется с целью выявления функционально важных участков и определения соответствующих аминокислотных последовательностей, их состава, расположения в полипептидной цепи и функциональной активности. В основном, картирование АФП осуществляется:

- а) методом ограниченного протеолиза с последующим изучением биологических свойств полученных пептидных фрагментов; или
- б) сравнительным анализом первичных структур АФП и физиологически активных белков для выявления структурно сходных участков или мотивов с последующим их синтезом химическим путем и биологическим тестированием.

Широкий набор пептидных фрагментов АФП с указанием их аминокислотной последовательности, расположения в полипептидной цепи и выявленной или предполагаемой биологической активности представлен в обзоре [73]. В настоящем обзоре представлены и подробно охарактеризованы основные биологически активные участки АФП (табл.1), изученные в течение нескольких последних лет и не описанные в более ранних обзорах, с учетом современных уточнений строения молекулы АФП.

Таблица 1. Пептидные фрагменты альфа-фетопротейна человека с изученной или предполагаемой функциональной активностью (по [73] с уточнениями и дополнениями)

Название пептида	Аминокислотная последовательность/остатки	Расположение в домене	Функциональная активность	Ссылки
ЭФР-подобный сегмент	LDSYQCT, 14-20	I	Иммуномодулирующая. экспрессия рецепторов активационного апоптоза. повышение чувствительности к цитозару. опосредование поглощения глюкозы клетками	[109-123]
Пептид, ингибирующий рост. (GIP)	LSEDKLLACGEG AADIHGLCIRH EMTPVNPVG, 446-479	III	Ингибирование эстроген-зависимой пролиферации клеток и роста опухолей	[124-128]
Сегмент, подобный участку FSSTEKN, 8-14, трансформирующего фактора роста (TGFβ1)	FSSGEKN, 323-329	III	Не изучена	[123]
Сегмент главного комплекса тистосовместимости	GVALQTMKQ, 524-532	III	Генерация специфического иммунного ответа Т-лимфоцитов	[156, 157]
Мотивы белков внеклеточного матрикса	LRE, 195-197; LDV, 242-244; RGD, 253-255; DGEK, 262-265; ILRVAK, 352-356	I II II II	Участие в процессах клеточной адгезии, миграции, пролиферации, дифференцировки клеток	[72]
Мотивы гетеродимеризации	497-534, 535-589	III	Взаимодействие со стероидными/тиреоидными рецепторами, факторами транскрипции и факторами роста	[158, 159]
Основной участок связывания жирных кислот	KNFGTRTFQAITV TKLSQK, 210-228	II	Связывание полиненасыщенных жирных кислот	[32, 45]
Эстрогенсвязывающий участок (выявлен у мыши и крысы)	APELIDLTGKMVS IASTCCQLSEE, 423-445	III	Связывание эстрогена и эстрадиола	[124, 160]
Участок для связывания ионов цинка (II)	VAHVHEHC, 244-251	II	Возможное связывание тяжелых металлов	[142]
Актин-связывающий участок	DKGEEELQ, 377-384	II	Возможное связывание актина	[73]
Мотив, богатый остатками пролина	KKPTFASIP FQVALPEPV, 111-129	I	Возможное участие в межбелковых взаимодействиях	[73]
Кинетин-подобные сегменты	IARRHPFLY, 148-156; YSRRHPQLA, 340-348; LVKQKPQIT, 538-546	I II III	Регуляция нейротензин-опосредованной деятельности сердечно-сосудистой системы	[73]
Сегмент, подобный активатору плазминогена	553-591	III	Регуляция роста трансформированных клеток	[73]
Сегмент пептида казеина молока	GLF, 399-401	II	Взаимодействие с макрофагами	[73]
Сегменты высокой гомологии с альбумином	246-261; 489-505	II III	Показывают перекрестную реакцию с рецептором для АФП человека	[36, 39]
Сегмент с отсутствием гомологии с альбумином	39-120	I	Узнаются моноклональными антителами к АФП человека	[39, 72]
P38 (P23)	1-312	I и часть II	Индукция апоптоза	[31]
P32 (P26)	313-591	часть II и III	Индукция апоптоза	[31]

АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИН

4.1. *Гептапептид LDSYQCT и его гомологи.* В 1997 году методом сравнения первичных структур АФП и эпидермального фактора роста (ЭФР) в полипептидных цепях этих белков были выявлены участки, обладающие высокой степенью сходства. Было обнаружено, что аминокислотная последовательность LDSYQC в составе АФП человека (а.о. 13-18) имеет высокое сходство с аминокислотной последовательностью LDSYTC в составе ЭФР человека (а.о. 26-31) [109, 110]. Известно, что последовательность LDSYTC ЭФР человека является частью его рецепторсвязывающего участка, оказывающего стимулирующее действие на тирозинкиназную активность внутренних субъединиц рецептора. На этом основании был проведен поиск сходных с LDSYQC участков в первичных структурах АФП и инсулина, обладающего аналогично ЭФР способностью усиливать тирозинкиназную активность рецептора. Поиск подобных участков был проведен также в структурах некоторых онкофетальных белков [111-113].

Было обнаружено, что аминокислотная последовательность LDSYQCT в составе АФП человека (а.о. 13-19) имеет сходство с последовательностью ENYCN (а.о. 17-21) в составе α -цепи инсулина [110]. В последующем после уточнения первичной структуры АФП (SwissProt 02771) последовательность LDSYQCT была идентифицирована как 14-20 (соответственно, последовательность LDSYQC - как 14-19) [72]. Были получены соответствующие синтетические пептиды и изучено их влияние на поглощение глюкозы эритроцитами больных сахарным диабетом в концентрациях 10^{-5} , 10^{-7} и 10^{-9} М *in vitro*. Выявлен дозозависимый эффект захвата глюкозы клетками. Пептапептид инсулина в концентрации 10^{-5} М достоверно повышал поглощение глюкозы эритроцитами здоровых доноров и больных сахарным диабетом I и II групп [114]. В концентрациях 10^{-7} и 10^{-9} М эффект был менее выражен. Гептапептид АФП в концентрации 10^{-5} М достоверно повышал утилизацию глюкозы эритроцитами больных инсулинзависимым и инсулиннезависимым сахарным диабетом.

Были также изучены иммунобиологические свойства пептида LDSYQCT. В реакции бласттрансформации в концентрациях 10^{-7} , 10^{-8} и 10^{-9} М данный гептапептид умеренно стимулировал пролиферацию неактивированных лимфоцитов и проявлял выраженное ингибирующее действие на пролиферацию лимфоцитов, активированных фитогемагглютинином [115]. В культуре клеток К-562 пептид повышал в 1,5-2 раза цитотоксическую активность естественных клеток - киллеров. Он также обладает дозозависимым ингибирующим эффектом на пролиферативную активность лимфоцитов больных острым лимфолейкозом и на спонтанную пролиферацию лимфоцитов больных хроническим лимфолейкозом с низкой чувствительностью к цитозару, т.е. пептид усиливает антипролиферативную активность этого препарата, а также возвращает лимфоцитам чувствительность к цитозару [115, 116]. В культуре клеток больных инфекционно-аллергическим миокардитом с естественно активированными лимфоцитами гептапептид достоверно понижает экспрессию позднего активационного антигена HLA-DR и индуцирует экспрессию рецептора Fas-опосредованного апоптоза (CD95). Увеличение количества CD95+ лимфоцитов свидетельствует в пользу предположения о том, что гептапептид LDSYQCT индуцирует апоптоз, так как этот процесс зависит от Fas/FasL клеточного взаимодействия [116-120, 122]. Показано также, что пептид способствует сохранению подвижности активных сперматозоидов [121]. Таким образом, аминокислотная последовательность LDSYQCT обладает значительной частью иммуномодуляторных и некоторой частью других биологических свойств интактной молекулы АФП и, следовательно, может рассматриваться как один из его биологически активных участков.

Сравнительное изучение первичных структур АФП и трансформирующего фактора роста (TGF β 1), который также как и АФП обладает иммуносупрессивной активностью и способностью усиливать пролиферацию некоторых клеток,

выявило определенное сходство их аминокислотного состава. Оба белка характеризуются относительно большим содержанием цистеина: 8% в составе TGFβ1 и 5,4% в составе АФП; и, при этом наблюдается наличие сдвоенных цистеинов. Последовательность LDTNYC (а.о. 2-7) в составе трансформирующего фактора роста отличается по составу от последовательности LDSYQC (а.о. 14-19) в составе АФП человека лишь двумя аминокислотными остатками [123]. Отличием лишь по одному аминокислотному остатку характеризуются участки этих двух белков: последовательности FSSGEKN (а.о. 323-329) в составе АФП человека и FSSTEKN (а.о. 8-14) в составе трансформирующего фактора роста. Биологические свойства этих пептидных фрагментов еще не изучены. Их изучение позволит ответить на вопрос, является ли пептид FSSGKEN ещё одним биологически активным участком АФП.

4.2. Пептид, ингибирующий рост (P447), его аналоги и активные фрагменты. Как было сказано ранее, АФП подавляет эстрогензависимую пролиферацию клеток и рост эстрогензависимых опухолей (см. раздел "Функциональная активность"). В середине 1990-х годов был идентифицирован структурный мотив молекулы АФП человека, ответственный за эту активность. Было показано, что он представляет собой участок домена III, состоит из 34 а.о. и имеет последовательность LSEDKLLACGEGAADIIHLCIRNEMTPVNPVG [124-128]. Этот участок был назван пептидом, ингибирующим рост (GIP - growth inhibitory peptide), обозначен P447 (он же P149), химически синтезирован, очищен и достаточно подробно охарактеризован. В целом ряде работ исследователями этого пептида аминокислотные остатки, входящие в его состав, обозначаются как 447-480. Однако следует заметить, что в зрелой молекуле АФП человека вышеуказанной последовательности соответствуют а.о. 446-479 (SwissProt 02771).

В отличие от интактной молекулы АФП, биологический эффект пептида GIP проявлялся без предварительной инкубации с гормоном. Так, инъекция неполовозрелым самкам мышей 1 мкг пептида в 0,2 мл буферного раствора за час до введения 17β-эстрадиола (0,5 мкг в 0,2 мл буфера) приводила к уменьшению на 45% стимулирующего пролиферацию клеток эффекта гормона [126, 127]. Иммунохимическое изучение пептида подтвердило, что он ответственен за противоопухолевую активность АФП человека. Антитела к пептиду не узнавали нативную молекулу АФП, но взаимодействовали с конформационно измененной, в результате воздействия высоких концентраций эстрадиола, молекулой. Предполагается, что данный пептид в нативной молекуле АФП находится в скрытом, стерически недоступном состоянии и становится доступным в результате изменений конформации белка [129].

Фрагмент пептида P447, представляющий собой октапептид EMTPVNPG и содержащий а.о. 471-478, сохраняет биологическую активность в тесте ингибирования эстрогензависимой пролиферации клеток матки неполовозрелых самок мышей и роста опухолей [130]. Этот участок обладает максимальной биологической активностью: в тесте ингибирования пролиферации клеток матки неполовозрелых самок мышей эффект составляет 49%, в то время как этот показатель для пептида P447 равен 45%, а для интактного АФП - 35%. Методом химического синтеза на твердой фазе были получены два аналога данного октапептида [131]. В первом случае два остатка пролина были замещены двумя остатками 4-гидроксипролина, и был получен пептид, имеющий состав EMTOVNOG и обладающий большей гидрофильностью, чем исходный октапептид. Во втором случае был получен циклический пептид цикло-EMTOVNOG, который обладал большей гидрофобностью и более напряженной конформацией, чем исходный октапептид. Однако оба пептида обладали биологической активностью, аналогичной активности исходного октапептида. Методом молекулярной динамики показано, что циклический пептид, цикло-EMTOVNOG, обладает способностью связываться с мембранным рецептором

АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИН

GPR30, ассоциированным с G-белком. При этом, циклопептид образует комплекс с рецептором в кармане, расположенном между трансмембранными спиралями TM6 и TM7 G-белка, вызывая небольшие конформационные изменения в его вторичной структуре [132]. Связывание циклопептида с активным центром стабилизируется образованием водородных связей между остатками Арг-259, Цис-271, Асн-316, Асн-320 и Тир-324 G-белка и аминокислотными остатками Глу, Тре, гидрокси-Про и Глн пептида. Изучение электростатического поверхностного потенциала рецептора показало, что активный центр обладает большим положительным зарядом, чем другие его участки.

Путем сравнения аминокислотных последовательностей было выявлено сходство между пептидом GIP и некоторыми участками белков теплового шока (HSP) и других стрессовых белков, ассоциированных с осмотическим, окислительным шоком или воздействием высокой ионной силы или pH раствора, т.е. белков, ответственных за процессы сворачивания и разворачивания белковой молекулы [133]. Предполагается, что пептид GIP является участком молекулы АФП, чувствительным к стрессовым воздействиям, и выявляется при его конформационных изменениях. Также в моделях *in vivo* было показано, что этот пептидный фрагмент, как и целая молекула АФП, снижает фетотоксичность эстрогенов и инсулина [134]. Под воздействием АФП и пептида GIP дефекты развития плода уменьшаются на 50%, а гибель плода во время внутриутробного развития - на 63-73%.

4.3. Эффекты разрыва дисульфидных связей и замен аминокислот.

Известно, что, несмотря на огромное число возможных конформаций полипептидной цепи, молекулы белков образуют определенную, строго упорядоченную пространственную структуру. В растворе белки обладают конформационной стабильностью при определенных условиях (pH, ионная сила раствора, температура и др.) и могут подвергаться конформационным изменениям при изменении этих условий [135-137]. АФП характеризуется достаточно высокой конформационной стабильностью, которая обусловлена существованием большого количества дисульфидных связей [138]. Дисульфидные связи стабилизируют пространственную структуру белка, задавая одновременно определенные расстояния между элементами вторичной и третичной структуры и поддерживая свободный объем молекулы, необходимый для осуществления ее функций. При этом -S-S-мостики не только скрепляют отдельные участки полипептидной цепи, но могут также удерживать их от излишнего сближения, исполняя роль "распорок" [139, 140].

С целью изучения роли дисульфидных связей в функционировании АФП была произведена химическая модификация остатков цистеина с образованием S-метилцистеина или S-(2-аминоэтил)-цистеина в составе пептида P447. Пептиды с модифицированными остатками цистеина оказались активны в тесте ингибирования эстрогензависимой пролиферации клеток матки у неполовозрелых самок мышей. Активность метил- и аминоэтильных производных пептида P447 в этом тесте составляла 31% и 29%, соответственно; она была сопоставима с активностью самого пептида - 45% [126, 130]. Следовательно, наличие свободных, немодифицированных сульфгидрильных групп не играет существенной роли в биологической активности пептида. В свежеприготовленном буферном растворе пептида P447, при pH 7,4, происходит олигомеризация с образованием тримеров, обладающих, аналогично исходному пептиду, биологической активностью. Спустя 3 часа после приготовления образцов в растворе при низкой концентрации пептида (0,1-0,3 г/л) начинается превращение тримеров в димеры, сопровождающееся потерей биологической активности. Добавление дитиотрейтола, восстанавливающего дисульфидные связи с образованием свободных SH-групп, способствует превращению димеров вновь в тримеры.

Для выяснения причин этих функциональных различий было проведено определение молекулярных масс мономеров в активной (тримерах) и неактивной

(димерах) формах пептида с помощью времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF) [128]. Молекулярная масса мономеров в тримерах была равна 3572 Да, что соответствует молекулярной массе пептида P447, содержащего два остатка цистеина со свободными SH-группами. Следовательно, в тримерах не образуются ни межпептидные, ни внутripептидные дисульфидные связи. Молекулярная масса мономеров в димерах составляла 3570 Да, т.е. была на 2 Да меньше, чем в тримерах. Эта разница как раз соответствует потере двух атомов водорода при образовании одной дисульфидной связи между двумя остатками цистеина внутри одного пептида. Возможно, что образование -S-S-мостика сопровождается изменениями конформации пептида и приводит к потере биологической активности. Необходимо отметить, что в интактной молекуле АФП между остатками цистеина, присутствующими в пептиде P447, не образуются дисульфидной связи. Однако эти остатки цистеина задействованы в образовании других внутримолекулярных дисульфидных связей [138]. КД-спектры в дальней УФ-области показали, что вторичные структуры пептида P447 в активной и неактивной формах идентичны. Следовательно, образование дисульфидной связи не сопровождается изменением вторичной структуры пептида [126].

Обычно, связывание ионов металлов приводит к изменению вторичной структуры пептидов [141]. Связывание ионов Zn(II) и Co(II) существенно не влияет на вторичную структуру пептида P447. Однако, добавление ионов цинка в раствор пептида в соотношении молярных концентраций ионов металла к пептиду 2:1 приводит к предотвращению превращения активной формы в неактивную [127]. Ионы кобальта, наоборот, ускоряют образование неактивной формы при том же соотношении молярных концентраций. Потенциальными участками связывания ионов металлов обычно считаются остатки цистеина, гистидина, аспарагиновой и глутаминовой кислот [142]. В исследуемом пептиде ион Co(II) связывается с двумя остатками цистеина и, возможно, с двумя остатками гистидина с образованием структуры с искривленной тетраэдрической симметрией. Замена двух остатков гистидина на два остатка аланина приводит к потере способности связывать ионы Co(II) [143]. Что касается ионов Zn(II), то интактная молекула АФП человека содержит пять участков связывания: один из них обладает высокой аффинностью, а остальные четыре - меньшей аффинностью к иону металла [144]. Вероятно, строгая координация иона Zn(II) осуществляется с участием двух остатков аспарагиновой кислоты и двух остатков гистидина. Интересным является то обстоятельство, что связывание ионов цинка не вызывает конформационных изменений и не влияет на стабильность молекулы АФП.

Для уточнения роли дисульфидных связей и изменения олигомерного статуса пептида P447 в его биологической активности были синтезированы аналоги пептида, в которых два остатка цистеина были замещены остатками аланина, глицина или серина [127, 128]. Аланин и глицин были выбраны в качестве заместителей, так как являются самыми простыми нейтральными аминокислотами, а серин - самым близким структурным аналогом цистеина. В буферном растворе, pH 7,4 при низкой концентрации пептида (0,2 г/л) аланинсодержащий пептид образовывал тримеры, аналогично исходному цистеинсодержащему пептиду. Серин- и глицинсодержащие пептиды образовывали димеры. Способ олигомеризации пептида коррелирует со степенью гидрофобности аминокислот: Цис > Ала > Гли > Сер. Пептиды, содержащие гидрофобные аминокислоты образуют преимущественно тримеры, и это указывает на то, что тримеры стабилизируются гидрофобными связями.

КД-спектры в дальней УФ-области показали низкое содержание α -спирали и относительно высокое содержание β -складчатой структуры во всех пептидах. Установлено, что вторичная структура интактного АФП богата α -спиральными участками (около 65%) и не содержит β -складчатой структуры [76]. Обычно пептидные сегменты, которые в составе целой молекулы белка имеют α -спиральную вторичную структуру, теряют ее, становясь самостоятельным

АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИН

пептидом [145]. Это объясняется тем, что в составе отдельного пептидного фрагмента элементы вторичной структуры менее стабильны, чем в составе целой белковой молекулы. Так показано, что жесткость α -спирали, погруженной в белок, примерно в три раза выше, а амплитуда флуктуаций в два раза меньше, чем в составе изолированного пептида [140]. В составе отдельного пептидного фрагмента при повышении температуры происходит плавление α -спирали, начиная с N-конца, и некоторые аминокислотные остатки (Гли, Арг, пара Ала-Цис) ускоряют плавление.

Способность того или иного пептида образовывать α -спиральную структуру можно определить добавлением трифторэтанола, который стимулирует образование α -спирали [146]. КД-спектры, полученные для аланин- и глицинсодержащего пептидов в присутствии трифторэтанола, показали что в этих условиях имеет место образование α -спирали [127]. С повышением концентрации реагента до 90% содержание α -спирали в этих пептидах увеличивалось до 43% и 33%, соответственно. При этом содержание β -складчатой структуры снижалось. Образование α -спирали в глициновом пептиде было меньше, что, видимо, обусловлено отсутствием стабилизации за счет взаимодействия боковых радикалов и уникальной конформационной подвижностью глицина. Термодинамические измерения показали, что аланин проявляет наибольшую, а глицин – наименьшую склонность участвовать в образовании α -спиральной структуры [147, 148].

Таким образом, пептид Р447 обладает конформационной лабильностью и замена цистеина на другие аминокислоты заметно не влияют на это свойство. Повышение температуры до 60°C также вызывает обратимое изменение вторичной структуры [128]. Можно полагать, что в составе целой молекулы АФП этот участок также проявляет конформационную подвижность, что имеет большое значение для функционирования этого белка, например, для взаимодействия с рецептором. Аланинсодержащий пептид обладает наибольшей биологической активностью – ингибирующий эффект в тесте подавления эстрогензависимой пролиферации клеток матки у неполовозрелых самок мышей составляет 37%. Активность глицинсодержащего пептида более чем в два раза меньше (17%), а серинсодержащий пептид вовсе не обладает биологической активностью. Димеры этих пептидов, аналогично димерам цистеинсодержащего пептида, не проявляют биологической активности. Аланинсодержащий пептид был также проверен в тесте ингибирования роста опухоли простаты, и его противоопухолевая активность не была выявлена [99].

4.4. Эпитопное картирование АФП. Конформационные изменения определяют также доступность различных иммунодетерминантных групп (эпитопов) альфа-фетопротеина. Методом конкурентной иммуноаффинной электрохроматографии на нитроцеллюлозной мембране (НЦМ) с использованием набора из 51 моноклонального антитела (МкА) против различных эпитопов АФП выявлено пять типов взаимодействий комплекса АФП-МкА с моноклональными антителами, фиксированными на НЦМ: 1) полная нейтрализация, 2) частичная нейтрализация, 3) однонаправленная нейтрализация, 4) усиление связывания и 5) отсутствие взаимодействия [149]. Показано, что 51 МкА узнают 23 различных эпитопа в молекуле АФП человека. На основании этих данных была составлена карта эпитопов, состоящая, по крайней мере, из 8 индивидуальных эпитопов и 8 эпитопных кластеров (А, В, С, D, E, F, G и H), распознаваемых несколькими моноклональными антителами с общей эпитопной специфичностью. Кластеры А, В и Е были наиболее обширны по представительству в них МкА и были отнесены к иммунодоминантным эпитопам АФП. На основании данных по фрагментации АФП [150], авторами сделано предположение, что большая часть эпитопов (кластеры А, В и D) расположена в домене III, кластер Е – в домене I, а кластер С – в домене II. Полная взаимная нейтрализация (реакция первого типа) объясняется авторами тем, что сравниваемые МкА направлены против одних и тех

же эпитопов. Реакция второго типа (частичная нейтрализация) обусловлена, видимо, существованием неполного сходства в свойствах эпитопов или тем, что определенный эпитоп экспрессируется лишь на части молекул АФП. Реакция третьего типа может быть вызвана частичным пространственным перекрытием одного эпитопа другим. Устранение экранирующего эффекта и открытие определенных эпитопов объясняет феномен усиления связывания МкА (реакция четвертого типа). Это явление может быть вызвано также конформационными изменениями всей молекулы АФП, что приводит к обнажению скрытых внутри белковой глобулы эпитопов, которые становятся доступными для связывания МкА. Отсутствие взаимодействия с МкА (реакция пятого типа) может быть объяснена полной недоступностью эпитопов.

В растворе отдельные эпитопы и эпитопные кластеры в молекуле нативного АФП существуют в скрытой форме и выявляются лишь при частичной денатурации белка адсорбцией на НЦМ [150, 151]. Выявлены различные конформационные варианты АФП в зависимости от доступности тех или иных кластеров и индивидуальных эпитопов, которые в случае доступности эпитопа характеризовались положительной реакцией (+) АФП с соответствующими МкА и отсутствием реакции (-) при недоступности данного эпитопа для связывания МкА. Так, было показано существование двух форм АФП, в одной из которых эпитопы кластера D являются открытыми и доступными (эпитоп-положительная форма, D+), а в другой – скрытыми, недоступными для МкА (эпитоп-отрицательная форма, D-). Аналогичные свойства проявляли также эпитопы 106 и 108, на основе чего они, наряду с кластером D, были предложены в качестве маркеров конформационного состояния АФП. Эпитоп-положительные и эпитоп-отрицательные формы АФП имеют одинаковую молекулярную массу и являются взаимопревращаемыми. Так, эпитоп-положительные формы 106+ и D+ превращаются в 106- и D- при добавлении 0,2% сахарозы. Сочетание иммуноаффинной электрохроматографии с электрофорезом и иммуноблоттингом улучшает идентификацию скрытых эпитопов [152]. Было показано также, что в амниотической жидкости присутствуют преимущественно эпитоп-положительные формы АФП, в то время как в сыворотке крови больных первичным раком печени и тератокарциномой присутствуют, в основном, эпитоп-отрицательные формы [153]. Изучение экспрессии двух конформационно зависимых эпитопов cde D и cde106 на молекуле АФП человека показало, что различные биологические жидкости содержат как эпитоп-положительные, так и эпитоп-отрицательные варианты. Однако содержание cde-положительных форм АФП больше в амниотической жидкости, чем в пуповинной сыворотке и сыворотке крови больных первичным раком печени и тератокарциномой.

Другой группой исследователей изучена эпитопная структура рекомбинантного АФП человека методом иммуноферментного анализа с использованием набора из 36 моноклональных антител [154]. Были получены рекомбинантные молекулы АФП, содержащие один, два или все три домена: домен I, домен II, домен III, домены I-II, домены II-III, домены I-II-III. Обнаружены 13 эпитопов, локализованных в домене I, и 17 эпитопов в домене III. Расположение остальных 6 эпитопов не было выявлено. Один из эпитопов, выявленных с помощью моноклональных антител AFY6, оказался октапептидом SKAENAVE (а.о. 175-182). Интересно, что скрытые эпитопы АФП индуцируют спонтанный иммунный ответ у больных, страдающих первичным раком печени, циррозом печени и хроническим гепатитом [155]. Иммуноглобулины больных реагируют с теми эпитопами на молекуле АФП, которые в нативном белке являются недоступными и становятся доступными при его дегликозилировании, приводящей к частичной денатурации белка.

Часть из эпитопов АФП относится к антигенам главного комплекса гистосовместимости и могут узнаваться CD8+ Т-лимфоцитами. Стволовые клетки, полученные методами генной инженерии и продуцирующие АФП,

АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИН

обладают способностью генерировать АФП-специфический иммунный ответ Т-лимфоцитов в культуре аутологичных лимфоцитов человека и трансгенных мышей HLA-A2 1/Kb [156] Эти Т-лимфоциты узнают участок АФП, представляющий собой нанопептид GVALQTMKQ, обозначенный авторами как а о 542-550 Однако в зрелой молекуле АФП эта последовательность соответствует а о 524-532 (SwissProt 02771) Данный участок АФП человека был идентифицирован с помощью компьютерного анализа как HLA-A2 1-специфичный эпитоп Т-лимфоциты, активированные этим нанопептидом, узнают АФП-содержащие клетки как в тесте цитотоксичности, так и в тесте высвобождения цитотоксинов Идентифицированы четыре иммунодоминантных HLA-A*0201-специфичных пептидных участка в молекуле АФП человека, способные вызывать специфический иммунный ответ Т-лимфоцитов периферической крови у здоровых доноров [157]

4.5 Другие функционально важные участки. Известно, что факторы транскрипции содержат участок с чередующимися остатками лейцина - тн лейциновый zipper Его роль заключается в обеспечении димеризации белков и, тем самым, создании пространственной структуры, необходимой для их связывания с ДНК посредством ДНК-связывающих доменов, богатых аргинином и лизином Если происходит димеризация молекул одного белка, то имеет место гомодимеризация, при димеризации молекул разных белков - гетеродимеризация Выявление в составе АФП аминокислотных последовательностей, напоминающих собой сигнальные участки для узнавания и связывания димеризующих белков, в том числе факторов роста, позволит изучить механизмы, лежащие в основе его способности регулировать клеточную пролиферацию и рост опухолей В составе доменов II и III АФП человека выявлены участки гетеро- и гомодимеризации, характерные для ядерных стероидных и тиреоидных рецепторов, выполняющих функции факторов транскрипции [158, 159]

Локализация эстрогенсвязывающего участка АФП была произведена с использованием химерного белка, созданного на основе АФП человека и крысы [56] Показано, что эстрогенсвязывающий участок АФП крысы расположен в домене III и представляет собой пептид, включающий аминокислотные остатки 423-445 [160] Синтетический пептид Р149, являющийся участком домена III АФП человека, обладает способностью связывать свободный 17-бета-эстрадиол [124] Видимо, в интактной молекуле АФП человека именно этот пептид является эстрогенсвязывающим участком Отсутствие способности нативного АФП человека связывать свободные эстрогены, возможно, объясняется тем, что этот участок обычно скрыт и недоступен для взаимодействия

Показано, что участки связывания других гидрофобных лигандов, в частности жирных кислот, билирубина и некоторых лекарств расположены, преимущественно, в доменах II и III [32, 45]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Один из главных вопросов, остающихся до настоящего времени открытыми, касается биологической роли АФП На основании экспериментальных данных, полученных в разное время разными группами исследователей, было выдвинуто несколько гипотез о функциях этого белка Высокая концентрация АФП в сыворотке плода свидетельствует о его важной роли в эмбриональном развитии Способность АФП связывать эстрогены и, тем самым, регулировать уровень свободных (т.е. активных гормонов) позволяет предположить, что он защищает плод от влияния материнских эстрогенов Так как АФП, подобно сывороточному альбумину, связывает различные гидрофобные лиганды и ионы металлов, было предположено, что он выполняет функцию основного транспортного белка во время эмбрионального развития Данные об иммуносупрессивной активности АФП говорят в пользу его роли в защите плода от иммунной системы матери Обнаружение рецепторов для АФП на поверхности клеточной мембраны и его способность проникать внутрь клеток позволило предсказать возможность его взаимодействия с внутриклеточными белками, в том

числе с шаперонами, которые способствуют правильному сворачиванию вновь синтезированной полипептидной цепи и ее транспорту через цитоплазму к клеточным органеллам. Действительно, в молекуле АФП человека были обнаружены аминокислотные последовательности, идентичные некоторым участкам белков теплового шока и других стрессовых белков, обладающих шаперонной активностью.

Показано, что синтез АФП происходит в G1 и S- фазах клеточного цикла. Отсюда было сделано предположение, что АФП влияет на процессы клеточной пролиферации и роста. Это предположение было подтверждено при структурно-функциональном картировании АФП, показавшем наличие участков, сходных с биологически активными сайтами некоторых факторов роста. В целом, в молекуле АФП были выявлены биологически активные сайты, участвующие в связывании полиненасыщенных жирных кислот и эстрогенов, ответственные за иммуномодулирующую активность, ингибирование пролиферации клеток и роста опухолей, индукцию апоптоза, а также пептидные фрагменты, идентичные участкам белков внеклеточного матрикса и главного комплекса гистосовместимости, мотивы гетеро- гомодимеризации и др.

Активность этих участков зависит от конформационного состояния молекулы АФП и их доступности для взаимодействий. АФП способен существовать в различных конформационных вариантах и образовывать форму расплавленной глобулы. Однако, было показано, что функциональная активность белков может изменяться, даже если в их молекулах не происходит никаких структурных изменений [161]. Большое значение может иметь микроокружение активного участка, определяющее его подвижность. Большая подвижность активного центра обеспечивает его большую доступность для взаимодействий. Следовательно, изучение конформационно-динамических свойств АФП необходимо для выяснения механизмов, лежащих в основе его функционирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Berstrand C.G., Czar B.* (1956) *Scan. J. Clin. Lab. Invest.*, **8**, 174-176.
2. *Murali G., Roulet D.L.A.* (1961) *Helv. Paediatr. Acta*, **16**, 517-520.
3. *Тамаринов Ю.С.* (1963) I- Всесоюзный биохимический съезд. М.-Л., АН СССР. Тезисы, **2**, с.274.
4. *Abelev G.I., Perova S., Khramkova N.I.* (1963) *Transplantation*, **1**, 174-180.
5. *Nishio, H. and Dugaiczky, A.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 7557-7561.
6. *Nishio H., Heiskanen M., Palotie A., Belanger L., Dugaiczky A.* (1996) *J. Mol. Biol.*, **259**, 113-119.
7. *Nishio H., Hamdi H., Dugaiczky A.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **380**, 1431-1434.
8. *Hamdi H., Nishio H., Tavis J., Zielinski R., Dugaiczky A.* (2000) *J. Mol. Biol.*, **299**, 931-939.
9. *Gibbs E.M., Zielinski R., Boyde C., Dugaiczky A.* (1987) *Biochemistry*, **26**, 1332-1343.
10. *Boismenn R., Semeniuk D., Murgita R.A.* (1997) *Protein Express. Purif.*, **10** (1), 10-26.
11. *Bennett G.A., Semeniuk D.J., Jacobson H.I., Murgita R.A.* (1997) *Breast Cancer Res. Treat.*, **45** (2), 169-179.
12. *Ruoslahti E., Seppala M.* (1972) *Nature*, **235**, 161-162.
13. *Gitlin, D., Boesman, M.* (1967) *J. Clin. Invest.*, **46** (6), 1010-1016.
14. *Bellini C., Bonacci W., Paridu E., Sera G.* (1998) *Clin. Chem.*, **44**, 267, 686-691.
15. *Ruoslahti E., Seppala M.* (1971) *Intern. J. Cancer*, **8**, 374-383.

16. Jones E.A., Clement-Jones M., James O.F., Wilson D.I. (2001) *J. Anat.*, **198**, 555-559.
17. Ruoslahti E., Seppala M. (1979) *Adv. Cancer Res.*, **29**, 275-346.
18. Seppala M. (1975) *Ann. N-Y. Acad. Sci.*, **259**, 59-73.
19. Brock D.J., Scrimgeour J.B., Nelson M.M. (1975) *Genetics*, **7**, 163-169.
20. Тамарин Ю.С. (1965) *Вопр. мед. химии*, **11**, 20-24.
21. Abelev G.I. (1971) *Adv. Cancer Res.*, **14**, 295-358.
22. Yoshiki T., Itoh T., Shirai T., Noro T., Tomino Y., Hamajama T.I. (1976) *Cancer*, **37**, 2343-2348.
23. Purves L.R., Bersohn I., Geddes E.W. (1970) *Cancer*, **25**, 1261-1270.
24. Aoyagi Y., Saitoh A., Suzuki Y., Igarashi K., Oguro M., Yokota T., Mori S., Suda T., Isemura M., Asakura H. (1993) *Hepatology*, **17**, 50-52.
25. Seta N., Gayno S., Jezequel-Guer M., Toueg M.L., Erlinger S., Durand G.J. (1997) *J. Hepatol.*, **26**, 265-271.
26. Koide N., Nishio A., Igarashi J., Kajikawa S., Adachi N., Amano J. (1999) *Am. J. Gastroenterol.*, **94**, 1658-1663.
27. Goldstein N.S., Blue D.E., Hankin R., Hunter S., Bayati N., Silverman A.L., Gordon S.C. (1999) *Am. J. Clin. Pathol.*, **111**, 811-816.
28. Chan M.H., Shing M.M., Poon T.C., Johnson P.J., Lam C.W. (2000) *Ann. Clin. Biochem.*, **37**, 681-685.
29. Morinaga T., Sakai M., Wegmann T.G., Namaoki T. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4604-4608.
30. Pucci P., Siliciano R., Malorni A., Marino G., Tecce M.F., Ceccarini C., Terrana B. (1991) *Biochemistry*, **30**, 5061-5066.
31. Dudich I., Tokhtamysheva N., Semenkova L., Dudich E., Hellman Y., Korpela T. (1999) *Biochemistry*, **38**, 10406-10414.
32. Mizejewski G.J. (1997) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **215**, 333-362.
33. Cooke N.E., David E.V. (1985) *J. Clin. Invest.*, **76**, 2420-2424.
34. Deutsch H.F. (1991) *Adv. Cancer Res.*, **56**, 253-312.
35. Lichtenstein H.S., Lyons D.E., Wurfer M.M., Johnson D.A., MacGinley M.D., Leidli J.C., Trollinger D.B., Mayr J.P., Wright S.D., Zukowski M.M. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 18149-18154.
36. Ruoslahti E., Terry W.D. (1976) *Nature*, **260**, 804-805.
37. Luft A.J., Lorscheider F.L. (1983) *Biochemistry*, **22**, 5971-5978.
38. Zizkovsky V., Strop P., Korcakova J., Havranova M., Mikes F. (1983) *Ann. N-Y. Acad. Sci.*, **417**, 49-56.
39. He X-M., Carter D. (1992) *Nature*, **358**, 209-215.
40. Barker M. E. (1988) *Tumor Biol.*, **9**, 123-136.
41. Gorin M.B., Cooper D.L., Eiferman F., Van de Rijn P., Tilghman S.M. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 1954-1959.
42. Brown J.R. (1976) *Fed. Proc.*, **35**, 2141-2144.
43. Privalov P.L. (1979) *Adv. Protein Chem.*, **33**, 167-244.
44. Privalov P.L., Potechin S.A. (1986) *Methods Enzymol.*, **131**, 4-51.
45. Nishihira J., Koyama Y., Sakai M., Nishi S. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **196**, 1049-1057.
46. Soloff M.S., Swartz S.K., Pearlmutter F., Kithier K. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, **427**, 644-651.
47. Ruoslahti E., Ester T., Seppala M. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, **578**, 511-519.
48. Aoyagi Y., Ikenaka T., Ichida F. (1979) *Cancer Res.*, **39**, 3571-3574.
49. Berde C.B., Nagai M., Deutsch H.F. (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 12609-12614.
50. Aoyagi Y., Ikenaka T., Ishida F. (1978) *Cancer Res.*, **38**, 3483-3486.
51. Uriel J., de Nechaud B., Dupiers M. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 1175-1180.

52. Parmelee D.C., Evenson M.A., Deutsch H.F. (1978) J. Biol. Chem., **253**, 2114-2119.
53. Hsia J.C., Er J.S., Tan C.T., Ester T. Ruoslahti E. (1980) J. Biol. Chem., **255**, 4224-4227.
54. Nagai M., Becker J.D., Deutsch H.F. (1982) Oncodev. Biol. Med., **3**, 343-350.
55. Birkenmeier G., Usbeck E., Saro L., Kopperschlager G. (1983) J. Chromatograph., **265**, 27-35.
56. Nishi S., Matsue H., Yoshida H., Yamamoto R. Sakai M. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**, 3102-3105.
57. Milligan S.R., Khan O., Nash M. (1998) J. Comp. Endocrinol., **112** (1), 89-95.
58. Ruiz-Gutierrez V., Moreno R., Moreda W., Copado M.A., Rodriguez-Burgoz A. (2001) J. Protein Chem., **20** (1), 19-23.
59. Uriel J., Bouillon D., Dupiers M. (1975) FEBS Letts., **53**, 305-308.
60. Benassayag C., Vallette G., Cittanova N., Nunez E., Jayle M.F. (1975) Biochim. Biophys. Acta, **412**, 295-305.
61. Allen S.H.G., Bennett J.A., Mizejewski G.J., Andersen T.T., Ferraris S. Jacobson H.I. (1993) Biochim. Biophys. Acta, **1202**, 135-142.
62. Терентьев А.А., Молдогазиева Н.Т., Тагирова А.К., Татаиринов Ю.С. (1988) Бюлл. эксп. биол. мед., №4, 422-424.
63. Терентьев А.А., Молдогазиева Н.Т., Татаиринов Ю.С. (1990) Бюлл. эксп. биол. мед., №5, 438-440.
64. Tatarinov Yu.S., Terentiev A.A., Moldogazieva N.T., Tagirova A.K. (1991) Tumor Biol., **12**, 125-130.
65. Yachnin S. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 2857-2860.
66. Yachnin S. (1983) Ann. N.Y. Acad. Sci., **417**, 105-107.
67. Lu C.Y., Changelian P.S. Unanue E.R. (1984) J. Immunol., **132**, 1722-1727.
68. Torres J.M., Laborda J., Naval J., Darracq N., Calvo M., Mishal Z., Uriel J. (1989) Mol. Immunol., **26**, 851-857.
69. Wang X.W., Xu B. (1998) Eur. J. Pharmacol., **351**, 105-111.
70. Matsuura E., Kang Y., Katikawa H., Ogata P., Kotani T., Ohtaki S., Nishi S. (1999) Tumor Biol., **20**, 162-171.
71. Atemezem A., Mbemba E., Marfaing R., Vaysse J., Pontet M., Saffar L., Charnaux N., Gattegno L. (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun., **296**, 507.
72. Terentiev A.A., Simonova A.V., Arshinova S.S., Kulakov V.V., Bahus G.O., Kudryavtseva E.V., Bepalova J.D., Ovchinnikov M.V., Tatarinov Yu.S. (2003) Tumor Biol., **24**, Suppl. 1, 54.
73. Mizejewski G.J. (2001) Exp. Biol. Med., **226**, 377-408.
74. Semenkova L.V., Dudich E.I., Dudich I.V. (1997) Tumor Biol., **18**, 261-273.
75. Dudich E.A., Semenkova L.V., Gorbatoва E.A., Dudich A.V., Khromikh L.M., Grechko G.K., Sukhikh G.T. (1998) Tumor Biol., **19**, 30-40.
76. Dudich E., Semenkova L., Dudich I., Gorbatoва E., Tokhtamisheva N., Tatulov E., Nikolaeva M., Sukhikh G. (1999) Eur. J. Biochem., **266**, 750-761.
77. Semenkova L., Dudich E., Dudich I., Tokhtamisheva N., Tatulov E., Okruzhnov Yu., Garcia-Foncillas J., Palop-Cubillo J.A., Korpela T. (2003) Eur. J. Biochem., **270**, 4388-4399.
78. Mizejewski G.J., Vonnegut M., Jacobson H.I. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 2733-2737.
79. Jacobson H.I., Bennett J.A., Mizejewski G.J. (1990) Cancer Res., **50**, 415-420.
80. Jacobson H.I., Thompson V.D., Janerich D.T. (1989) Amer. J. Epidemiol., **129**, 865-873.

81. *Richardson B.E., Hulka B.S., David-Pack J.L., Hughes C.L., Van den Berg B.J., Christiansen R.E., Calvin J.A.* (1998) *Amer. J. Epidemiol.*, **148**, 719-727.
82. *Torres J.M., Caccacq N., Uriel J.* (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1159**, 60-66.
83. *Naval J., Villacampa M.J., Goguel A.F., Uriel J.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3301-3304.
84. *Suzuki Y., Zeng C.Q.Y., Alpert E.* (1992) *J Clin. Invest.*, **90**, 1530-1536
85. *Moro R., Tamaoki T., Wegmann T.J., Longnecker B.M., Laderoute M.P.* (1993) *Tumor Biol.*, **14**, 116-130.
86. *Villacampa M.J., Moro R., Naval J., Failly-Crepin C., Lampreave F., Uriel J.* (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 1322-1327.
87. *Severin S.E., Posypanova G.A., Katukov V.Yu., Shyrev I.I., Luzhkov Yu.M., Gerasimova G.K., Zhukova O.S., Vorozhtsov G.N., Kaliya O.N., Lukyanets E.A., Severin E.S.* (1997) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **45**, 1081-1089.
88. *Sotnichenko A.I., Severin S.E., Posypanova G.A., Feldman N.B., Grigoriev M.I., Severin E.S., Petrov R.V.* (1999) *FEBS Letts.*, **450**, 49-51.
89. *Lutsenko S.V., Feldman N.B., Finakova G.V., Gukasova N.V., Petukhov S.V., Posypanova G.A., Scryabin K.G., Severin S.E.* (2000) *Tumor Biol.*, **21**, 367-374
90. *Северин С.Е., Посыпанова Г.А., Сотниченко А.И., Москалева Е.Ю., Фельдман Н.Б., Григорьев М.И., Северин Е.С., Петров Р.В.* (1999) *Докл РАН*, **366**, 561-564.
91. *Фельдман Н.Б., Киселев С.М., Гукасова Н.Б., Посыпанова Г.А., Луценко С.В., Северин С.Е.* (2000) *Биохимия*, **65**, 967-971.
92. *Савицкий А.А., Гукасова Н.Б., Гутанов С.Г., Фельдман Н.Б., Лукьянец Е.А., Миронов А.Ф., Якубовская Р.И., Луценко С.В., Северин С.Е.* (2000) *Биохимия*, **65**, 732-736.
93. *Mizejewski G.J.* (2002) *Expert Rev. Anticancer Ther.*, **2** (6), 709-735.
94. *Nunez E.A.* (1994) *Tumor Biol.*, **15**, 63-72.
95. *Valette G., Vranckx R., Martin M-E., Benassayag C., Nunez E.A.* (1989) *Biochim. Biophys. Acta*, **997**, 302-312.
96. *Haourigui M., Thobie N., Martin M-E., Benassayag C., Nunez E.A.* (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1125**, 157-165.
97. *Benassayag C., Mignot T.M., Haourigui M., Civel C., Hassid J., Carbonne B., Nunez E.A., Ferre F.* (1997) *J. Lipid Res.*, **38**, 276-286.
98. *Festin S.M., Bennett J.A., Fletcher P.W., Jacobson H.I., Shaye D.D., Andersen T.T.* (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1427**, 307-314.
99. *Carerers G., Dauphinee M.J., Eisele L.E., MacColl R., Mizejewski G.J.* (2002) *Anticancer Res.*, **22**, 2817-2820.
100. *Zizkovsky V., Strop P., Lukasova S., Korcakova G., Dvorak P.* (1981) *Oncodev. Biol. Med.*, **2**, 323-330
101. *Uversky V.N., Kirkitadze M.D., Narizhneva N.V., Potekhin S.A., Tomashevsky A.Yu.* (1995) *FEBS Letts.*, **364**, 165-167
102. *Uversky V.N., Narizhneva N.V., Ivanova T.V., Tomashevski A.Yu.* (1997) *Biochemistry*, **36**, 13638-13645.
103. *Ptitsyn O.B.* (1995) *Adv. Protein Chem.*, **47**, 83-229.
104. *Uversky V.N., Narizhneva N.V., Ivanova T.V., Kirkitadze M.D., Tomashevsky A.Yu.* (1997) *FEBS Letts.*, **410**, 280-284.
105. *Нарыжнева Н.Г., Иванова Т.В., Томашевский А.Ю., Уверский В.Н.* (1997) *Мол. Биол.*, **31**, 1043-1048.
106. *Dolgikh D.A., Gilmanshin R.I., Brazhnikov E.V., Bychkova V.E., Semisotnov G.V., Venyaminov S.Y., Ptitsyn O.B.* (1981) *FEBS Letts.*, **136**, 311-315.
107. *Fink A.L.* (1995) *Methods Mol. Biol.*, **40**, 343-360.

108. *Bychkova V.E., Pain R.H., Ptitsyn O.B.* (1988) FEBS Letts., **238**, 231-234.
109. *Terentiev A.A., Tatarinov Yu.S.* (1997) Tumor Biol., **18**, Suppl. 2, 42.
110. *Терентьев А.А.* (1997) Вестник РГМУ, **1** (3), 76-79.
111. *Terentiev A.A.* (1998) Tumor Biol., **19**, Suppl. 2, 24.
112. *Terentiev A.A., Tatarinov Yu.S.* (1998) Tumor Biol., **19**, Suppl. 2, 37.
113. *Терентьев А.А.* (1999) Вестник РГМУ, **4** (9), 24-27.
114. *Terentiev A.A., Tagirova A.K.* (1999) Tumor Biol., **20**, Suppl. 2, 42.
115. *Salmasi J.M., Kazimirski A.N., Terentiev A.A., Poryadin G.V., Kudryavtseva E.V., Tatarinov Yu.S.* (1999) Tumor Biol., **20**, Suppl. 2, 43.
116. *Kazimirski A.N., Salmasi J.M., Terentiev A.A., Bessalova Z.D., Kudryavtseva E.V., Poriadin G.V., Tatarinov Y.S.* (2000) Tumor Biol., **21**, Suppl. 1, 37.
117. *Terentiev A.A., Kazimirski A.N., Salmasi J.M.* (2000) Tumor Biol., **21**, Suppl. 1, 110.
118. *Казимирский А.Н., Терентьев А.А., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В.* (2001) В кн.: Белки-маркеры патологических состояний. Астрахань-Москва, с.23-31.
119. *Kazimirsky A.N., Terentiev A.A., Salmasi J.M., Poryadin G.V.* (2001) Russ. J. Immunol., **6** (12), 394-398.
120. *Kazimirsky A.N., Salmasi J.M., Terentiev A.A., Poryadin G.V., Tatarinov Yu.S.* (2002) Tumor Biol., **23**, Suppl. 1, 22.
121. *Tagirova A.K., Najiorum Ngam-Asra, Evdokimov V.V., Tatarinov Yu.S., Terentiev A.A.* (2003) Tumor Biol., **24**, Suppl. 1, 52.
122. *Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Семенова Л.Ю., Наджиорум Нгам-Асра, Беспалова Ж.Д., Кудрявцева Е.В., Порядин Г.В., Терентьев А.А.* (2003) Вестник РГМУ, **3** (29), 48-56.
123. *Terentiev A.A.* (2004) Russian J. Immunol., **9**, Suppl.1, 55.
124. *Vakharia D., Mizejewski G.J.* (2000) Breast Cancer Res. Treat., **63**, 41-52.
125. *Mizejewski G.J., Dias J.A., Hauer C.R., Henrikson K.P., Gierthy I.* (1996) Mol. Cell. Endocrinol., **118**, 15-33.
126. *Eisele L.E., Mesfin F.B., Bennett J.A., Andersen T.T., Jacobson H.I., Soldwedel H., MacColl R., Mizejewski G.J.* (2001) J. Peptide Res., **57**, 29-38.
127. *Eisele L.E., Mesfin F.B., Bennett J.A., Andersen T.T., Jacobson H.I., Soldwedel H., MacColl R., Mizejewski G.J.* (2001) J. Peptide Res., **57**, 539-546.
128. *MacColl R., Eisele L.E., Stack R.F., Hauer C., Vakharia D.D., Benno A., Kelly W.C., Mizejewski G.J.* (2001) Biochim. Biophys. Acta, **1528**, 127-134.
129. *Mizejewski G.J., MacColl R.* (2003) Mol. Cancer Ther., **2** (11), 1243-1255.
130. *Mesfin F.B., Bennett G.A., Jacobson H.I., Zhu S., Andersen T.T.* (2000) Biochim. Biophys. Acta, **1501**, 33-43.
131. *Mesfin F.B., Andersen T.T., Jacobson H.I., Zhu S., Bennett G.A.* (2001) J. Peptide Res., **58**, 246-256.
132. *Hamsa A., Sarma M.H., Sarma R.H.* (2003). J. Biomol. Struct. Dyn., **20**, 751-758.
133. *Dauphinee M.J., Mizejewski G.J.* (2002) Med. Hypotheses, **58**, 453-461.
134. *Butterstein G., Morrison J., Mizejewski G.J.* (2003) Fetal Diagn. Ther., **18** (5), 360-369.
135. *Куртикадзе М.Д., Нарыжнева Н.В., Томашевский А.Ю., Потехин С.А., Уверский В.Н.* (1996) Биоорг. химия, **22**, 408-414.
136. *Cooper A.* (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 2740-2741.
137. *Уверский В.Н.* (1999) Биохимия, **64**, 250-266.

138. Сотниченко А.Н., Заболотнев Д.В., Северин С.Е., Швец В.И. (2001) Биоорг. химия, **24**, 243-248.
139. Шайтан К.В., Михайлюк М.Г., Леонтьев К.М., Сарайкин С.С., Беляков А.А. (2003) Биофизика, **48**, 210-216.
140. Шайтан К.В., Михайлюк М.Г., Леонтьев К.М., Сарайкин С.С., Беляков А.А. (2002) Биофизика, **47**, 411-419.
141. Li X., Suzuki K., Kanaori K., Tayama K., Kashiwada K., Hiroaki H., Kohda D., Tanaka T. (2000) Protein Sci., **9**, 1327-1333.
142. Branden C.B., Tooze J. (1999) Introduction to Protein Structure. Second Edition. Garland, N.Y.
143. Butterstein G., MacColl R., Mizejewski G.J., Eisele L.E., Masseyeff M. (2003) J. Peptide Res., **61**, 213-218.
144. Permyakova S.E., Oberg K.A., Cherskaya A.M., Shavlovsky M.M., Permyakov E.A., Uversky V.N. (2002) Biochim. Biophys. Acta, **1586**, 1-10.
145. Callihan D.E., Logan T.M. (1999) J. Mol. Biol., **285**, 2163-2175.
146. Fan M., Mayo K. (1995) J. Biol. Chem., **270**, 24693-24701.
147. Luge I., Mayorga O.L., Freire E. (1996) Biochemistry, **35**, 13681-13688.
148. O'Neil K.T., De Gardo W.F. (1990) Science, **250**, 646-651.
149. Якименко Е.Р., Язова А.К., Гусев А.И., Абелев Г.И. (2001) Биохимия, **66**, 524-530.
150. Yakimenko E.F., Karamova E.R., Goussev A.I., Hilgers G., Abelev G.I., Yazova A.K. (1998) Tumor Biol., **19**, 301-309.
151. Karamova E.R., Yazova A.R., Goussev A.I., Yakimenko E.F., Abelev G.I. (1998) Tumor Biol., **19**, 310-317.
152. Karamova E.R., Yazova A.K., Yakimenko E.F., Goussev A.I., Abelev G.I. (2003) Tumor Biol., **24**(1), 1-8.
153. Yazova A.K., Goussev A.I., Christiansen M., Kushlinsky N.E., Stogova E., Norgaard-Pedersen B., Abelev G.I. (2003) Immunol. Lett., **85**, 261-270.
154. Kang G., Matsuura E., Sakamoto T., Sakai M., Nishi B. (2001) Tumor Biol., **22**, 254-261.
155. Bei R., Budillon A., Reale M.G., Capuano G., Pomponi D., Budillon G., Frati L., Murano R. (1999) Cancer Res., **59**, 5471-5479.
156. Butterfield L.H., Koh A., Meng W., Volhmer C.M., Ribas A., Dissette V., Lee E., Glaspy G.A., McBride W.H., Economou G.S. (1999) Cancer Res., **59**, 3134-3142.
157. Butterfield L.H., Ribas A., Mena W.S., Dissette V.B., Amarnani S., Vu H.T., Seia E., Todd K., Glaspy J.A., McBride W.H., Economou J.S. (2003) Clin. Cancer Res., **9** (16 Pt 1), 5902-5908.
158. Mizejewski G.J. (1993) Bioessays, **15**, 427-432.
159. Mizejewski G.J. (1995) J. Theor. Biol., **176**, 103-113.
160. Nishi S., Shahbazzadeh D., Azuma M., Sakai M. (1993) Tumor Biol., **14**, 234.
161. Falconi M., Stroppolo M., Cioni P., Strambini G., Sergi A., Ferrario M., Desideri A. (2001) Biophys. J., **80**, 2556-2567.

Поступила 15.04.2004

**RELATIONSHIP BETWEEN STRUCTURE AND FUNCTION
OF ALPHA-FETOPROTEIN: CONFORMATIONAL CHANGES
AND BIOLOGICAL ACTIVITY**

N. T. Moldogazieva¹, A. A. Terentiev¹, K. V. Shaitan²

¹Russian State Medical University,
Ostrovityanov street 1, Moscow, 117997 Russia; tel/fax: (095)- 434-05-88, (095)- 434-41-01.
e-mail: nmoldogazieva@yahoo.com

²M. V. Lomonosov Moscow State University, Vorobiovy Gory, 1, Moscow, 119899 Russia

Alpha-fetoprotein (AFP) is the major mammalian fetal protein and the recognized tumor marker. This review summarizes data on structure and function of AFP with emphasis on human AFP, which is intensively investigated. During the last decade multiple functionally important sites of human AFP have been revealed or predicted by searching of similarity between primary structures of AFP and other proteins or their DNA sequences. A number of peptides derived from human AFP have been studied by different teams of investigators. These peptides were obtained by limited proteolysis of AFP or synthesized using solid phase chemistry. Study of biological (physiological) activities of these peptides allows determining biologically active sites of alpha-fetoprotein and constructing its structural and functional map. Biomodulating properties of these peptides make them a potential basis for design of drugs for different purposes including using in anticancer therapy.

Conformational changes in AFP molecule have been intensively studied for the last few years and sufficient conformational mobility of AFP with the ability to form molten globule form (MGF) despite its stability in solution has been demonstrated. Native molecule of AFP may contain cryptic biologically active sites, which are not available for ligand binding. These sites become open and available for interaction after changes in conformation of AFP molecule. Study of conformational changes of AFP under different conditions allows understanding molecular mechanisms of its functioning. This review describes and analyses data obtained, mainly, during the last few years on study of conformational states of alpha-fetoprotein and relationship between conformational changes of AFP and its biological activity. Biochemical, biophysical and functional characteristics of some well-studied peptide fragments of AFP and their structural and functional mapping are presented.

Key words: alpha-fetoprotein, conformational changes, peptide fragments, biological activity.