

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. М. М. ШЕМЯКИНА И Ю. А. ОВЧИННИКОВА**

На правах рукописи
УДК 577.112.6; 577.322.4

ЖОХОВ СЕРГЕЙ СЕРГЕЕВИЧ

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ
ГОМОЛОГИЧНЫХ ФРАГМЕНТОВ ФАКТОРОВ
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ P_{EDF} И H_{LDF}**

02.00.10 – Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

МОСКВА 2004

Работа выполнена в лаборатории белков гормональной регуляции
Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской Академии Наук.

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ: кандидат химических наук
Костанян Ирина Александровна

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ: член-корреспондент РАН,
доктор химических наук, проф.
Габибов Александр Габирович

доктор биологических наук
Башкатова Валентина Германовна

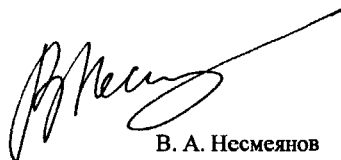
ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: Кафедра биоорганической химии
Биологического факультета
МГУ им. М.В. Ломоносова

Защита состоится 14 января 2004 г. в 10 часов на заседании
Специализированного совета Д 002.019.01 при Институте биоорганической
химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН по адресу:
117997 ГСП-7 Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С текстом диссертации можно ознакомиться в библиотеке Института
биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН.

Автореферат разослан "10" декабря 2003 г.

Ученый секретарь
специализированного совета,
доктор химических наук



В. А. Несмеянов

2003-А
20903

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

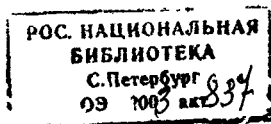
Актуальность проблемы

Одной из актуальных проблем современной биоорганической химии является поиск и структурно-функциональные исследования новых белковых факторов дифференцировки. Нарушение процессов нормального созревания клеток и их превращения в дифференцированные, функционально активные формы является ключевой стадией патогенеза многих злокачественных новообразований. Вещества, индуцирующие дифференцировку клеток, находят широкое применение в терапии опухолей как сами по себе, так и в сочетании с цитостатиками – агентами, вызывающими гибель делящихся клеток.

Как правило, белковые факторы дифференцировки представляют собой относительно крупные молекулы. Для многих из них помимо способности индуцировать дифференцировку клеток показано наличие целого ряда других биологических активностей. К таким многофункциональным факторам дифференцировки относятся факторы HLDF (Human Leukemia Differentiation Factor) и PEDF (Pigment Epithelium-Derived Factor).

Фактор HLDF с молекулярной массой 8,2 кДа, выделенный из культуральной среды промиелоцитарной лейкемической линии клеток человека HL-60, обработанных полностью-транс-ретиновой кислотой, ингибирует пролиферацию клеток данной линии и индуцирует их дифференцировку в зрелые гранулоциты, а также повышает выживаемость клеток этой линии при различных повреждающих воздействиях. Фактор PEDF с молекулярной массой 50,1 кДа, впервые выделенный из культуральной среды клеток пигментного эпителия сетчатки глаза человека, является фактором дифференцировки опухолевых клеточных линий нейронального происхождения и эмбриональных нейронов. Он также обладает нейропротекторным и антиангиогенным действием, является регулятором клеточного цикла и апоптоза. При сравнительном компьютерном анализе первичных структур факторов HLDF и PEDF были обнаружены гомологичные области молекул этих факторов; данная область молекулы фактора HLDF содержит фрагмент, отвечающий за его дифференцирующее и протекторное действие.

Установление взаимосвязи структурных особенностей белка и его функциональных характеристик имеет принципиальное значение для понимания молекулярных механизмов его функционирования. Перспективным подходом для



изучения белков с широким спектром активностей является исследование их коротких фрагментов, обладающих биологической активностью. Пептид TGENHR (HLDF-6) представляет собой фрагмент фактора HLDF, отвечающий за его дифференцирующую активность; пептид TQVENR (PEDF-6) – гомологичный ему фрагмент молекулы PEDF. Изучение сходств и различий функциональных свойств данных пептидов на ряде биологических объектов будет способствовать пониманию особенностей функционирования самих факторов, а также того, насколько структурное подобие фрагментов молекул обуславливает сходство функциональных характеристик.

Цели и задачи исследования

Цель настоящего исследования – сравнительное изучение функциональной роли гомологичных фрагментов молекул факторов HLDF и PEDF при их действии на различные биологические объекты.

Основные задачи исследования:

- идентификация гомологичных фрагментов факторов HLDF и PEDF;
- выяснение характерных особенностей дифференцирующего действия факторов HLDF и PEDF, а также их гомологичных фрагментов в виде индивидуальных пептидов, на опухолевые и эмбриональные ткани;
- изучение молекулярных механизмов действия гексапептидов HLDF-6 и PEDF-6, соответствующих по структуре гомологичным фрагментам HLDF и PEDF на клетки линии HL-60;
- *in vivo* и *in vitro* изучение протекторного действия пептидов HLDF-6 и PEDF-6, а также проявления нейропротекторного действия на уровне поведения животных.

Научная новизна

Идентифицированы гомологичные 18-членные области молекул факторов HLDF и PEDF, установлена их роль в дифференцирующем действии факторов как на клетки линии HL-60, так и на эктодерму эмбрионов *Xenopus laevis* на стадии ранней гастрюлы. Предположена регуляторная роль протеолиза пептидной связи ³⁸²L-³⁸³T в молекуле PEDF, в наибольшей степени подверженной действию сериновых протеиназ. Выяснена роль фактора PEDF в комплексном дифференцирующем действии белков стекловидного тела глаза на эмбриональную ткань. Изучен

характер взаимодействия пептидов HLDF-6 и PEDF-6 с клетками HL-60 и их влияние на биосинтез вторичных мессенжеров в этих клетках. Впервые показано нейропротекторное действие пептидов HLDF-6 и PEDF-6 на клетки Пуркинье червя мозжечка крыс при индуцированной гипоксии.

Практическая ценность результатов работы

В данной работе впервые показано дифференцирующее действие факторов HLDF, PEDF на опухолевые и эмбриональные ткани и участие в этом действии гомологичных аминокислотных последовательностей факторов. Это открывает возможности для применения белков, содержащих данные последовательности, при создании противоопухолевых препаратов, а также корректоров эмбрионального развития.

Результаты, полученные при исследовании нейропротекторного действия пептидов HLDF-6 и PEDF-6, открывают возможности создания препаратов для терапии ряда нейродегенеративных заболеваний.

Апробация работы

Материалы диссертации были доложены на II Биофизическом конгрессе (Москва, 1999); на международной конференции «Новые информационные технологии в медицине и экологии – 2000» (IT+ME'2000, Гурзуф, Украина 2000); на Международном симпозиуме FENS-2000, организованном Федерацией Международных Нейрологических Обществ (Брайтон, Великобритания); на III Съезде российского биохимического общества (Санкт-Петербург, 2002); на VI Чтениях, посвященных памяти академика Ю.А. Овчинникова (Москва – Пущино, 2002); на Российском симпозиуме по химии и биологии пептидов (Москва, 2003).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 142 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, результаты и обсуждение, экспериментальная часть (материалы и методы), выводы. Материал иллюстрирован 19 рисунками и 9 таблицами. Библиографический указатель содержит 182 цитированных работ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Идентификация гомологичных фрагментов молекул факторов HLDF и PEDF, отвечающих за их дифференцирующее действие на клетки HL-60 и эктодерму эмбрионов *Xenopus laevis* на стадии ранней гаструлы.

Фактор дифференцировки HLDF состоит из одной полипептидной цепи, содержащей 54 аминокислотных остатка. Как было показано ранее, он индуцирует дифференцировку клеток линии HL-60 в зрелые гранулоциты (Костанян И. и др., *Биоорг. химия*, 1995, 21, 243-248). Данная активность фактора обусловлена наличием в структуре молекулы шестичленного фрагмента ⁴¹TGENHR⁴⁶. Гексапептид с последовательностью TGENHR, получивший название HLDF-6, также способен индуцировать дифференцировку клеток HL-60.

Нами был проведен сравнительный компьютерный анализ первичной структуры фактора HLDF и других известных к настоящему времени факторов дифференцировки белковой природы. Согласно результатам анализа, молекула фактора PEDF содержит фрагмент, состоящий из 18 аминокислотных остатков, имеющий гомологию с фрагментом молекулы HLDF. Фактор PEDF имеет молекулярный вес 50,1 кДа и состоит из одной полипептидной цепи, содержащей 418 аминокислотных остатков. PEDF является многофункциональным фактором. Он индуцирует дифференцировку клеток нейробластомы и эмбриональных нейробластов в зрелые нейроны. Кроме того, было показано его нейропротекторное, ангиогенное действие и участие в регуляции клеточного цикла. Аминокислотная последовательность фактора PEDF представлена на рис. 1, а.

Гомологичные фрагменты факторов HLDF и PEDF показаны на рис. 1, б. Фрагмент фактора HLDF, представляющий собой С-концевую область молекулы, включает в себя фрагмент ⁴¹TGENHR⁴⁶, обеспечивающий дифференцирующую активность фактора на клетках линии HL-60. Гомологичный фрагмент фактора PEDF расположен в С-концевой части молекулы, функциональная роль которой к настоящему времени не установлена.

Наличие в молекуле PEDF фрагмента ³⁵⁴TQVENR³⁵⁹, гомологичного дифференцирующему фрагменту ⁴¹TGENHR⁴⁶ молекулы HLDF, явилось основанием

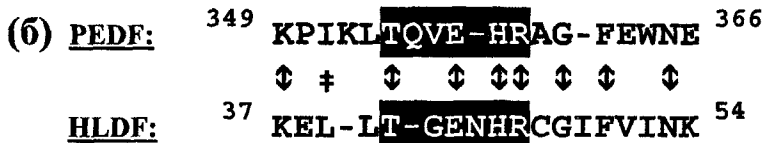
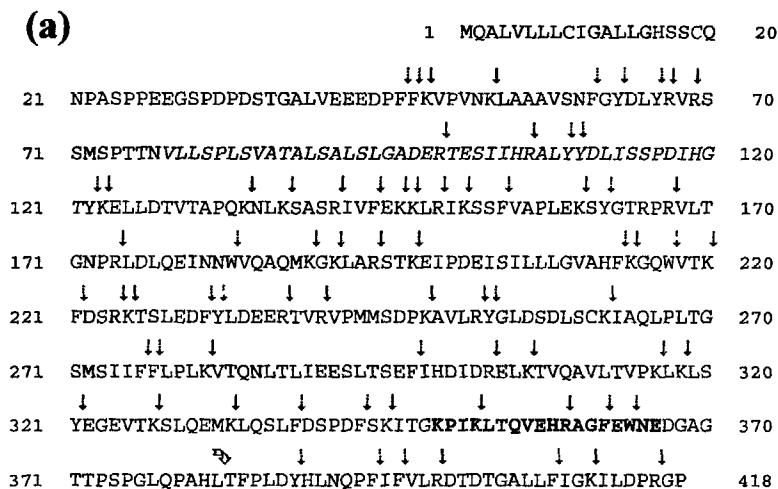


Рисунок 1. (а) Первичная структура фактора PЕDF человека.

Фрагмент, гомологичный области молекулы HLDF, выделен жирным шрифтом (остатки 349-366). Участок связывания с рецептором на клетках ретинобластомы и нейронах выделен курсивом (остатки 78-121).

☛ — пептидная связь $^{382}\text{L}-^{383}\text{T}$, в наибольшей степени подверженная действию сериновых протеиназ. С-концевой фрагмент молекулы, отщепляемый при протеолизе данной связи, подчеркнут (остатки 383-418).

↓ — пептидные связи, расщепляемые при исчерпывающем гидролизе трипсином.

↓ — пептидные связи, расщепляемые при исчерпывающем гидролизе химотрипсином.

(б) Гомологичные фрагменты молекул факторов PЕDF и HLDF.

↓ — идентичные аминокислотные остатки.

≠ — равноценная замена (лейцин-изолейцин).

Инверсным шрифтом выделен фрагмент молекулы HLDF, обеспечивающий его дифференцирующее действие, и соответствующий ему фрагмент молекулы PЕDF. Данные фрагменты представляют собой последовательности биологически активных пептидов HLDF-6 и PЕDF-6, соответственно.

для предположения, что фактор PEDF может индуцировать дифференцировку клеток линии HL-60, подобно HLDF. Результаты тестирования активности PEDF на клетках HL-60 методом NBT-теста свидетельствуют о том, что фактор действительно вызывает дифференцировку клеток этой линии. Его эффект проявляется во всех испытанных концентрациях от 10^{-10} до 10^{-6} М (Рис. 2, а).

Согласно высказанной нами гипотезе, действие фактора PEDF на эту клеточную линию должно быть обусловлено наличием в полипептидной цепи фрагмента $^{354}\text{TQVENHR}^{359}$. Для проверки этой гипотезы был проведен исчерпывающий гидролиз препарата PEDF смесью трипсина и химотрипсина (1:1). В дальнейшем полученный гидролизат был испытан в NBT-тесте на клетках HL-60. По данным анализа первичной структуры PEDF, ни одна из пептидных связей внутри фрагмента $^{354}\text{TQVENHR}^{359}$ не является сайтом действия данных протеиназ, и он должен присутствовать в гидролизате в составе семичленного пептида LTQVENHR (Рис. 1, а). В качестве отрицательного контроля в данном эксперименте использовались гидролизаты овальбумина и бычьего сывороточного альбумина (БСА). Как видно из рис. 2, б, гидролизат PEDF индуцирует дифференцировку клеток, гидролизаты двух других белков – не индуцируют. Следовательно, полученные результаты не исключают возможность, что действие PEDF на клетки HL-60 обеспечивается фрагментом $^{354}\text{TQVENHR}^{359}$.

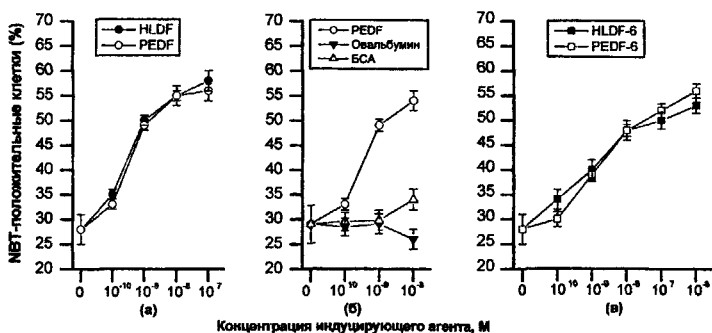


Рисунок 2. Изменение количества NBT-положительных клеток HL-60 при индукции их дифференцировки под действием: (а) факторов HLDF и PEDF; (б) гидролизатов фактора PEDF, овальбумина и БСА, полученных при исчерпывающем гидролизе смесью трипсина и химотрипсина (1:1); (в) гексапептидов TGENHR (HLDF-6) и TQVENHR (PEDF-6).

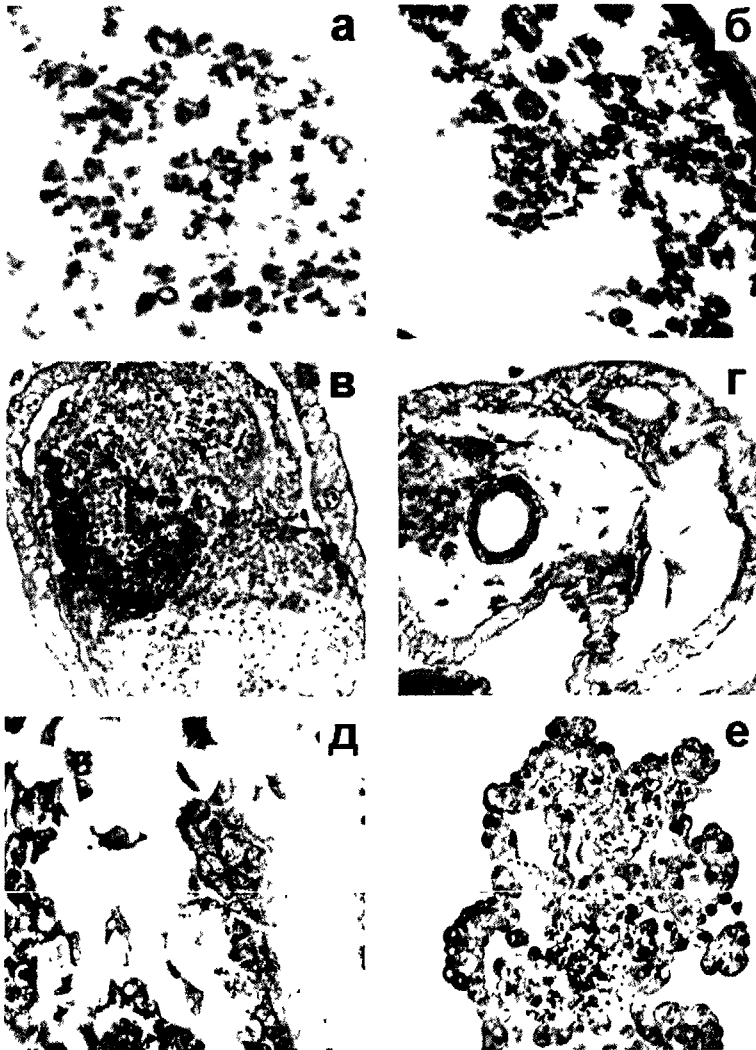


Рисунок 3. Гистологические срезы эксплантатов эктодермы эмбрионов *X. laevis*, подвергнутых действию (а) фактора HLDF; (б) пептида HLDF-6; (г, з) фактора PEDF; (д) пептида PEDF-6; (е) контрольные эксплантаты, не обработанные индуцирующими агентами. Срезы изготовляли через 5 суток после действия индуцирующих агентов

Для окончательного подтверждения данной гипотезы был синтезирован гексапептид со структурой TQVENR, получивший название PEDF-6. Методом NBT-теста показано сходство дифференцирующего действия гексапептидов HLDF-6 и PEDF-6 на клетки HL-60 (Рис. 2, в).

Ранее в нашей лаборатории были синтезированы 8 гомологов пептида HLDF-6 с различными точечными мутациями или делециями одного из аминокислотных остатков. Ни один из этих гомологов не обладает дифференцирующей активностью на клетках HL-60, за исключением пептида YGENHR, т.е., пептида HLDF-6 с заменой N-концевого треонина на тирозин (Костянян И. и др., *Биорг. химия*, 2000, 26, 505-511).

Изучено дифференцирующее действие факторов HLDF и PEDF, а также пептидов HLDF-6 и PEDF-6 на эктодерму эмбрионов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* на стадии ранней гаструлы (ЭРГ), на которой она наиболее восприимчива к действию различных индукторов дифференцировки. При наличии внешних индукционных воздействий эксплантаты ЭРГ могут дифференцироваться в различные ткани как эктодермального, так и мезодермального происхождения; при их отсутствии из эксплантатов ЭРГ формируется атипичный эпидермис. Фактор HLDF, как и пептид HLDF-6, вызывал образование в эктодерме клеток крови (Рис. 3, а, б). Фактор PEDF главным образом индуцировал формирование в ЭРГ морфологически очерченных нервных образований, а также небольшого количества клеток крови (Рис. 3, в, г). Пептид PEDF-6 вызывал образование только мезенхимы (Рис. 3, д). В контрольной группе эксплантатов, как и предполагалось, формировался атипичный эпидермис (рис. 3, е). Таким образом, если за индукционное воздействие фактора HLDF, приводящее к образованию в ЭРГ клеток крови, отвечает фрагмент молекулы $^{41}\text{TGENHR}^{46}$, то для индукционного действия PEDF, приводящего к образованию клеток крови, вероятно, необходима определенная конформация фрагмента $^{354}\text{TQVENR}^{359}$, которая существует в составе полноразмерной молекулы фактора, т.е., отличная от той, которую имеет пептид PEDF-6. В то же время за индукцию нервных образований, по-видимому, отвечает фрагмент молекулы PEDF $^{78}\text{V}^{121}\text{T}$, который, по литературным данным, обеспечивает действие фактора на клетки ретинобластомы (Alberdi E. et al., *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 31605-31612).

2. Сравнительное изучение протекторного действия пептидов HLDF-6 и PEDF-6 на нейроны червя мозжечка крыс и клетки линии HL-60 при индуцированной химической гипоксии.

Протекторное действие, заключающееся в поддержании жизнедеятельности и функциональной активности определенных типов клеток при целом ряде повреждающих воздействий, является функциональной особенностью факторов HLDF и PEDF. В данной работе исследовано протекторное действие пептидов HLDF-6 и PEDF-6 на клетки Пуркиньи червя мозжечка крыс (*in vivo*) и клетки HL-60 (*in vitro*) при химической гипоксии, индуцированной введением азидом натрия – агента, блокирующего ферменты дыхательной цепи митохондрий.

Червь мозжечка (*vermis cerebelli*) является областью головного мозга, участвующей в реализации целого ряда поведенческих реакций, в частности, формирования условного обстановочного страха, вкусового отвращения, неофобии, а также долговременного угашения акустической стартл-реакции (АСР), т.е., уменьшения выраженности реакции животных на внезапные звуковые стимулы (Supple W. et al., *Physiol. Behav.*, 1987, **39**, 579-586). При химической гипоксии червя в этом отделе увеличивается процент гиперхромных клеток Пуркиньи – клеток со сниженной функциональной активностью, имеющих интенсивную темную окраску на гистологических срезах. При совместном действии азидом натрия и одного из пептидов HLDF-6 или PEDF-6 количество гиперхромных клеток оказывается меньшим по сравнению с животными, обработанными только азидом натрия (Табл. 1). Таким образом, оба пептида способны в определенной степени поддерживать функционально активное состояние этих клеток в условиях гипоксии.

Изучено восстановительное действие пептидов на формирование у крыс условного обстановочного страха и долговременное угашение АСР – поведенческих реакций, нарушаемых при гипоксии червя. Проявление данных реакций оценивали по продолжительности периода полной неподвижности («замирания») крыс при помещении в экспериментальную камеру (т.е., при внезапной смене обстановки), а также давлению на платформу камеры при резком разгибании конечностей в ответ на генерируемые звуковые импульсы. В норме при повторных испытаниях (через 24 часа после первичных) период «замирания» удлиняется вследствие обстановочного страха, а амплитуда АСР снижается в результате долговременного угашения.

Таблица 1. Влияние пептидов HLDF-6 и PEDF-6 на количество гиперхромных клеток Пуркинье (%) на гистологических срезах червя мозжечка крыс при нанесении раствора азид натрия на этот отдел.

Агенты, наносимые на червь мозжечка	Количество гиперхромных клеток Пуркинье (%)
Азид натрия	63±3
Азид натрия + HLDF-6	42±4*
Азид натрия + PEDF-6	47±6*
Контроль	25±6

Азид натрия наносили в концентрации 10^{-3} М, пептиды HLDF-6 и PEDF-6 – в концентрации 10^{-4} М. Срезы изготавливали через 8 суток после нанесения на червь мозжечка животных указанных агентов. Приведены средние значения по группе из 8 животных.

* $p < 0,05$ – достоверное различие по сравнению с группой, обработанной азидом натрия.

Таблица 2. Влияние пептидов HLDF-6 и PEDF-6 на формирование условного обстановочного страха и долговременное угашение АСП у крыс при химической гипоксии, червя мозжечка, индуцированной азидом натрия.

Агенты, наносимые на червь мозжечка	Продолжительность периода полной неподвижности («замирания»), сек		Давление на платформу камеры при проявлении АСП (отн. ед.)	
	Первичные испытания	Повторные испытания	Первичные испытания	Повторные испытания
Азид натрия	77±18	94±20	492±58	509±56
Азид натрия+HLDF-6	87±10	137±13*	445±52	256±29*
Азид натрия+PEDF-6	83±16	129±17*	524±56	580±49
Контроль	68±12	123±21*	463±46	350±31*

Азид натрия наносили в концентрации 10^{-3} М, пептиды HLDF-6 и PEDF-6 – в концентрации 10^{-4} М. Первичные испытания проводились через 5 суток после инъекций указанных агентов, повторные испытания – через 24 часа после первичных. Приведены средние значения по группе из 8 животных. Данные по давлению на платформу камеры приведены к стандартной массе крысы – 250 г.

* $p < 0,05$ – достоверное различие по сравнению с соответствующим показателем в той же группе, полученным при первичных испытаниях.

У группы животных, на червь мозжечка которых наносили раствор азид натрия, ни формирования условного страха, ни долговременного угашения АСР не наблюдалось. Пептиды HLDF-6 и PEDF-6 восстанавливали формирование условного страха у таких животных до уровня контрольной группы, в то время как долговременное угашение АСР восстанавливал только пептид HLDF-6 (Табл. 2).

Также изучено влияние пептидов на выживаемость клеток HL-60 в условиях химической гипоксии, индуцированной азидом натрия. Количество жизнеспособных клеток в культуре определяли методом МТТ-теста (табл. 3). Под действием пептида HLDF-6 количество клеток, выживающих в условиях гипоксии, достоверно повышается, в то время как пептид PEDF-6 не оказывает влияния на выживаемость клеток.

По литературным данным известно, что азид натрия может вызывать как апоптотическую, так и некротическую гибель клеток. В концентрациях 150 мМ и выше он вызывает некроз. При концентрациях азид натрия порядка 1 мМ тип гибели клеток зависит от содержания в среде глюкозы: в ее присутствии клетки гибнут преимущественно по апоптотическому типу, в отсутствии глюкозы преобладает некроз (Bal-Price A., Brown G., *J. Neurochem.*, 2000, **75**, 1455-1464). Культуральная среда RPMI-1640, используемая нами для культивирования клеток HL-60, содержит глюкозу, поэтому в проведенных экспериментах большинство клеток, скорее всего, погибает вследствие апоптоза. Как отмечается в более ранней публикации Lotem J. и Sachs L. (*Blood*, 1992, **80**, 1750-1757), такие цитотоксические соединения, как азид натрия, винкристин, циклогексимид и др. вызывают апоптоз лейкемических клеток миелоидного ряда.

Таблица 3. Влияние пептидов HLDF-6 и PEDF-6 на выживаемость клеток линии HL-60 в условиях гипоксии, индуцированной азидом натрия (данные МТТ-теста).

Концентрация азид натрия	Количество жизнеспособных клеток (% от контроля)		
	Контроль	HLDF-6 (1 мкМ)	PEDF-6 (1 мкМ)
0 мкМ	100±2	105±5	97±3
10 мкМ	79±2	98±4*	82±4
30 мкМ	55±4	63±3*	54±2
100 мкМ	15±5	36±4*	18±3

* $p < 0,05$ – достоверное различие по сравнению с контролем при соответствующей концентрации азид натрия.

3. Изучение молекулярных механизмов действия пептидов HLDF-6 и PEDF-6 на клетки HL-60.

С целью детального исследования механизмов действия пептидов HLDF-6 и PEDF-6 мы изучили их влияние на некоторые системы, участвующие во внутриклеточной передаче информационного сигнала в клетках, в том числе, на системы биосинтеза вторичных мессенжеров. В качестве наиболее подходящего объекта для данных исследований были использованы клетки линии HL-60.

Методом радиолигандного связывания было установлено, что на поверхности клеток HL-60 не существует специфических рецепторов пептидов HLDF-6 и PEDF-6. Связывание пептидов с клетками наблюдалось при $+37^{\circ}\text{C}$, но не при 0°C . Полученные значения констант диссоциации составляли $\sim 10^{-3}$ М. Вследствие таких высоких значений констант диссоциации, а также большого числа мест связывания пептидов ($n \sim 10^{12}$ на одну клетку) мы предположили, что они неспецифически взаимодействуют с липидными компонентами клеточной мембраны, изменяя ее физико-химические свойства.

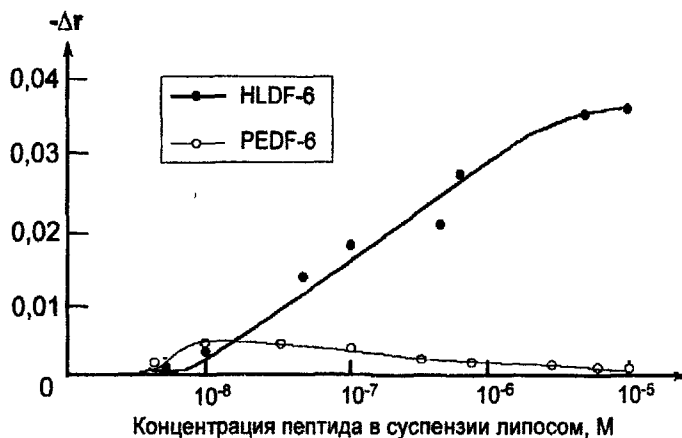


Рисунок 4. Влияние пептидов HLDF-6 и PEDF-6 на анизотропию поляризации флуоресценции зонда (3-антривинилфосфатидилхолина), встроенного в липосомы из 1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилхолина.

$-\Delta r$ – уменьшение анизотропии поляризации флуоресценции по сравнению с контролем (суспензией липосом, не содержащей пептида).

Взаимодействие пептидов HLDF-6 и PEDF-6 с липидными мембранами изучалось на модельной системе – липосомах из фосфатидилхолина, содержащих флуоресцентный зонд. Под действием пептида HLDF-6 наблюдалось уменьшение анизотропии поляризации флуоресценции зонда (рис. 4), что указывает на увеличение подвижности липидов в структуре липосомы. Предположительно, биологические эффекты данного пептида могут осуществляться путем разупорядочивания жидкокристаллической структуры липидного бислоя клеточной мембраны. Влияние пептида PEDF-6 на анизотропию флуоресценции незначительно, причем максимальный эффект наблюдался при концентрации пептида 10^{-8} М, в то время как максимальное дифференцирующее действие на клетки HL-60 пептид оказывает в концентрации 10^{-6} М (см. выше). Характер взаимодействия этого пептида с клетками к настоящему времени не выяснен. Не исключена возможность, что его эффекты реализуются с участием липидов другой природы, чем фосфатидилхолин.

При действии на клетки HL-60 большинства хорошо изученных факторов дифференцировки изменяется активность ферментов биосинтеза вторичных мессенжеров – аденилатциклазы и фосфатидилинозитол-специфической фосфолипазы C (Thomas G. et al., *Anticancer Res.*, 1986, 6, 857-860; Geny B. et al., *FEBS Lett.*, 1988, 233, 239-243). В настоящей работе исследовано влияние пептидов HLDF-6 и PEDF-6 на активность указанных ферментов.

Влияние пептидов на активность аденилатциклазы оценивали по изменению внутриклеточной концентрации цАМФ в клетках, инкубируемых с пептидом, по сравнению с контролем. Как видно из табл. 4, при действии пептида на клетки в среде культивирования RPMI-1640, содержащей 7% сыворотки теленка, пептид HLDF-6 оказывает ингибиторное влияние на аденилатциклазу, в то время как пептид PEDF-6 не проявляет значимого эффекта на ее активность.

При проведении исследований в среде RPMI-1640 без сыворотки пептид HLDF-6 также снижает активность аденилатциклазы, однако относительная величина эффекта в этом случае меньше, чем при наличии сыворотки (Табл. 4). Это, вероятно, свидетельствует о наличии одновременно двух ингибиторных эффектов пептида на аденилатциклазу, один из которых опосредован каким-либо компонентом сыворотки, скорее всего, интерлейкином 1, на связывание которого с клетками HL-60 влияет пептид HLDF-6 (Костянян И. и др., *Биорг. химия*, 2000, 26, 505-511).

Таблица 4. Изменение концентрации цАМФ в клетках HL-60 под действием пептидов HLDF-6 и PEDF-6.

Пептид	Количество цАМФ в образце (пМоль)	
	В среде RPMI-1640 + 7% сыворотки теленка	В среде RPMI-1640 без сыворотки *
HLDF-6 (1 мкМ)	4,54±0,29*	7,52±0,59*
PEDF-6 (1 мкМ)	6,61±0,23	8,29±0,68
Контроль	6,85±0,32	9,15±0,43

Исследуемые образцы содержали по 10^7 клеток HL-60. Время действия пептидов – 20 мин.

* $p < 0,05$ – достоверное различие по сравнению с контролем.

*При проведении исследований в среде без сыворотки клетки были предварительно промыты данной средой для удаления компонентов сыворотки, содержащихся в среде культивирования.

Таблица 5. Изменение активности аденилатциклазы в выделенных мембранах клеток линии HL-60 под действием пептида HLDF-6 в присутствии агентов, влияющих на активность данного фермента.

Используемый препарат мембран; модифицирующие агенты		Активность аденилатциклазы, пМоль цАМФ/(мин×мг белка)	
		Контроль	HLDF-6 (1 мкМ)
Мембраны клеток HL-60	–	1,44±0,06	1,20±0,07*
	Форсколин (1 мкМ)	3,25±0,14	3,32±0,16
	β,γ-имидо-ГТФ (10 мкМ)	1,49±0,09	1,30±0,04*
	Морфин (10 мкМ)	1,29±0,08	1,06±0,03*
Мембраны, солубилизированные CHAPS (10 мкМ)		3,08±0,19	2,97±0,10
Мембраны хронически морфинизированных клеток HL-60*		4,01±0,20	3,52±0,11*

*При хронической морфинизации клетки в течение 24 часов культивировали в среде, содержащей 1 мкМ морфина, затем проводили выделение мембран.

* $p < 0,05$ – достоверное различие по сравнению с соответствующим контролем.

Активность аденилатциклазы в препарате выделенных мембран клеток HL-60 также снижается под влиянием пептида HLDF-6. В присутствии форсколина эффект пептида на данном препарате не наблюдается, однако он сохраняется в присутствии негидролизуемого аналога ГТФ – β, γ -имидо-ГТФ (Табл. 5). Полученные данные позволили предположить, что мишенью действия пептида в аденилатциклазной системе является G-белок; вероятнее всего, усиливается взаимодействие каталитической субъединицы аденилатциклазы с белками класса G_i , ингибирующими активность аденилатциклазы. Поскольку пептид увеличивает подвижность липидов в мембране, вероятно, его эффект на аденилатциклазу связан с повышением подвижности α -субъединицы G_i -белка, которая пальмитилирована и локализована на поверхности плазматической мембраны (Duncan J., Gilman A., *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 23594-23600). Согласно Gudi S. et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 2515-2519), активация G-белков, связанных с мембраной, может происходить в отсутствие рецептора при уменьшении степени упорядоченности жидкокристаллической структуры липидного бислоя, возникающем при механическом стрессе. В пользу нашего предположения об активации G-белка путем изменения подвижности мембранных липидов под действием пептида HLDF-6 говорит и тот факт, что эффект пептида на аденилатциклазу в препарате мембран клеток HL-60, солюбилизированных детергентом CHAPS, не проявляется (табл. 5).

Согласно литературным данным, ингибиторное действие G_i -белков на аденилатциклазу не проявляется в присутствии активированных стимуляторных G-белков (класса G_s) и форсколина, что объясняется неустойчивостью четырехкомпонентного комплекса G_i -аденилатциклаза-форсколин- G_s (Dessauer C. et al., *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 28823-28829). Таким образом, ингибиторный эффект пептида HLDF-6, который проявляется на фоне базальной активации аденилатциклазы G_s -белками, в присутствии форсколина не наблюдается.

G_i -белки принимают участие в «суперактивации» аденилатциклазы, характерной для состояния физической зависимости от наркотиков. Во многих типах клеток, таких как нейробластома, лимфома, адипоциты и др. при однократной кратковременной обработке морфином (острой морфинизации) наблюдается снижение уровня синтезируемого цАМФ, в то время как при длительной обработке (хронической морфинизации) уровень цАМФ оказывается повышенным по сравнению с контролем. Такое повышение получило название «суперактивации» аденилатциклазы. Для развития «суперактивации» необходимо наличие в клетках μ -

опиоидных рецепторов и G_i -белков; это явление блокируется коклопным токсином, нарушающим функционирование G_i -белков (Avidor-Reiss T. et al., *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 5040-5047).

Исследовано влияние пептида HLDF-6 на активность аденилатциклазы в препарате мембран клеток HL-60 при острой (в присутствии 10 мкМ морфина) и хронической морфинизации. В обоих случаях активность аденилатциклазы под действием пептида снижается (Табл. 5). Таким образом, при действии пептида «суперактивация» аденилатциклазы при хронической морфинизации проявляется в меньшей степени, чем при его отсутствии. Поскольку «суперактивация» аденилатциклазы является одним из проявлений состояния физической зависимости от наркотиков, можно предположить, что ингибирование активности этого фермента пептидом HLDF-6 является одним из механизмов снятия этим пептидом состояния физической зависимости от морфина, которое было ранее продемонстрировано *in vivo* на крысах (Литвинова С. и др., *Бюлл. эксп. биол. и мед.*, 2003, 135, 155-157).

В работе проведено изучение влияния пептидов HLDF-6 и PEDF-6 на активность фосфатидилинозитол-специфической фосфолипазы С в клетках HL-60. Активность этого фермента определяли по изменению концентрации радиоактивно меченых инозитолмоно- и дифосфатов в клетках, культивируемых в присутствии меченого иноzitола в течение 24 часов до действия пептидов. Результаты представлены в табл. 6. При действии пептидов наблюдалась некоторая тенденция к понижению активности фосфолипазы С, однако различия с контролем не достигали уровня статистической достоверности.

Для лучшей визуализации эффектов пептидов была проведена стимуляция фосфолипазы С тетрафторидом алюминия. В присутствии этого агента наблюдалось заметное снижение активности фосфолипазы С под действием пептида PEDF-6, в то время как пептид HLDF-6 не проявлял эффекта (Табл. 6).

Известно, что тетрафторид алюминия активирует фосфатидилинозитол-специфическую фосфолипазу $C\beta$ посредством стимуляции G_q -белков (Yan Y. et al., *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 11924-11927). Поэтому пептид PEDF-6, вероятнее всего, оказывает ингибирующее действие через белки именно этого класса либо путем непосредственного увеличения их ГТФазной активности, либо усиливая взаимодействие $G\alpha_q$ -субъединицы с каким-либо белком семейства RGS (regulator of G-protein signaling), по-видимому, белком RGS4. Большинство известных белков

семейства RGS повышают ГТФазную активность G-белков, ускоряя их переход из активного состояния в неактивное за счет стабилизации конформации $G\alpha$ -субъединицы, при которой происходит гидролиз ГТФ. Белок RGS4 усиливает ГТФазную активность G_q -белков, взаимодействуя с участком $G\alpha_q$ -субъединицы, где происходят конформационные перестройки при переходе из ГДФ- в ГТФ-связанное состояние (Sterne-Matt R. et al., *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 6050-6058). В присутствии тетрафторида алюминия средство RGS4 к $G\alpha_q$ -субъединице значительно повышается. Таким образом, этот белок ингибирует стимуляцию тетрафторидом фосфолипазы $C\beta$; при его суперэкспрессии стимуляции $PLC\beta$ этим агентом вообще не происходит. Возможно, пептид PEDF-6 каким-то образом способствует взаимодействию $G\alpha_q$ и RGS4.

Таблица 6. Изменение концентрации радиоактивно меченых инозитолмоно- и дифосфатов в клетках HL-60 под действием пептидов HLDF-6 и PEDF-6.

Концентрация пептида	Включение [3H]-инозитола в инозитолмоно- и дифосфаты, % от контроля			
	Без стимуляции AlF_4^-		При стимуляции AlF_4^-	
	HLDF-6	PEDF-6	HLDF-6	PEDF-6
Контроль	100,0±2,8%		126,1±6,7%	
10^{-7} М	97,2±7,7%	101,1±1,9%	128,3±8,1%	116,6±5,6%
10^{-6} М	92,5±2,5%	93,3±6,6%	124,4±5,8%	114,6±2,8%*
10^{-5} М	94,8±4,3%	91,0±6,1%	125,6±5,2%	99,5±6,7%*

* $p < 0,05$ – достоверное различие по сравнению с контролем при стимуляции тетрафторидом алюминия.

4. Компьютерное моделирование пространственной структуры молекулы PEDF. Регуляторная роль протеолиза связи ^{382}L - ^{383}T в молекуле PEDF.

Многофункциональность фактора PEDF обусловлена наличием в молекуле, существующей в нативной конформации, одновременно нескольких активных центров, одним из которых является, как сказано выше, фрагмент $^{354}TQVEHR$ 359 , соответствующий пептиду PEDF-6. В данной части работы с помощью

компьютерного моделирования пространственной структуры молекулы PEDF показано положение этого фрагмента на поверхности белковой глобулы, а также предложен один из механизмов регуляции активности фактора, реализуемый, возможно, в живых организмах *in vivo*.

Фактор PEDF на основании особенностей первичной и пространственной структуры был отнесен к семейству серпинов – ингибиторов сериновых протеиназ (SERPIN – SERine Protease INhibitor), однако ингибиторным действием на сериновые протеиназы он не обладает (Steele F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**, 1526-1530). Подобно другим белкам семейства серпинов, молекула PEDF имеет глобулярную структуру с выступающей наружу петлей – так называемой «серпиновой петлей». В ее центральной части содержится пептидная связь $^{382}\text{L}-^{383}\text{T}$, в наибольшей степени подверженная гидролитическому действию целого ряда сериновых протеиназ (Весегга S. et al., *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 25992-25999). Функциональная значимость протеолиза молекулы по этой связи до настоящего времени оставалась невыясненной.

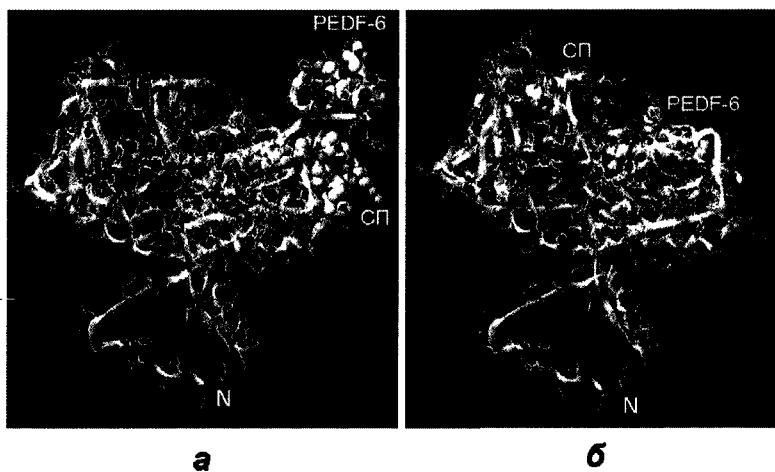


Рисунок 5. Компьютерные модели пространственной структуры полноразмерной молекулы PEDF человека (а) и «неполной» молекулы PEDF ($^1\text{M}-^{382}\text{L}$), образующейся при ограниченном протеолизе молекулы по связи $^{382}\text{L}-^{383}\text{T}$ (б). PEDF-6 – фрагмент $^{354}\text{TQVENR}^{359}$, соответствующий пептиду PEDF-6; СП – «серпиновая петля», содержащая связь $^{382}\text{L}-^{383}\text{T}$; N – N-концевой фрагмент молекулы, экспонированный из белковой глобулы

Согласно нашим наблюдениям, фактор PEDF, находящийся в водном растворе, в ходе нескольких последовательных процедур замораживания и оттаивания препарата постепенно утрачивает дифференцирующую активность на клетках HL-60 и ЭРГ *X. laevis*. После 20 циклов замораживания и оттаивания активность на обоих типах клеток исчезает полностью. Анализ инактивированного таким образом препарата PEDF методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле показал, что вместо полосы с молекулярной массой 50 кДа, соответствующей PEDF, появляется полоса, соответствующая белку с молекулярной массой 46 кДа. Это указывает на то, что при многократном замораживании и оттаивании препарата PEDF происходит ограниченный протеолиз молекулы. Анализ N-концевой аминокислотной последовательности данного препарата PEDF выявил только последовательность TPLDYHLNQPFFIVLRD..., идентичную первичной структуре фрагмента ³⁸³T-⁴¹⁸R молекулы PEDF; в то же время известно, что на N-конце секретлируемой формы PEDF находится остаток пироглутаминовой кислоты (Petersen S. et al., *Biochem. J.*, 2003, **374**, 199-206). Появление данной последовательности свидетельствует о том, что в результате многократного замораживания и оттаивания препарата PEDF происходит единственный разрыв полипептидной цепи по упомянутой выше связи ³⁸²L-³⁸³T. При отщеплении от C-концевой части молекулы фрагмента ³⁸³T-⁴¹⁸R молекулярный вес молекулы уменьшается примерно на 4 кДа, что наблюдается при анализе данного препарата методом SDS-электрофореза.

Ранее с помощью метода кругового дихроизма было показано, что протеолиз связи ³⁸²L-³⁸³T в рекомбинантном PEDF приводит к некоторому изменению общей эллиптичности, что свидетельствует о конформационных перестройках молекулы (Stratikos E. et al., *Protein Science*, 1996, **5**, 2575-2582). Мы предположили, что перестройки затрагивают C-концевую область молекулы, расположенную вблизи «серпниновой петли»; именно в этой области расположен фрагмент ³⁵⁴TQVEHR³⁵⁹.

С целью проверки этого предположения была сконструирована компьютерная модель пространственной структуры молекулы полноразмерного PEDF, а также «неполной» молекулы PEDF (¹M-³⁸²L) (Рис. 5). Модель структуры полноразмерного PEDF сконструирована на основе гомологии первичной структуры PEDF и трех белков семейства серпинов с пространственной структурой, установленной методом рентгеноструктурного анализа. Модель структуры «неполной» молекулы PEDF (¹M-³⁸²L) строилась по гомологиям с этими же белками, укороченными в результате протеолиза соответствующих связей в их серпниновых петлях. Обе модели хорошо

согласуются с подобной моделью пространственной структуры полноразмерной молекулы PEDF, представленной в публикации Alberdi E. et al. (*Biochemistry*, 1998, 37, 10643-10652). В частности, в ней так же, как и в построенных нами моделях, остатки ^{134}K , ^{137}K , ^{141}R , ^{149}R , ^{189}K , ^{191}K , ^{212}H , ^{214}K , участвующие в образовании гликозаминогликан-связывающего кластера, сближены друг с другом.

Согласно представленной нами модели, в полноразмерной молекуле PEDF помимо «серпиновой петли» из глобулы экспонирована еще одна петля, состоящая из 24 аминокислотных остатков ^{343}F - ^{366}E . Эта петля полностью включает в себя область молекулы ^{349}K - ^{366}E , гомологичную С-концевому участку молекулы HLDF, поэтому она получила название «HLDF-подобной петли». В середине этой петли расположен фрагмент $^{354}\text{TQVEHR}$ - 359 (Рис. 5, а). В пространственной структуре «неполной» молекулы PEDF (^1M - ^{382}L) эта петля отсутствует, а указанный фрагмент расположен внутри глобулы и, следовательно, не может оказывать дифференцирующее действие на клетки (Рис. 5, б). Таким образом, конформационные перестройки молекулы PEDF при протеолизе связи ^{382}L - ^{383}T являются причиной потери активности фактора на изученных нами объектах.

В данной работе впервые показана регуляторная роль протеолиза связи ^{382}L - ^{383}T в «серпиновой петле» молекулы PEDF. Аминокислотные остатки, входящие в состав фрагмента ^{383}T - ^{418}P , отделяемого при протеолизе данной связи, участвуют в поддержании нативной конформации молекулы. Действительно, согласно данным Shao H. et al. (*Eur. J. Biochem.*, 2003, 270, 822-831), при точечных мутациях отдельных остатков фрагмента ^{383}T - ^{418}P нарушается секреция PEDF из клеток-продуцентов вследствие измененной конформации молекулы.

На основании результатов экспериментов на ЭРГ *X. laevis* (см. выше), можно сказать, что «HLDF-подобная петля» PEDF, содержащая фрагмент $^{354}\text{TQVEHR}$ - 359 , выполняет двойную роль при индукционном действии фактора на эмбриональную ткань: с одной стороны, данный фрагмент индуцирует образование клеток крови, с другой стороны – остатки, входящие в состав петли, выполняют вспомогательную роль при индукции нервных тканей под действием фрагмента молекулы ^{78}V - ^{121}T . Взаимодействие PEDF с ЭРГ имеет более сложный характер, чем в случае опухолевых клеток, поскольку в составе ЭРГ имеются клетки, находящиеся на разных стадиях развития. Возможно, расщепление связи ^{382}L - ^{383}T в молекуле PEDF является одним из регуляторных механизмов, обеспечивающим проявление качественно разных активностей PEDF на клетках, находящихся на разных стадиях.

5. Роль фактора PEDF в индукционном действии стекловидного тела глаза быка на эктодерму эмбрионов *Xenopus laevis*.

Фактор PEDF экспрессируется в большинстве тканей млекопитающих и птиц. Для выделения природного биологически активного PEDF в большинстве случаев используются среды, наиболее богатые этим фактором – культуральная среда клеток пигментного эпителия и стекловидное тело глаза.

Стекловидное тело, ввиду многообразия содержащихся в нем белковых факторов, оказывает целый комплекс индукционных воздействий на ЭРГ *X. laevis*. Под его влиянием в эксплантатах возникают, главным образом, нервные ткани и различные ткани мезодермального происхождения (поперечнополосатые мышцы, клетки крови и мезенхимы). Мы показали, что препарат очищенного фактора PEDF оказывает два типа индукционных воздействий на ЭРГ – вызывает главным образом формирование нервных образований и небольшого количества клеток крови. Представляло интерес выяснение роли фактора PEDF в нейрониндукционной активности стекловидного тела: является ли он основным белком, вызывающим индукцию нейрональных тканей, или же их образование определяется также наличием в составе стекловидного тела других белков.

Известно, что гомология первичных структур PEDF человека и быка составляет 88,6%. Это дало нам возможность использовать поликлональные кроличьи антитела, специфические к PEDF человека, для блокирования PEDF в составе стекловидного тела быка. Препарат очищенных антител использовали в разведениях 1:1000 и 1:3000 (концентрация белка в исходном препарате – 50 мг/мл). Предварительно было показано, что данные антитела не обладают собственным индукционным действием на ЭРГ.

В присутствии антител индукция нервных образований под действием стекловидного тела не наблюдалась (Табл. 7). В то же время происходило усиление индукции тканей мезодермального происхождения (поперечнополосатых мышц, клеток крови и мезенхимы): количество клеток данных типов на гистологических срезах эксплантатов, обработанных стекловидным телом в присутствии антител, было значительно большим.

Таблица 7. Клеточные типы, образующиеся в explantataх ЭРГ *X. laevis* под действием стекловидного тела глаза быка. Влияние поликлональных специфических антител против PEDF на индукционное действие стекловидного тела.

Индуктор дифференцировки	Общее число explantatov	Число explantatov, содержащих данные типы тканей			
		Нервные ткани	Ткани мезодермального происхождения		
			мезенхима	поперечно-полосатые мышцы	клетки крови
Стекловидное тело (контроль)	15	12	15	13	7
Стекловидное тело + антитела (1:1000)*	11	0	11	11	6
Стекловидное тело + антитела (1:3000)*	12	0	12	11	5

* Препарат очищенных антител использовали в разведении 1:1000 или 1:3000. Концентрация белка в исходном препарате – 50 мг/мл.

Следовательно, PEDF является единственным фактором в составе стекловидного тела, индуцирующим образование в ЭРГ нервных тканей. Усиление индукции образования тканей мезодермального происхождения при блокировании действия PEDF происходит, вероятно, потому, что присутствующие в стекловидном теле мезодермализующие факторы конкурируют с PEDF связывание с клетками ЭРГ.

Существует ряд врожденных зрительных патологий, при которых наблюдается избыточное образование кровеносных сосудов в сетчатке и их врастание в стекловидное тело, такие как диабетическая ретинопатия и ретинопатия недоношенных детей. В стекловидном теле пациентов, страдающих этими патологиями, отмечается значительное снижение уровня PEDF (Tombran-Tink J., Barnstable C., *Trends Mol. Med.*, 2003, 6, 244-250). Известно, что эндотелиальные клетки, формирующие кровеносные сосуды, имеют мезодермальное происхождение в эмбриогенезе. Поскольку при блокировании действия PEDF в стекловидном теле с помощью антител происходит усиление индукции мезодермальной дифференцировки эмбриональной ткани, то, очевидно, при снижении уровня PEDF в стекловидном теле эмбриона происходит усиленная индукция образования эндотелиальных клеток в прилежащих тканях, прежде всего, в сетчатке. Это, в свою очередь, ведет к аномальному разрастанию сосудов и, следовательно, к нарушениям зрения.

ВЫВОДЫ:

1. Идентифицированы гомологичные фрагменты молекул факторов дифференцировки HLDF и PEDF. Показано, что данные фрагменты отвечают за дифференцирующее действие факторов на клетки линии HL-60 и эктодерму эмбрионов *Xenopus laevis* на стадии ранней гаструлы.

2. Установлено протекторное действие гомологичных гексапептидов TGENHR (HLDF-6) и TQVENR (PEDF-6) на клетки Пуркинью червя мозжечка крыс при индуцированной химической гипоксии. Показано восстановление под действием данных пептидов поведенческих реакций крыс, нарушаемых при гипоксии червя мозжечка *in vivo*.

3. Показано, что пептид TGENHR увеличивает количество клеток линии HL-60, жизнеспособных в условиях индуцированной химической гипоксии, в то время как пептид TQVENR не обладает подобным действием.

4. Установлено различное действие пептидов TGENHR и TQVENR на системы биосинтеза вторичных мессенжеров в клетках HL-60. Пептид TGENHR ингибирует активность аденилатциклазы, пептид TQVENR понижает активность фосфатидилинозитол-специфической фосфолипазы C при ее стимуляции тетрафторидом алюминия.

5. С помощью компьютерного моделирования пространственной структуры молекулы PEDF показана локализация фрагмента $^{354}\text{TQVENR}^{359}$, отвечающего за действие фактора на клетки линии HL-60. Предположена регуляторная роль протеолиза связи $^{382}\text{L}-^{383}\text{T}$ в молекуле PEDF.

6. Установлено, что PEDF является единственным фактором в составе стекловидного тела глаза, вызывающим индукцию нервных образований в эмбриональной ткани.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Костянян И.А., Жохов С.С., Астапова М.В., Драницына С.М., Богачук А.П., Байдакова Л.К., Родионов И.Л., Баскин И.И., Голубева О.Н., Томбран-Тинк Дж., Липкин В.М. Биологическая роль фрагмента нейротрофного фактора из пигментного эпителия: структурно-функциональная гомология с фактором дифференцировки клеток линии HL-60. Биоорганическая химия, 2000, т. 26, стр. 563-570.

2. Голубева О.Н., Костянян И.А., Жохов С.С., Томбран-Тинк Дж., Липкин В.М. Роль нейротрофного фактора дифференцировки из пигментного эпителия в индукционной активности стекловидного тела. Доклады Академии Наук, 2001, т. 376, стр. 407-410.

3. Костянян И.А., Жохов С.С., Астапова М.В., Баскин И.И., Голубева О.Н., Липкин В.М., Томбран-Тинк Дж. Регуляторная роль С-концевого фрагмента PEDF. Тезисы II Биофизического конгресса, Москва, 23-27 августа 1999 года. Москва, 1999, т. 1, стр. 43.

4. Костянян И.А., Жохов С.С., Астапова М.В., Драницына С.М., Богачук А.П., Байдакова Л.К., Родионов И.Л., Баскин И.И., Голубева О.Н., Томбран-Тинк Дж., Липкин В.М. Биологическая роль фрагмента нейротрофного фактора из пигментного эпителия: структурно-функциональная гомология с фактором дифференцировки клеток линии HL-60. Тезисы международной конференции "Новые информационные технологии в медицине и экологии - 2000 (IT+ME'2000)", Украина, Крым, Гурзуф, 1-10 июня 2000 года, стр. 72.

5. Kostanyan I.A., Zhochov S.S., Astapova M.V., Bogachuk A.P., Lipkin V.M., Baskin I.I., Golubeva O.N., Tombran-Tink J. The structural and functional homology between PEDF and HLDF. The regulatory role of serpin loop in PEDF function. European Journal of Neuroscience, 2000, Vol. 12, Supplement 11, p. 329.

6. Жохов С.С., Артамонов И.Д., Костянян И.А., Астапова М.В., Баскин И.И., Голубева О.Н., Липкин В.М. Функциональная роль «HLDF-подобной петли» нейротрофного фактора дифференцировки PEDF. Тезисы научных докладов, III Съезд Биохимического Общества, Санкт-Петербург, 26 июня – 1 июля 2002 года, стр. 373.

7. Костанян И.А., Жохов С.С., Астапова М.В., Молотковская И.М., Сторожева З.И., Прошин А.Т., Липкин В.М. Сравнительное изучение молекулярных механизмов действия гомологичных гексапептидов HLDF-6 и PEDF-6. Тезисы научных докладов, III Съезд Биохимического Общества, Санкт-Петербург, 26 июня – 1 июля 2002 года, стр. 547.

8. Жохов С.С., Костанян И.А., Астапова М.В., Артамонов И.Д., Голубева О.Н., Баскин И.И., Сторожева З.И., Липкин В.М. Факторы дифференцировки HLDF и PEDF человека. Механизмы биологического действия гомологичных гексапептидов TGENHR и TQVENR. Тезисы докладов VI чтений, посвященных памяти академика Ю.А. Овчинникова, Москва – Пушкино, 25 ноября – 2 декабря 2002 года, стр. 57.

9. Жохов С.С., Костанян И.А., Гибанова Н.В., Сурина Е.А., Сторожева З.И., Прошин А.Т., Липкин В.М. Гомологичные гексапептиды HLDF-6 и PEDF-6, обладающие дифференцирующим и нейропротекторным действием. Тезисы докладов Российского симпозиума по химии и биологии пептидов, Москва, 17-19 ноября 2003 г., стр. 22.

№20903

2003-A

20903

Подписано в печать 05.12.2003
Формат 60×88 1/16. Объем 1.5 п.л.
Тираж 75 экз. Заказ №114
Отпечатано в ООО «Соцветие красок»
119992 г.Москва, Ленинские горы, д.1
Главное здание МГУ, к.102