



УДК 577.112.017:581.143.24

БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ФРАГМЕНТА НЕЙРОТРОФНОГО ФАКТОРА ИЗ ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ: СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГОМОЛОГИЯ С ФАКТОРОМ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК ЛИНИИ HL-60

© 2000 г. И. А. Костянян[#], С. С. Жохов, М. В. Астапова, С. М. Драницына,
А. П. Богачук, Л. К. Байдакова*, И. Л. Родионов*, И. И. Баскин**,
О. Н. Голубева***, Дж. Томбран-Тинк****, В. М. Липкин

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

* Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Пушино, Московская область;

** Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва;

*** Институт биологии гена РАН, Москва;

**** Центр неврологических исследований Национального медицинского центра детского здоровья
и Университет им. Дж. Вашингтона, Вашингтон, США

Поступила в редакцию 15.02.2000 г. Принята к печати 17.03.2000 г.

Показано, что полноразмерный нейротрофный фактор из пигментного эпителия (PEDF) является индуктором дифференцировки клеток промиелоцитарного лейкоза человека линии HL-60. Структурный анализ PEDF позволил выявить в его C-концевой области шестичленный фрагмент PEDF-(352–357) (PEDF-6), последовательность которого высокогомологична участку активного центра человеческого лейкоцитарного фактора дифференцировки HLDF-(41–46) (HLDF-6). Изучено биологическое действие PEDF и синтетических пептидов PEDF-6 и HLDF-6 на клетки HL-60 и эктодерму ранней гастрюлы эмбрионов *Xenopus laevis*. На основании структурной и функциональной гомологии HLDF, PEDF и их гомологичных пептидов, а также с помощью компьютерного моделирования пространственных структур полноразмерного PEDF и PEDF с отщепленным по связи Leu³⁸⁰-Thr³⁸¹ в серпиновой петле C-концевым фрагментом высказана гипотеза о роли серпиновой петли в функционировании PEDF.

Ключевые слова: дифференцировка клеток; факторы дифференцировки клеток; пептиды; компьютерное моделирование.

ВВЕДЕНИЕ

Факторы дифференцировки представляют собой вещества, индуцирующие превращение первичных, недифференцированных клеток в зрелые, функционально активные. Эти факторы способны останавливать неограниченную пролиферацию опухолей и вызывать дифференцировку опухолевых клеток. Большинство эндогенных факторов дифференцировки имеют белковую природу, однако известны и низкомолекулярные

факторы, такие, как ретиноевая кислота [1, 2] и витамин D₃ [3].

Фактор дифференцировки HLDF (human leukemia derived factor) был выделен нами из культуральной среды клеток промиелоцитарного лейкоза человека HL-60, индуцированных транс-ретиноевой кислотой [4]. Он представляет собой небольшой гликозилированный белок, содержащий 54 а. о. и имеющий M 8.2 кДа. HLDF способен индуцировать дифференцировку клеток HL-60 в фенотипически зрелые гранулоциты [4]. В C-концевом участке его полипептидной цепи удалось обнаружить пептидный фрагмент длиной 6 а. о. (HLDF-6), полностью воспроизводящий дифференцирующую активность нативного фактора [5].

Сравнительный компьютерный анализ аминокислотной последовательности HLDF с первичными структурами известных к настоящему времени белков показал, что еще один фактор диф-

Сокращения: PEDF – фактор дифференцировки из пигментного эпителия сетчатки глаза; HLDF – фактор дифференцировки из клеток HL-60; BSA – бычий сывороточный альбумин; NBT – нитроголубой тетразолий; PBS – изотонический K/Na-фосфатный буфер; ЭРГ – эктодерма ранней гастрюлы.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 336-55-11; факс: (095) 310-7010; e-mail: kost@ibch.ru).

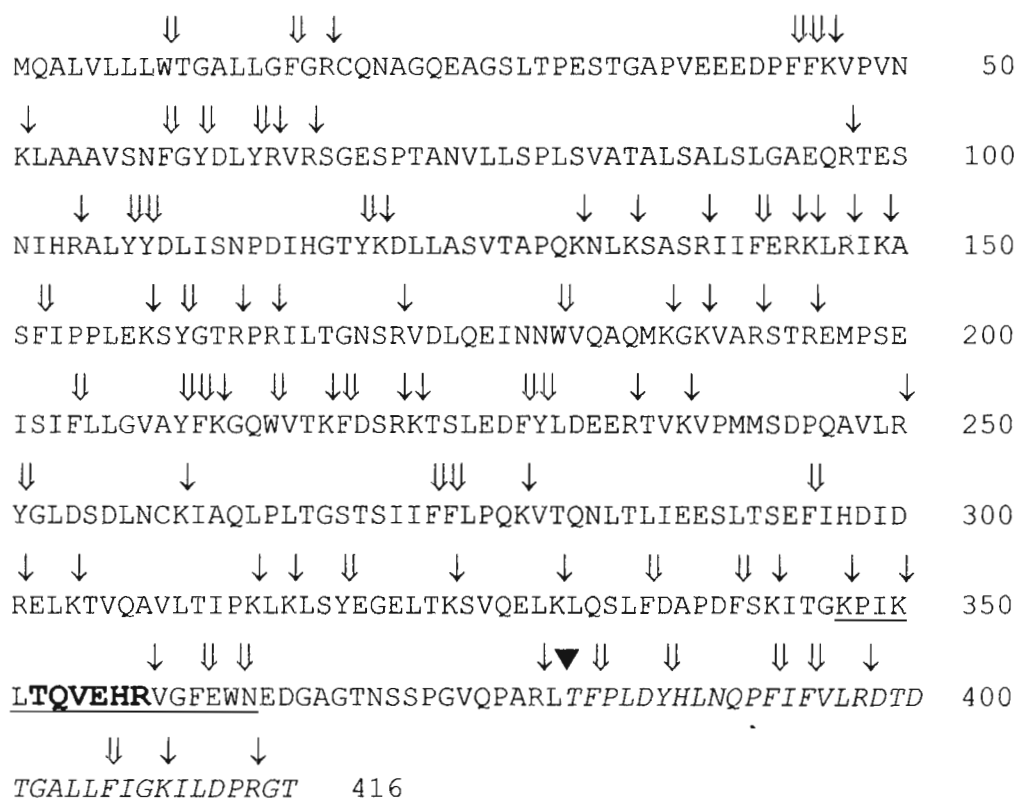


Рис. 1. Аминокислотная последовательность PEDF быка [6]. Отмечены связи, расщепляемые под действием трипсина (↓) и химотрипсина (↓), а также высокочувствительная к протеолизу связь L³⁸⁰–T³⁸¹, расположенная в центре серпиковой петли (▼). Курсивом выделен С-концевой фрагмент (381–416), отщепляемый при разрыве этой связи. Подчеркнут участок, гомологичный С-концевому фрагменту HLDF (“HLDF-подобная петля”). Жирным шрифтом выделен фрагмент PEDF-6.

ференцировки – из культуры клеток пигментного эпителия сетчатки глаза человека PEDF (pigment epithelium-derived factor) содержит С-концевой участок из 17 а. о., гомологичный С-концевому фрагменту HLDF (53% гомологии) [6]. Нейротрофный фактор PEDF вызывает дифференцировку клеток ретинобластомы линии Y79 в зрелые нейроны [7], а также значительно снижает скорость апоптоза последних [8] и предохраняет их от токсического действия ряда веществ, например глутаминовой кислоты [9, 10]. К настоящему времени PEDF обнаружен почти во всех нервных тканях млекопитающих и птиц [11], а также во многих других тканях, например в легочном эпителии [12].

Молекула PEDF состоит из 418 а. о. и имеет $M \sim 50$ кДа (рис. 1) [6]. На основании особенностей первичной и пространственной структур PEDF отнесен к семейству серпинов (ингибиторов сериновых протеиназ) [6], однако, ингибиторная функция для него не показана. Подобно другим серпинам, PEDF имеет глобулярную структуру с выступающей наружу петлей, содержащей связь, наиболее подверженную действию сериновых протеиназ [13]. Разрыв этой связи ведет к отщеплению от молекулы 36-членного фрагмента с С-конца, а также конформационным изменениям всей молекулы PEDF, о которых можно судить по уменьшению эллиптичности молекулы [14]. Однако такие изменения не влияют на активность PEDF ни в отношении клеток ретинобластомы, ни зрелых нейронов. Поэтому регуляторная роль отщепляемого С-концевого фрагмента PEDF остается неясной.

Данная работа посвящена сравнительному изучению действия PEDF, HLDF и биологически активных гомологичных гексапептидов PEDF-6 и HLDF-6 на клетки HL-60 и эктодерму ранней гаструлы (*Xenopus laevis*) с целью выяснения роли С-концевого фрагмента PEDF в функционировании его молекулы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первичные структуры гомологичных С-концевых участков факторов дифференцировки HLDF и PEDF представлены в табл. 1.

Ранее было установлено, что именно С-концевой фрагмент HLDF, где находится шестичленная последовательность HLDF-6, определяет дифференцирующую активность всей молекулы фактора дифференцировки [5, 15]. Поэтому логично было предположить, что и PEDF, содержащий го-

мологичный участок, может вызывать индукцию дифференцировки клеток HL-60.

Проверка дифференцирующего действия PEDF на клетках HL-60 в NBT-тесте [16] показала, что этот фактор является прекрасным индуктором дифференцировки клеток промиелоцитарного лейкоза человека и проявляет свою активность в достаточно широком диапазоне концентраций от 10^{-7} до 10^{-10} М (табл. 2).

Сходное действие PEDF и HLDF на клетки HL-60 позволило предположить, что дифференцирующая активность PEDF обеспечивается наличием в его структуре фрагмента TQVEHR (352–357) (PEDF-6), гомологичного фрагменту TGENHR (41–46), выполняющему роль активного центра HLDF (HLDF-6).

Для проверки этой гипотезы был проведен исчерпывающий гидролиз PEDF смесью трипсина и химотрипсина, и полученный гидролизат был испытан в NBT-тесте на клетках HL-60. Контролем служили гидролизаты двух других неингибиторных серпинов: овальбумина и BSA (табл. 3). Анализ аминокислотной последовательности PEDF показал, что при исчерпывающем гидролизе смесью трипсина/химотрипсина ни одна из связей фрагмента PEDF-6 не расщепляется, и он должен присутствовать в гидролизате в составе фрагмента 351–357 LTQVEHR (рис. 1).

Сохранение дифференцирующей активности гидролизата PEDF свидетельствовало в пользу нашего предположения о том, что участок PEDF-(352–357) TQVEHR может выполнять роль индуктора дифференцировки клеток HL-60. Для окончательного подтверждения этой гипотезы пептид PEDF-6 был синтезирован и испытан на клетках HL-60 в NBT-тесте.

Как видно из результатов, приведенных в табл. 2, этот пептид полностью воспроизводит на клетках HL-60 дифференцирующую активность полноразмерного PEDF.

Мы изучили дифференцирующее действие PEDF, а также синтетического пептида PEDF-6 на эмбриональную ткань – эктодерму эмбрионов *X. laevis* на стадии ранней гаструлы, на которой она наиболее чувствительна к действию различных факторов дифференцировки, и сравнили их действие с действием HLDF и его активного фрагмента HLDF-6. Под действием как фактора HLDF, так и пептида HLDF-6 в ЭРГ образовывались клетки крови (рис. 2а, б). Полноразмерный PEDF вызывал главным образом нейральную дифференцировку ЭРГ: образовывались глазные ткани – сетчатка и пигментный эпителий (рис. 2в) или же нервная трубка (рис. 2г), хотя и в этом случае наблюдалось незначительное образование клеток крови. С другой стороны, синтетический пептид PEDF-6 индуцировал дифференцировку ЭРГ в мезенхимные клетки (рис. 2д). Ни клетки крови, ни нейральные образования под действием пептида в ЭРГ не возникали.

Таблица 1. Первичные структуры гомологичных C-концевых участков факторов дифференцировки PEDF [6] и HLDF [4]

PEDF	347	K P I K L T Q V E – H R A G – F E W N*	363
HLDF	37	K E L – L T G – E N H R C G I F V I N	53

* Остатки, совпадающие в обоих факторах, выделены жирным шрифтом; фрагменты PEDF-6 и HLDF-6 подчеркнуты.

Таблица 2. Дифференцирующая активность PEDF и пептида TQVEHR, соответствующего фрагменту PEDF-6, в разных концентрациях*

Концентрация белка/пептида, М	PEDF	Пептид TQVEHR
10^{-6}		56 ± 1
10^{-7}	56 ± 2	52 ± 1
10^{-8}	55 ± 1	48 ± 1
10^{-9}	49 ± 1	39 ± 1
10^{-10}	33 ± 1	30 ± 1
Контроль	28 ± 3	

* Приведено количество NBT-положительных клеток (%).

Таблица 3. Дифференцирующая активность гидролизатов PEDF, овальбумина и альбумина в различных концентрациях. Для исчерпывающего гидролиза использована смесь трипсина и химотрипсина

Концентрация, М	NBT-положительные клетки, %		
	PEDF	овальбу-мин	BSA
10^{-8}	54 ± 2	26 ± 2	34 ± 2
10^{-9}	49 ± 1	29 ± 2	29 ± 2
10^{-10}	33 ± 1	29 ± 2	29 ± 2
Контроль (смесь трипсина и химотрипсина)	29 ± 5		

В контрольной группе эксплантатов ЭРГ, не обработанных индуктором, не наблюдалось никакой дифференцировки – на срезе видны клетки атипичного эпидермиса (рис. 2е).

Поскольку полноразмерный PEDF оказывает на ЭРГ двоякое действие – индуцирует возникновение нейральных образований и клеток крови, логично предположить, что нейральная дифференцировка ЭРГ происходит под действием его N-концевого фрагмента, который, как известно, является индуктором дифференцировки клеток ретинобластомы [13], а образование клеток крови индуцирует фрагмент PEDF-6. Однако синтетический пептид, соответствующий последовательности PEDF-6, вызывал образование мезенхимы, а не клеток крови. Мы полагаем, что хотя

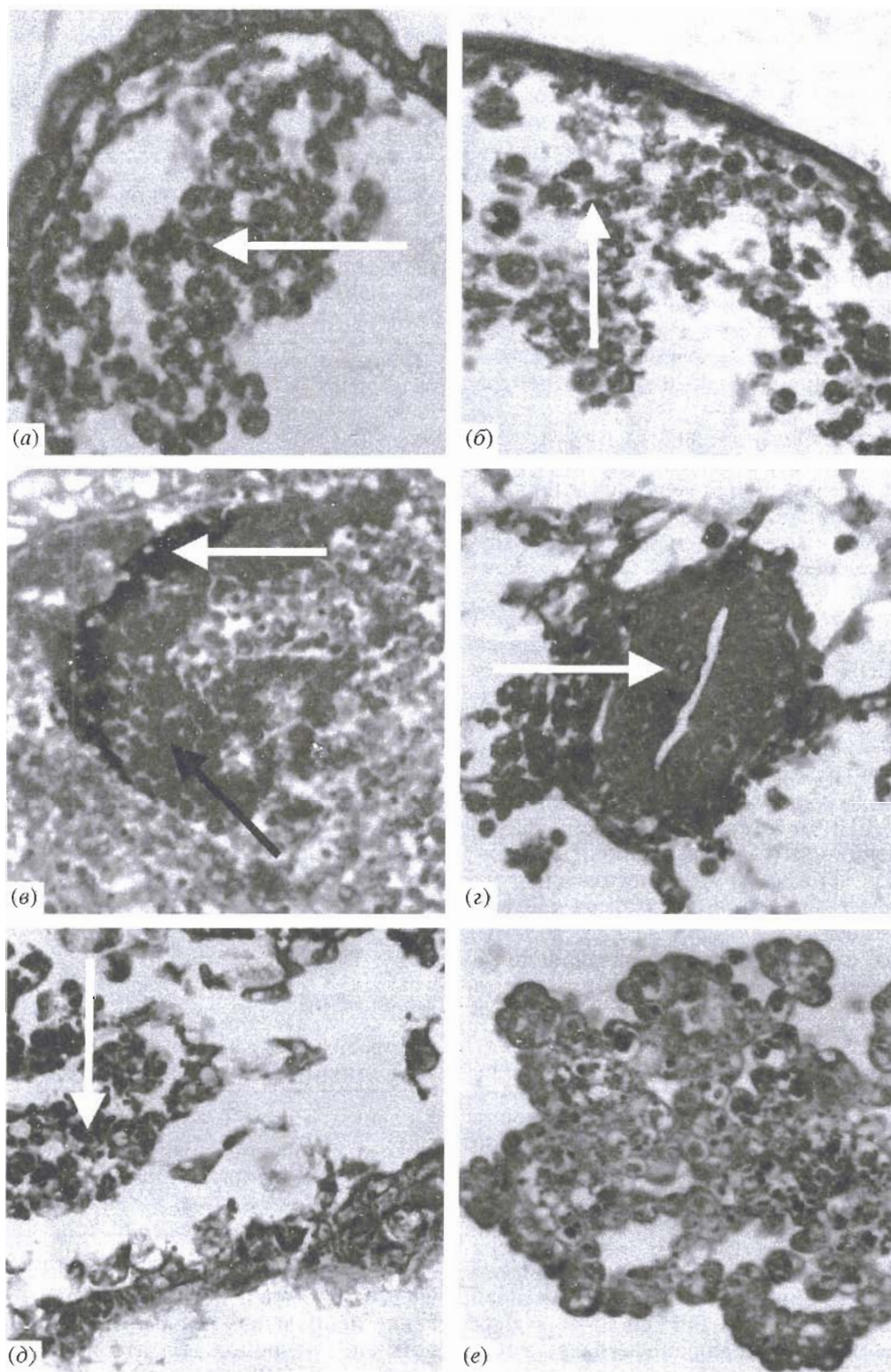


Рис. 2. Гистологические срезы эксплантатов эктодермы ранней гаструлы *X. laevis*, обработанных различными индукторами. (а) – клетки крови, индуцированные HLDF (показаны стрелкой); (б) – клетки крови, индуцированные пептидом HLDF-6 (показаны стрелкой); (в) – сетчатка (черная стрелка) и пигментный эпителий (светлая стрелка), индуцированные под действием PEDF; (г) – нервная трубка (показана стрелкой) и мезенхимные клетки, индуцированные под действием PEDF; (д) – при обработке ЭРГ пептидом PEDF-6 дифференцируются только мезенхимные клетки (показаны стрелкой); (е) – эктодерма, не обработанная индукторами, формирует только атипичный эпидермис. Снимки сделаны с увеличением 10×25 .

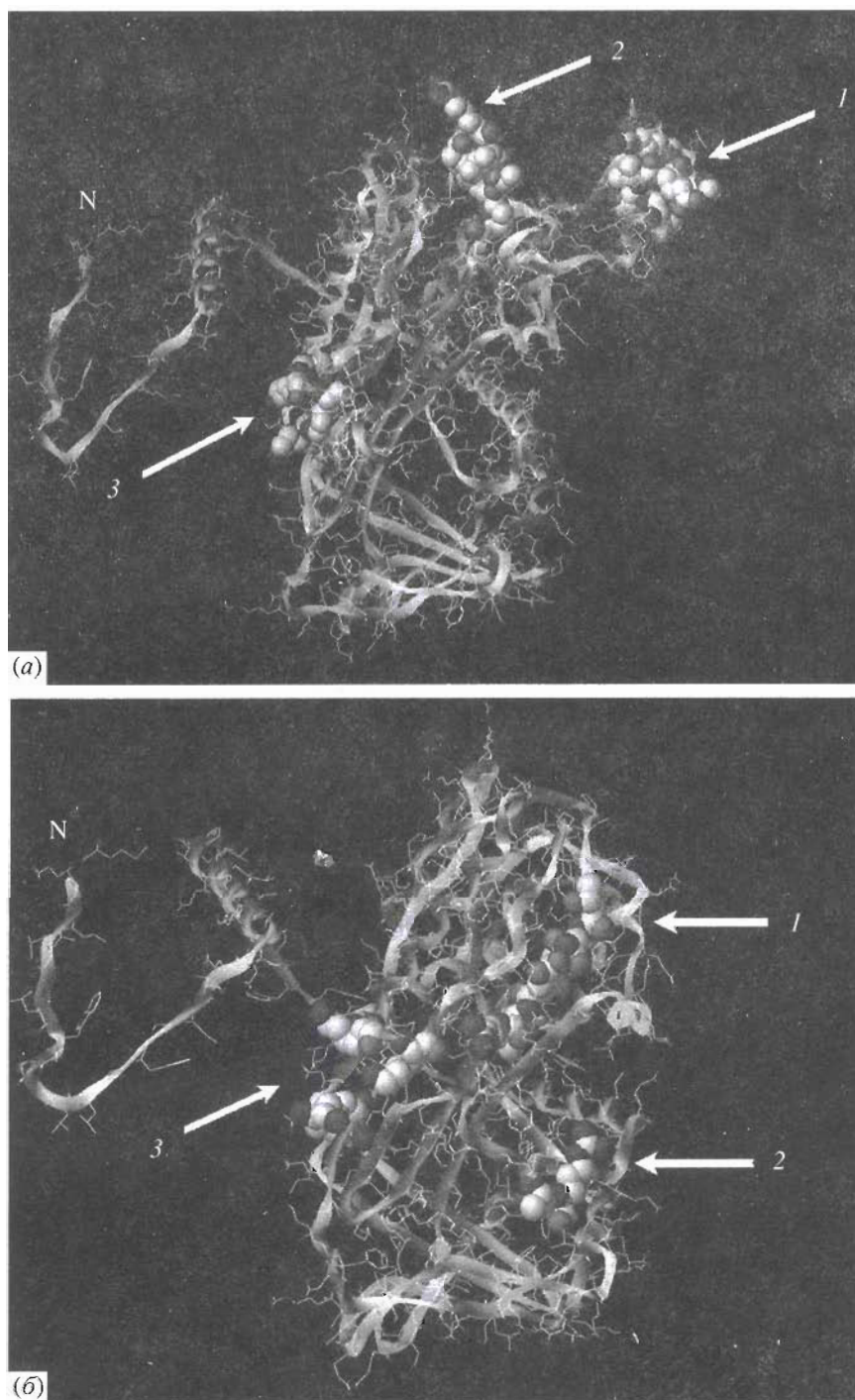


Рис. 3. Предложенные нами модели трехмерной пространственной структуры бычьего PEDF: (а) – полноразмерная молекула; (б) – молекула, усеченная с С-конца в результате разрыва связи L³⁸⁰–T³⁸¹ в серпиновой петле. 1 – фрагмент TQVENR (остатки 352–357); 2 – серпиновая петля (376–384) (а) и часть серпиновой петли, сохранившаяся при усечении (376–380) (б); 3 – геларинсвязывающий лизин/аргининовый кластер (остатки K¹³², K¹³⁵, R¹⁴⁷, K¹⁸⁷, R¹⁹², K²¹²); N – N-конец молекулы.

гомологичные участки PEDF-(352–357) и HLDF-(41–46) и отличаются по своим аминокислотным последовательностям, однако в полноразмерной молекуле PEDF функциональные группы фрагмента PEDF-6 в пространстве приобретают кон-

формацию, аналогичную конформации соответствующего фрагмента в активном центре HLDF.

К нашему удивлению, оказалось, что препарат PEDF под действием нескольких процедур замораживания/оттаивания постепенно терял свою

дифференцирующую активность как на клетках HL-60, так и на ЭРГ *X. laevis*. Анализ этого неактивного препарата с помощью SDS-ПААГ-электрофореза показал, что вместо полосы, соответствующей полноразмерному PEDF с M 50 кДа, появилась полоса, соответствующая белку с M 46 кДа (данные не представлены), что указывает на то, что в процессе замораживания/оттаивания происходит ограниченный протеолиз молекулы PEDF. Анализ N -концевой аминокислотной последовательности препарата PEDF, подвергнутого нескольким циклам замораживания/оттаивания, выявил только последовательность: TFPLDYHLN-QPFIFVLRDT... Поскольку N -концевой остаток Met PEDF ацетилирован, появление последовательности, идентичной первичной структуре фрагмента (381–416) PEDF, указывает на то, что в процессе замораживания/оттаивания происходит единственный разрыв по связи $L^{380}-T^{381}$ (рис. 1). Из литературных данных известно, что связь $L^{380}-T^{381}$, находящаяся в середине серпиновой петли, высокочувствительна к сериновым протеиназам, и при ее гидролизе происходит подобное наблюдаемому нами уменьшение молекулярной массы белка на 5 кДа [13]. Расщепление этой связи не влияет на дифференцирующую активность PEDF на клетках ретинобластомы, но приводит к потере его дифференцирующей активности на клетках HL-60 и на ЭРГ *X. laevis*.

Ранее [14] с помощью метода КД было показано, что расщепление связи $L^{380}-T^{381}$ в рекомбинантном PEDF ведет к некоторому изменению общей эллиптичности молекулы белка, что свидетельствует о конформационных перестройках всей структуры. Мы предположили, что эти перестройки затрагивают приближенную к серпиновой петле C -концевую часть молекулы, в которой и находится участок (352–357) TQVENR.

С целью проверки этого предположения мы сконструировали компьютерные модели трехмерной пространственной структуры полноразмерной молекулы PEDF быка (рис. 3а) и молекулы без 36-членного C -концевого фрагмента, который отщепляется при разрыве вышеуказанной связи (рис. 3б). Модели строились на основе гомологий с белками с известной трехмерной структурой, установленной методом рентгеноструктурного анализа: антитромбина [17], антихимотрипсина [18] и ингибитора эластазы лейкоцитов [19]. Все эти белки принадлежат к семейству серпинов, их гомология с PEDF быка составляет 23.8, 23.3 и 23.1% соответственно. Модель структуры PEDF без 36-членного C -концевого фрагмента строилась по гомологиям с теми же белками, усеченными в результате разрыва связей в их серпиновых петлях.

Обе модели хорошо согласуются с компьютерной моделью PEDF, опубликованной ранее в статье Альберди с соавт. [20]. Согласно нашим

моделям, как и модели Альберди, в гепаринсвязывающем лизин/аргининовом кластере PEDF остатки K^{132} , K^{135} , R^{147} , K^{187} , R^{192} , K^{212} пространственно сближены друг с другом (рис. 3а, 3б).

В полноразмерной молекуле рядом с серпиновой петлей (остатки 376–384) (рис. 3а, 2), чуть дальше от C -конца молекулы, находится еще одна петля размером 29 а. о. (340–368), аминокислотная последовательность которой гомологична C -концевому фрагменту HLDF и в середине этой петли (“HLDF-подобной петли”) располагается фрагмент PEDF-6 (рис. 3а, 1). Интересно, что в молекуле без C -концевого фрагмента, согласно нашей модели, соответствующий участок полипептидной цепи погружен внутрь глобулы (рис. 3б, 1) и, следовательно, не может выполнять роль индуктора дифференцировки. Поэтому при разрыве связи $L^{380}-T^{381}$ в серпиновой петле PEDF теряет свою дифференцирующую активность.

Роль серпиновой петли и отщепляемого C -концевого фрагмента PEDF заключается в поддержании необходимой конформации “HLDF-подобной петли”. Возможно, *in vivo* расщепление серпиновой петли является одним из регуляторных механизмов, обеспечивающих проявление качества разных активностей PEDF на клетках, находящихся на разных стадиях развития.

Исходя из экспериментов на ЭРГ можно сказать, что “HLDF-подобная петля” с ее активным фрагментом TQVENR обеспечивает выполнение PEDF двоякой функции на эмбриональных клетках: с одной стороны индуцирует дифференцировку в клетки крови, с другой – выполняет роль “усилителя” нейтральной дифференцировки под действием N -концевого фрагмента. Взаимодействие PEDF с ЭРГ носит более сложный характер, чем в случае опухолевых клеток, поскольку в составе ЭРГ имеются клетки, находящиеся на разных стадиях развития.

Эффект различных участков молекул PEDF и HLDF на эмбриональные ткани является предметом нашего дальнейшего изучения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: RPMI 1640, фетальную сыворотку теленка (Gibco, США); трипсин, обработанный L -1-тозиламидо-2-фенилэтил-хлорметилкетонном и химотрипсин, обработанный 1-хлоро-3-тозиламидо-7-амино-2-гептаном из поджелудочной железы быка (Worthington, США); овальбумин, BSA фракции V, азокармин (Serva, Германия); гонадотропин хорионический (Россия).

Нативный PEDF выделялся из стекловидного тела глаз быка согласно ранее описанной методике [21]. Дистиллированную воду дополнительно очищали с помощью системы Milli-Q (Millipore, США).

Все остальные реактивы имели квалификацию “ос. ч.”.

Культивирование клеток HL-60. Клеточная линия HL-60 была любезно предоставлена Р.Г. Васильевым (Институт биотехнологии, Москва). Клетки культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 7% фетальной сыворотки теленка, в атмосфере 5% CO₂ при 37°C.

NBT-тест. Дифференцирующую активность факторов и пептидов определяли по способности клеток HL-60 восстанавливать нитроголубой тетразолий [16]. Через 72 ч после добавления индуктора определяли число NBT-положительных клеток (в процентах). NBT-положительными считали клетки, содержащие не менее 10 гранул.

Исчерпывающий гидролиз белков смесью трипсина и α -химотрипсина проводили в течение 12 ч при 37°C в 20 мМ аммоний-бикарбонатном буфере, pH 7.8. Отношение S : E составляло 20 : 1 для каждого фермента. Перед использованием ферменты тестировали, используя в качестве субстрата BSA, в тех же условиях с последующим SDS-электрофорезом продуктов гидролиза.

Пептиды синтезировали твердофазным методом с использованием Boc/Bzl-методологии на полистирольной смоле Boc-Arg(Tos)-PAM RESIN (100–200 mesh, 0.47 ммоль/г, Advanced ChemTech, USA), которую брали в количестве 200 ммоль стартовой аминокислоты на каждый пептид. Синтез пептидилполимеров проводили в проточном реакторе переменного объема с использованием светлографического мониторинга для определения продолжительности циклов операций [22]. Синтезированные пептиды очищали с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-50 SF (колонка 26 × 90 мм) в 1 М АсОН с последующей жидкостной хроматографией среднего давления на колонке ПерRPC™ (FPLC-System, Pharmacia, Швеция). Чистоту полученных препаратов оценивали с помощью аминокислотного и масс-спектрометрического (MALDI-спектрометрия) анализов. Масс-спектрометрический анализ осуществляли на приборе Vision 2000 (Thermo Bioanalysis, Англия).

Индукция дифференцировки ЭРГ эмбрионов *X. laevis*. Кладку икры шпорцевых лягушек *X. laevis* стимулировали искусственно внутримышечными инъекциями хорионического гонадотропина. Икру культивировали при 20°C до стадии 10 по таблице Ньюкопа и Фабера [23]. ЭРГ аккуратно вырезали из верхней крыши бластоцеля эмбрионов [24]. Препарацию эктодермы, индукцию, а также дальнейшее культивирование вели в стандартном физиологическом растворе Ниу-Твитти [24].

Действующая концентрация индуктора составляла 10⁻⁷ М (подобрана экспериментально). Индукцию вели 1 ч при 20°C, затем переносили эксплантаты эктодермы в раствор Ниу-Твитти без индуктора, где культивировали 5 сут при 20°C. После этого ткани в эксплантатах фиксировали раствором Буэна (пикриновая кислота–формалин–уксусная кислота 15 : 5 : 1). Затем осуще-

ствляли стандартную гистологическую обработку тканей: заключали эксплантаты в парафин, изготавливали срезы толщиной 5 мкм и окрашивали их последовательно азокармином и смесью Маллори [25]. Препараты фотографировали с использованием светового микроскопа Leica Dialux EB 22.

Компьютерное моделирование пространственной структуры PEDF. Трехмерные пространственные модели конструировали на компьютере фирмы Silicon Graphics с использованием программы Sybyl 6.4 [26]. Выравнивание последовательностей проводилось по алгоритму Нидлмана–Ванша [27], который поддерживается модулем COMPOSER программы Sybyl 6.4. Значимость того или иного выравнивания определяли по значению критерия выравнивания (alignment score) и проверяли с помощью процедуры случайного перемешивания (jumbling). Построенная модель структуры PEDF быка включала 13 структурно консервативных областей, соединенных 12 петлями. Была произведена локальная коррекция областей стерических невыгодных контактов, затем 300 шагов минимизации энергии с использованием силового поля Tripos.

SDS-ПААГ-электрофорез белков проводили как описано в работе [28] с использованием линейных 15% гелей.

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд [29] с использованием в качестве стандарта бычьего сывороточного альбумина.

N-Концевое секвенирование белков выполняли на секвенаторе модели Applied Biosystems 477 (США) согласно инструкции производителя.

Авторы выражают благодарность за научную и техническую поддержку фирме Tripos Inc. и НИИ БМХ РАН.

Работа была поддержана Международным научно-техническим центром (проект № 463) и Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 97-04-49462).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Imaizumi M., Brietman T.R. // Eur. J. Haematol. 1987. V. 38. P. 289–302.
2. Brietman T.R., Selonic S.E., Collins S.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. P. 2936–2940.
3. McCarthy D.M., San Miguel J.F., Freake H.C. // Leuk. Res. 1983. V. 7. P. 51–55.
4. Костянян И.А., Астапова М.В., Старовойтова Е.В., Драницына С.М., Липкин В.М. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 243–248.
5. Костянян И.А., Астапова М.В., Наволоцкая Е.В., Лепихова Т.Н., Драницына С.М., Телегин Г.Б., Родионов И.Л., Байдакова Л.К., Золотарев Ю.А., Молотковская И.М., Липкин В.М. // Биоорган. химия. 2000. Т. 26. С. 505–511.
6. Steele F.R., Chader G.J., Johnson L.V., Tombran-Tink J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 1526–1530.

7. Tombran-Tink J., Chader G.J., Johnson L.V. // Exp. Eye Res. 1991. V. 53. P. 411–414.
8. Araki T., Taniwaki T., Becerra S.P., Chader G.J., Schwartz J.P. // J. Neurosci Res. 1998. V. 53. P. 7–15.
9. Taniwaki T., Hirashima N., Becerra S.P., Chader G.J., Etcheberrigaray R., Schwartz J.P. // J. Neurochem. 1997. V. 68. P. 26–32.
10. Bliak M.M., Corse A.M., Bliak S.R., Mohamed L., Tombran-Tink J., Kuncl R.W. // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1999. V. 58. P. 719–728.
11. Tombran-Tink J., Mazuruk K., Rodriguez I., Chung D., Linker T., Englander E., Chader G.J. // Mol. Vis. 1996. V. 2. P. 11.
12. Pignolo R.J., Cristofalo V.J., Rotenberg M.O. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 8949–8957.
13. Becerra S.P., Sagasti A., Spinella P., Notario V. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 25992–25999.
14. Stratikos E., Alberdi E., Gettins P.G., Becerra S.P. // Protein Science. 1996. V. 5. P. 2575–2582.
15. Драницына С.М., Костанян И.А., Андреева С.Г., Астапова М.В., Бабиченко И.И., Баева О.В., Богачук А.П., Молотковская И.М., Родионов И.Л., Смирнова Е.В., Липкин В.М. // Биоорган. химия. 2000. Т. 26. С. 340–351.
16. Baehner R.L., Nathan D.G. // J. Med. 1968. V. 278. P. 971–976.
17. Skinner R., Abrahams J., Whisstock J., Lesk A., Carrell R., Mardell M. // J. Mol. Biol. 1997. V. 266. P. 601–609.
18. Baumann U., Huber R., Bode W., Rosse D., Lesjak M., Laurell C. // J. Mol. Biol. 1991. V. 218. P. 595–606.
19. Beumann U., Bode W., Huber R., Travis J., Potempa J. // J. Mol. Biol. 1992. V. 226. P. 1207–1218.
20. Alberdi E., Hyde C.C., Becerra S.P. // Biochemistry. 1998. V. 37. P. 10643–10652.
21. Wu Y.-Q., Becerra S.P. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1996. V. 37. P. 1984–1993.
22. Родионова Л.Н., Заграничный В.Е., Родионов И.Л., Липкин В.М., Иванов В.Т. // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 933–948.
23. Nieuwkoop P.D., Faber L. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Amsterdam: North Holland, 1967.
24. Niu M.C., Twitty V.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1953. V. 39. P. 985–989.
25. Ромейс Б. Микроскопическая техника. М.: Изд-во иностранной литературы, 1953. С. 352.
26. Sybyl 6.4. Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144 USA.
27. Needleman S., Wunsch C. // J. Mol. Biol. 1970. V. 48. P. 443–453.
28. Laemmli W.N. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
29. Bradford M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.

The Biological Function of a Fragment of the Neurotrophic Factor from Pigment Epithelium: Structural and Functional Homology with the Differentiation Factor of the HL-60 Cell Line

**I. A. Kostanyan^{*,#}, S. S. Zhokhov^{*}, M. V. Astapova^{*}, S. M. Dranitsyna^{*},
A. P. Bogachuk^{*}, L. K. Baidakova^{**}, I. L. Rodionov^{**}, I. I. Baskin^{***},
O. N. Golubeva^{****}, J. Tombran-Tink^{*****}, and V. M. Lipkin^{*}**

^{*} Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

^{**} Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino Branch, Russian Academy of Sciences,
Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

^{***} Chemical Faculty, Moscow State University, Vorob'evy Gory, Moscow, 119899 Russia

^{****} Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^{*****} Center for Neuroscience Research, Children's National Medical Center and George Washington University,
Washington, DC, USA

It was shown that the full-size neurotrophic factor from pigment epithelium (PEDF) induces the cell differentiation of the human promyelocyte leukemia cell line HL-60. A structural analysis of PEDF revealed in its C-terminal region a six-membered peptide fragment PEDF-(352–357) (PEDF-6) whose sequence is highly homologous to the 41–46 fragment of the active site of the human leukocyte differentiation factor HLDF (HLDF-6). The biological effect of PEDF and synthetic peptides PEDF-6 and HLDF-6 on the HL-60 cells and the early gastrula ectoderm of *Xenopus laevis* embryos was studied. On the basis of the structural and functional homologies of HLDF, PEDF, and their homologous peptides and the computer models of the spatial structures of the full-size PEDF and the PEDF with the C-terminal fragment split off by the cleavage of the Leu³⁸⁰–Thr³⁸¹ bond in the serpin loop, a hypothesis on the functional role of the serpin loop in PEDF was put forward.

Key words: cell differentiation; cell differentiation factors; peptides, computer modeling

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 336-5511; fax: +7 (095) 310-7010;
e-mail: kost@ibch.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 8. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.