



УДК 577.112.017:581.143.24

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЙ ФРАГМЕНТ ФАКТОРА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК ЛИНИИ HL-60. ИДЕНТИФИКАЦИЯ И СВОЙСТВА

© 2000 г. И. А. Костянян[#], М. В. Астапова, Е. В. Наволоцкая*, Т. Н. Лепихова*,
С. М. Драницына, Г. Б. Телегин*, И. Л. Родионов*, Л. К. Байдакова*,
Ю. А. Золотарев**, И. М. Молотковская, В. М. Липкин

*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;*

**Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН;*

***Институт молекулярной генетики РАН, Москва*

Поступила в редакцию 15.02.2000 г. Принята к печати 16.03.2000 г.

В процессе изучения фактора дифференцировки HLDF, выделенного из культуральной среды клеток линии HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека, обработанных ретиноевой кислотой, идентифицирован шестичленный фрагмент TGENHR (HLDF-6), сохраняющий способность полноразмерного фактора вызывать дифференцировку и останавливать пролиферацию исходных клеток. Показано, что синтетический пептид HLDF-6 не имеет специфических рецепторов на поверхности клеток HL-60, однако он влияет на связывание клеточной поверхностью интерлейкина IL-1 β – цитокина, участвующего в процессах пролиферации. Обнаружена противоопухолевая активность пептида HLDF-6 на модели переливаемой миеломы NSO.

Ключевые слова: фактор дифференцировки клеток, биологически активный фрагмент; пептид; клеточная линия HL-60.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в связи с резким ростом числа онкологических заболеваний, с одной стороны, и ограниченностью эффективных терапевтических средств их лечения – с другой, особую значимость приобретают исследования, направленные на поиск эндогенных биорегуляторов, способных останавливать рост и метастазирование раковых опухолей.

Поскольку патогенез многих злокачественных новообразований связан с нарушениями процесса дифференцировки, в последнее время пристальное внимание исследователей приковано к препаратам, индуцирующим клеточную дифференцировку. Факторы дифференцировки белковой природы и, особенно, их биологически активные пептидные фрагменты могут оказаться чрезвычайно перспективными в терапии рака как самостоятельное средство или как дополнение к цитостатическим препаратам, убивающим делящиеся клетки.

Один из таких многообещающих белков – фактор дифференцировки HLDF (Human Leukemia Differentiation Factor), небольшой белок с M 8.2 кДа, выделенный нами из среды культивирования клеток промиелоцитарного лейкоза человека HL-60, обработанных *полностью-транс*-ретиноевой кислотой, и индуцирующий дифференцировку исходных клеток по гранулоцитарному пути [1]. Данная работа посвящена идентификации биологически активного фрагмента этого фактора и изучению свойств его синтетического аналога.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее при компьютерном поиске в банке данных EMBL было обнаружено, что последовательность кДНК фактора дифференцировки имеет значительную гомологию (95%) с последовательностью кДНК рибосомного белка S21 человека. Однако при этом гомология первичных структур зрелых белков отсутствует, поскольку в кДНК предшественника HLDF в отличие от кДНК S21 имеются делеции двух нуклеотидов: G – в положении 112 и C – в положении 224. В результате этих точечных делеций зрелый фактор дифференцировки и рибосомный белок S21 являются продуктами трансляции с разных рамок считывания [2].

Сокращения: HLDF – фактор дифференцировки клеток промиелоцитарного лейкоза человека линии HL-60; Dns – дансил; NBT – нитроголубой тетразолий.

[#]Автор для переписки (тел.: (095) 336-55-11; факс: (095) 310-70-10; e-mail: kost@ibch.ru).

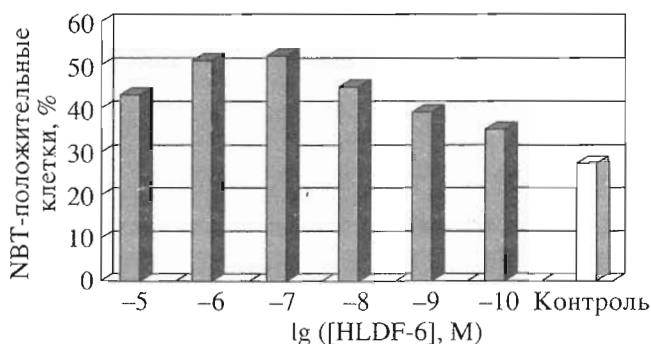


Рис. 1. Влияние пептида HLDF-6 на дифференцировку клеток линии промиелоцитарного лейкоза человека HL-60. Контроль – недифференцированные клетки.

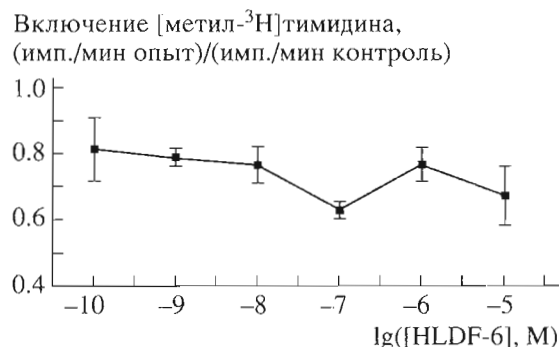


Рис. 2. Влияние пептида HLDF-6 на рост клеток HL-60. Включение [метил-³H]тимидина в контроле составило 34430 ± 1443 имп./мин. Приведены значения трех независимых экспериментов \pm S.E.M.

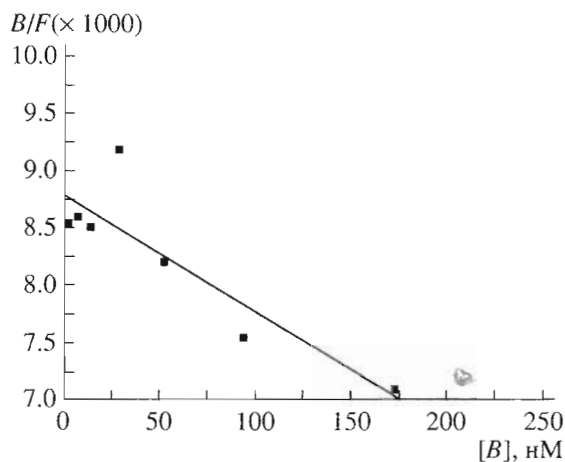


Рис. 3. Анализ в координатах Скэтчарда специфического связывания пептида [³H]HLDF-6 с клетками HL-60 при 37°C. *B* и *F* – специфически связавшийся и свободный [³H]HLDF-6.

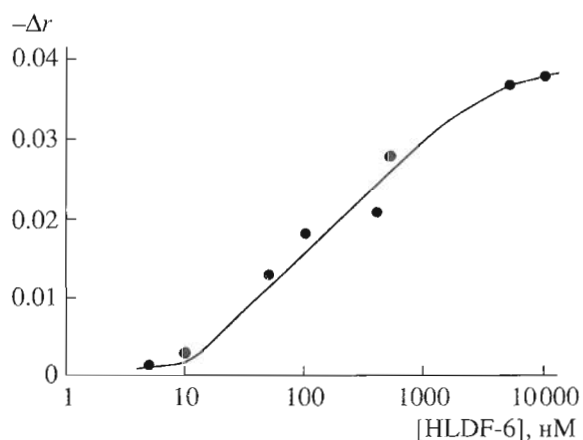


Рис. 4. Изменение анизотропии флуоресценции ($-\Delta r$) суспензии липосом, содержащих встроенный в мембрану зонд, под влиянием пептида HLDF-6.

Попытки продуцировать зрелый фактор дифференцировки в различных прокариотических системах не увенчались успехом, что, по-видимому, связано с высокой ДНК/РНК-гидролизующей активностью фактора HLDF [3]. Поскольку фактор дифференцировки HLDF состоит всего из 54 а. о., было решено для его получения в препаративных количествах использовать твердофазный химический синтез. По мере удлинения полипептидной цепи аликвоты синтезированных пептидов снимали со смолы и очищали гель-фильтрацией с последующей жидкостной хроматографией среднего давления на колонке РерРРС™.

Дифференцирующая активность всех синтезированных пептидов была проанализирована в NBT-тесте [4]. При этом было установлено, что в присутствии 14-членного пептида (HLDF-14), в составе которого содержится фрагмент TGENHR, клетки HL-60 приобретали способность восстанавливать нитроголубой тетразолий, тогда как восьмичленный С-концевой пептид (CGIFVINK)

такой активностью не обладал. Пептид TGENHR был синтезирован, и, оказалось, что он полностью воспроизводит дифференцирующую и антиростовую активность нативного фактора HLDF в экспериментах на клетках HL-60 (рис. 1, 2).

С целью выяснения роли отдельных аминокислотных остатков в проявлении пептидом HLDF-6 дифференцирующей активности был синтезирован ряд его аналогов (таблица). Как показали результаты NBT-теста, некоторой дифференцирующей активностью обладал уже четырехчленный пептид ENHR, но введение дополнительного остатка Gly в N-концевое положение (пептид GENHR) приводило к практически полному исчезновению этой активности. Однако после денатурации этот пептид приобретал способность восстанавливать нитроголубой тетразолий. По-видимому, в пептиде GENHR присутствует внутренний солевой мостик между α-аминогруппой остатка Gly и γ-карбоксильной группой остатка Glu, который препятствует проявлению

дифференцирующей активности. Дансирование приводит к разрушению этого мостика и восстановлению активности.

О важной роли остатка Glu свидетельствуют и данные, полученные в ходе тестирования синтетических аналогов пептида HLDF-6: пептидов TGDNHR и TGQNHR. Замена остатка Glu на остаток Asp или Gln в положении 3 приводит к исчезновению дифференцирующей активности.

Функционально значимыми в пептиде HLDF-6 являются также остатки His и Arg. Не проявляли дифференцирующей активности пептиды TGENAR и TGENHA, в которых остатки His и Arg заменены на остатки Ala. Введение остатка Tug в N-концевое положение вместо остатка Thr приводило к исчезновению антиростовой активности пептида, хотя пептид и сохранял способность восстанавливать нитроголубой тетразолий в NBT-тесте.

Важным этапом на пути понимания механизма действия факторов дифференцировки служит поиск специфических рецепторов на клеточной поверхности. С целью идентификации таких рецепторов для HLDF-6 на клетках HL-60 с помощью каталитического твердофазного тритилирования был получен ³H-меченый пептид TGENHR и проверена его способность связываться с этими клетками. Однако специфических рецепторов пептида на поверхности клеток линии HL-60 не было обнаружено. Связывание пептида с клетками HL-60 наблюдалось только при 37°C ($K_d \sim 1$ мМ) (рис. 3). Такая высокая константа связывания пептида и большое число мест связывания ($n \sim 10^{12}$) позволило нам предположить, что пептид неспецифически взаимодействует с липидными компонентами клеточной мембраны, изменяя ее физико-химические

Дифференцирующая активность белка HLDF и синтетических пептидов, соответствующих различным его фрагментам

Структура пептида	NBT-положительные клетки, %*
CGIFVINK	25 ± 2
TGENHRCGIFVINK (HLDF-14)	53 ± 1
TGENHR (HLDF-6)	52 ± 1
NHR	25 ± 2
ENHR	41 ± 1
GENHR	32 ± 2
Dns-GENHR	45 ± 1
TGDNHR	28 ± 2
TGQNHR	31 ± 2
TGENAR	30 ± 2
TGENHA	28 ± 2
YGENHR	55 ± 1
AAEAHR	30 ± 2
Нативный фактор HLDF	56 ± 1
Синтетический фактор HLDF	53 ± 1
Контроль	25 ± 3

* Приведены данные для фактора дифференцировки HLDF и пептидов в концентрации 10^{-6} М. Жирным шрифтом в пептидах выделены остатки, замененные в сравнении с HLDF-6.

свойства. В пользу этого предположения свидетельствуют и данные, полученные при изучении влияния пептида на анизотропию флуоресценции антривинилфосфатидилхолина [5], встроенного в липосомы из яичного лецитина. С повышением

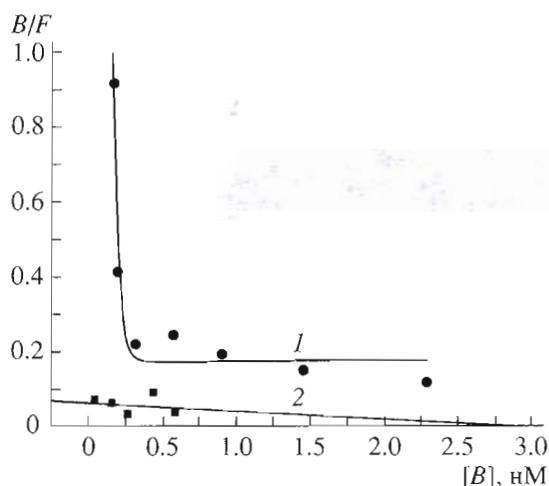


Рис. 5. Анализ в координатах Скэтчарда специфического связывания ¹²⁵I]rHuIL-1β с клетками HL-60 (1); то же в присутствии 0.1 мкМ пептида HLDF-6 (2). B – специфически связавшийся ¹²⁵I]rHuIL-1β; F – свободный ¹²⁵I]rHuIL-1β.

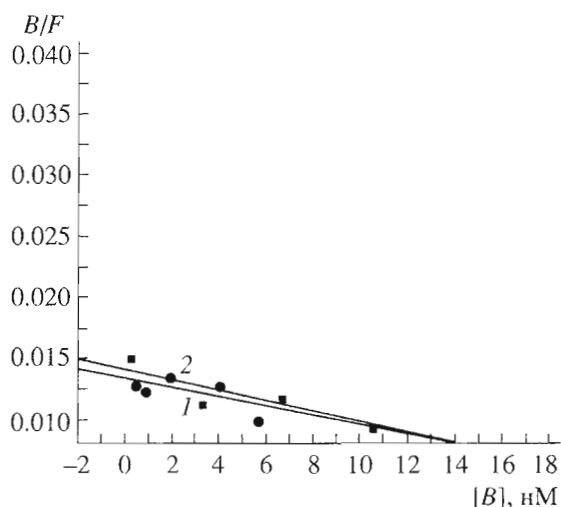


Рис. 6. Анализ в координатах Скэтчарда специфического связывания ¹²⁵I]rHuIFN-α2 с клетками HL-60 (1); то же в присутствии 0.1 мкМ пептида HLDF-6 (2). B – специфически связавшийся ¹²⁵I]rHuIFN-α2; F – свободный ¹²⁵I]rHuIFN-α2.

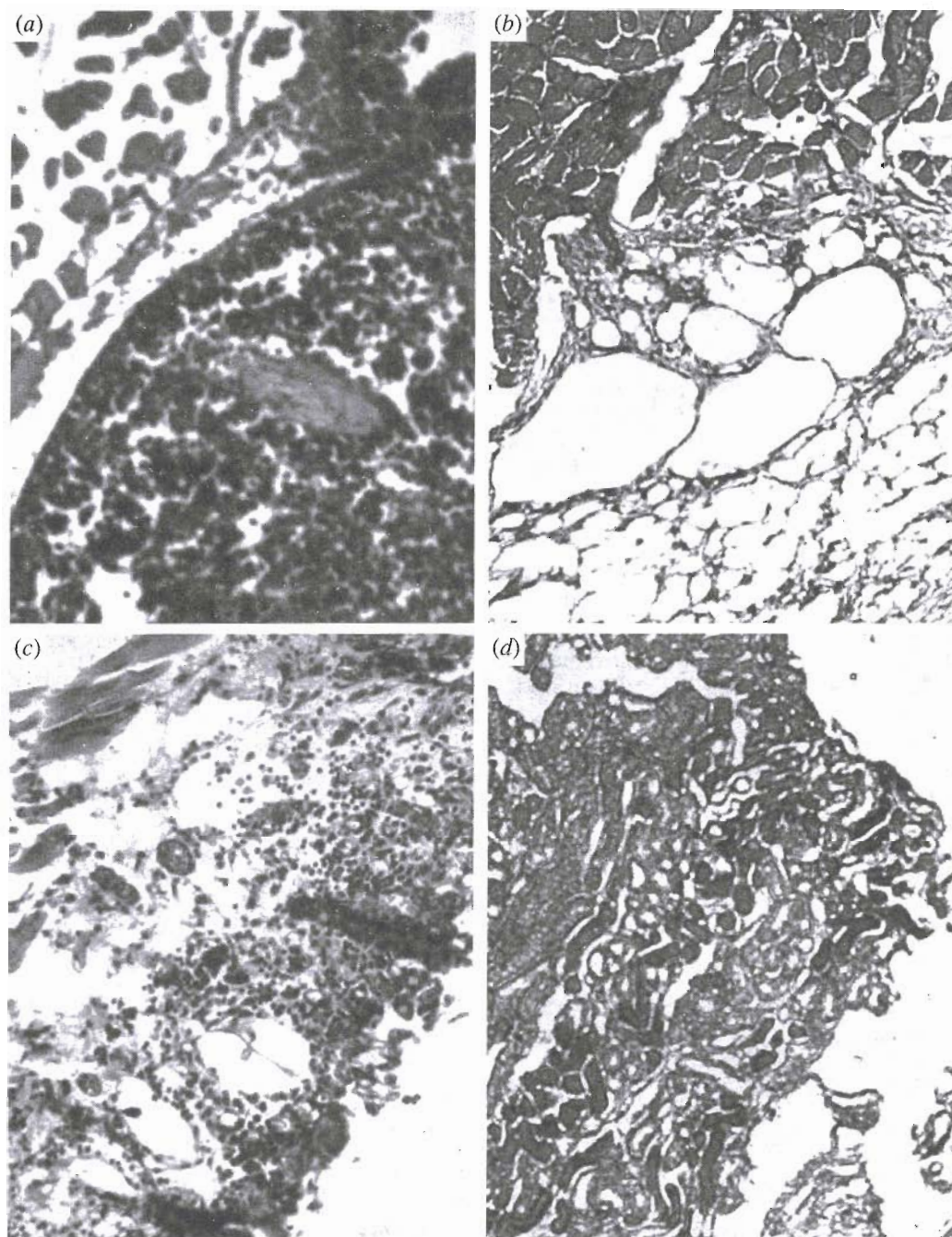


Рис. 7. Влияние пептида HLDF-6 на некроз опухоли: *a*) центральный опухолевый узел на передней брюшной стенке (илеоцекальный угол) на стадии $T_2N_1M_0$; *b*) некроз центрального опухолевого узла на передней брюшной стенке под действием пептида; *c*) место имплантации опухолевых клеток на передней брюшной стенке (илеоцекальный угол) через день после имплантации; *d*) передняя брюшная стенка (илеоцекальный угол) через день после инъекции пептида при одновременном введении пептида и клеток миеломы.

концентрации пептида HLDF-6 наблюдается монотонное падение величины Δr (изменение значений анизотропии флуоресценции по сравнению с контролем) (рис. 4), что указывает на увеличение подвижности липидных молекул. Следовательно, можно было ожидать, что пептид будет влиять на связывание цитокинов, вовлеченных в процессы

пролиферации и дифференцировки, с клеточной поверхностью.

Для проверки этой гипотезы было изучено влияние пептида HLDF-6 на рецепцию клетками HL-60 человеческих рекомбинантных интерлейкина- 1β (rHuIL- 1β) и интерферона- $\alpha 2$ (rHuIFN- $\alpha 2$). Как видно из рис. 5, при концентрации 0.1 мкМ

пептид полностью ингибирует высокоаффинное связывание [125 I]rHuIL-1 β с клетками HL-60 (K_d 0.32 нМ) и приблизительно в 3 раза увеличивает низкоаффинное (величина K_d соответственно 13.3 и 43.1 нМ), не изменяя при этом общего числа IL-1 β -связывающих участков. Преинкубация клеток HL-60 с 0.1 мкМ HLDF-6 не приводит к изменению числа рецепторов к [125 I]rHuIFN- α 2 (K_d 2.6 нМ, n 2.1×10^7) (рис. 6). Таким образом, HLDF-6, ингибируя высокоаффинное связывание rHuIL-1 β , снижает чувствительность клеток к пролиферативному сигналу этого цитокина [6]. В то же время HLDF-6 не влияет на дифференцирующую активность rHuIFN- α 2 [7].

Подобная картина наблюдается и в случае белка P48, секретируемого в среду культивирования клетками пре-В-клеточного лейкоза Reh, инфицированными микоплазмой *Mycoplasma fermentis* [8, 9]. Этот белок вызывает моноцитарную дифференцировку клеток HL-60, но не имеет специфических белковых рецепторов на поверхности этих клеток [10, 11]. Показано, что этот белок является липопротеином и, очевидно, его дифференцирующее действие обусловлено, как и в случае HLDF-6, взаимодействием с липидами клеточной мембраны.

Поскольку пептид HLDF-6 обладает ярко выраженными дифференцирующими и антиростовыми свойствами, было интересно проверить его противоопухолевое действие *in vivo*. Для определения противоопухолевой активности пептида HLDF-6 была получена биологическая модель, морфологически адекватная весьма распространенной человеческой онкопатологии, известной под названием синдрома Рустичко-Калера, или миеломной болезни, относящейся к группе опухолей из кроветворной ткани, или гемабластозам. В качестве объекта исследований использовали самцов линии мышей BALB/c OlaHsd с перевиваемой миеломой NSO/1 (P3x63A γ 8Ut). В ходе экспериментов установлено, что инъекции пептида HLDF-6 в брюшную полость с интервалом в 1 день по 100 мкг/мышь на стадии T $_1$ N $_0$ M $_0$ – T $_2$ N $_1$ M $_0$ [12, 13] (10 инъекций) вызывает образование зон массового некроза ткани центрального опухолевого узла с образованием полостей, заполненных ацитоподобным содержимым и клеточным детритом. По мере увеличения числа инъекций пептида у всех подопытных животных наблюдалось постепенное уменьшение размеров опухолей на стадиях T $_1$ N $_0$ M $_0$ – T $_2$ N $_1$ M $_0$ (рис. 7а, б) с полным распадом опухолевой ткани после 10 инъекций. У контрольных мышей в эти же сроки отмечался прогрессирующий рост опухоли до стадии T $_4$ N $_3$ M $_1$. Процесс заканчивался летально с клиническими признаками острой почечно-печеночной недостаточности и переполнением брюшной полости асцитом. В случае применения пептида HLDF-6 на стадии необластического роста (внутриперитонеальные инъекции по 10 мкг) установлено полное ку-

пирование развития онкопроцесса (рис. 7с, д) без возникновения рецидива в течение полугода.

Таким образом, в факторе дифференцировки HLDF идентифицирован биологически активный фрагмент, обладающий, как и нативный фактор, дифференцирующей и антиростовой активностью. Хотя пептид HLDF-6 и не имеет собственных рецепторов на поверхности клеток HL-60, он является модулятором важных физиологических процессов в клеточной мембране, влияя на ее физико-химические свойства. Полученные результаты служат основанием для дальнейших доклинических испытаний пептида HLDF-6.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: рекомбинантные интерлейкин-1 β (rHuIL-1 β), интерферон- α 2 (rHuIFN- α 2); L-глутамин и N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-2-этансульфоную кислоту (HEPES) (Flow, США); диметилсульфоксид (DMSO) (Sigma, США), фенолметилсульфонилфторид (PMSF), 1,3,4,6-тетрахлоро-3 α ,6 α -дифенилгликолюрил (иодоген) (Serva, ФРГ); сцинтиллятор Unisolv 100 (Amersham, Англия); Na 125 I без носителя в NaOH (100 мКи/мл), [3 H-метил]тимидин (уд. активность 76 Ки/ммоль) (Amersham, Англия), яичный фосфатидилхолин (Sigma, США). Остальные реактивы соответствовали квалификации "х. ч." и "ос. ч.". Для культивирования клеток использовали среду RPMI 1640 и фетальную сыворотку теленка (Gibco, США). Дистиллированную воду дополнительно очищали с помощью системы Milli-Q (Millipore, США).

Антривинилфосфатидилхолин любезно предоставлен Ю.Г. Молотковским (ИБХ РАН, Москва)

Синтез фактора дифференцировки и пептидов. Пептиды были синтезированы твердофазным методом с использованием Boc/Bzl-методологии. Для синтеза была использована полистирольная смола Boc-Arg(Tos)-PAM RESIN в количестве 250 мкмоль стартовой аминокислоты на каждый аналог. Синтез пептидилполимеров проводился в проточном реакторе переменного объема с использованием светлогографического мониторинга для определения продолжительности циклов операций [14]. Синтезированные пептиды очищали с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-50 SF (колонка 26 \times 90 мм) в 1 М AcOH с последующей жидкостной хроматографией среднего давления на колонке RepRPC $^{\text{TM}}$ (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).

Культивирование клеток HL-60 проводили в среде RPMI 1640 с 10% фетальной сывороткой теленка при 37 $^{\circ}$ C в атмосфере 5% CO $_2$.

Дифференцирующую активность синтетических пептидов и фактора дифференцировки HLDF на клетках HL-60 определяли по их способности восстанавливать нитроголубой тетразолий (NBT-тест) [4]. Пептиды и фактор добавлялись в виде водных растворов. На четвертые сутки после индукции дифференцирующую активность определяли по числу NBT-положительных клеток, выраженному в процентах. Для представления результатов были просчитаны не менее 300 клеток. NBT-положительными считали клетки, содержащие не менее 10 темно-голубых гранул.

Антиростовую активность пептида HLDF-6 на клетках HL-60 изучали как описано ранее [15]. Клетки инкубировали в 24-луночном планшете (2×10^5 /лунка) в отсутствие и в присутствии пептида (10^{-9} – 10^{-5} М) в течение 48–72 ч. За 4 ч до окончания культивирования клеток в каждую лунку вносили по 1 мКи [метил- ^3H]тимидина. По окончании инкубации реакционную смесь фильтровали через стекловолокнистые фильтры GF/C (Whatman, Англия). Радиоактивность на фильтрах просчитывали с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика LS 5801 (Beckman, США).

N-Концевой аминокислотный анализ проводили по стандартной методике [16]. Идентификацию Dns-производных аминокислот осуществляли с помощью ТСХ на пластинках (3×3 см) с полиамидом.

Получение ^3H -меченого пептида осуществляли методом каталитического тритилирования [17]; его удельная активность составляла 80 Ки/ммоль.

Связывание ^3H -меченого пептида с клетками HL-60 проводили по следующей схеме: клетки (1×10^6 /проба) инкубировали с ^3H -меченым пептидом (в диапазоне концентраций 10^{-9} – 10^{-6} М) в 1 мл среды RPMI 1640, содержащей 20 мМ NaN_3 и 10 мМ HEPES, pH 7.5, при 0 или 37°C в течение 1 или 2 ч. Инкубацию при 37°C проводили в присутствии 1 мМ PMSF. По окончании инкубации реакционную смесь фильтровали через стекловолокнистые фильтры GF/C. Радиоактивность на фильтрах просчитывали с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика LS 5801 (Beckman, США). Неспецифическое связывание меченого HLDF-6 определяли в присутствии 0.1 мМ немеченого пептида. Полученные результаты обрабатывали по методу [18].

Иодирование гHuIL-1 β и гHuIFN- α 2 проводили по методу [19] с помощью иодиогена. Удельная активность полученных препаратов [^{125}I]гHuIL-1 β и [^{125}I]гHuIFN- α 2 составляла по 30 Ки/ммоль.

Связывание [^{125}I]гHuIL-1 β и [^{125}I]гHuIFN- α 2 с клетками линии HL-60 проводили по методу [20]. Клетки (10^6 /проба) инкубировали 90 мин при 4°C с мечеными цитокинами (10^{-12} – 10^{-6} М) в 1 мл среды RPMI 1640, содержащей 10 мМ HEPES, pH 7.5, и 20 мМ NaN_3 . По окончании инкубации реакционную смесь фильтровали через стекловолокнистые фильтры GF/C. Неспецифическое связыва-

ние меченого цитокина определяли в присутствии 0.1 мМ соответствующего немеченого цитокина. Полученные результаты обрабатывали по методу [18]. Изучение влияния пептида HLDF-6 (0.1 мкМ) на связывание цитокинов клетками HL-60 проводили при тех же условиях.

Липосомы получали продавливанием липидов через поликарбонатную мембрану (Nucleopore, США) с порами диаметром 0.4 мкм. Липосомы, приготовленные таким образом, по размерам более однородны по сравнению с липосомами, получаемыми ультразвуковой обработкой взвеси липидов [21]. Конечная концентрация липосом составляла 25 мг/мл (по липиду). Встраивание флуоресцентных зондов в липосомы проводили добавлением к последним 0.1% раствора антрил-винилфосфатидилхолина в DMSO с последующей инкубацией (1 ч, 20°C). Конечная концентрация зонда в липосомах составляла 0.5%; содержание растворителя не превышало 0.2% по объему.

Влияние пептида на жидкость мембраны изучали, регистрируя изменение поляризации флуоресценции (P) при добавлении пептида к суспензии липосом, содержащих встроенный в мембрану зонд, по стандартной методике [5]. Поляризацию флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Hitachi F-4000 (Япония) в кварцевых полумикрокуветках (5×5 мм) с перемешиванием и термостатированием при температуре 37°C; длины волн возбуждения и испускания 370 и 440 нм, соответственно, ширина щелей монохроматоров – по 10 нм. Перед монохроматором испускания устанавливали светофильтр VY-39 (Hitachi, Япония), отсекающий свет с $\lambda < 390$ нм. Значение поляризации флуоресценции каждой точки получали усреднением не менее 15 показаний. Величину анизотропии флуоресценции рассчитывали по формуле: $r = 2P/(3 - P)$.

Изучение противоопухолевой активности пептида. В качестве объекта исследований использовали самцов SPF мышей линии BALB/c OlaHsd с перевиваемой миеломой NSO/1 (P3x63Au8U1) [22, 23] массой 18–20 г, полученных в питомнике лабораторных животных Центра предклинических испытаний ФИБХ РАН. Клетки миеломы NSO/1, культивируемые в среде RPMI 1640 с 10% фетальной сывороткой теленка при 37°C в атмосфере 5% CO_2 , собирали и после промывания в изотоническом K/Na-фосфатном буфере (PBS) имплантировали в виде суспензии в 0.5 мл PBS в иммуносупрессированную пристаном мышшь (из расчета 2.5×10^6 клеток на мышшь). Инъекции пептида (внутриперитонеально) в виде водного раствора, начиная с 13 дня после имплантации опухолевых клеток, проводили с интервалом в один день. Для верификации клеток опухолевой ткани использовали методы гистологического и гистохимического анализа [24].

Работа проводилась при финансовой поддержке Международного научно-технического центра

(проект № 463) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 97-04-49462).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kostanyan I.A., Astapova M.V., Starovoytova E.V., Dranitsina S.M., Lipkin V.M. // FEBS Lett. 1994. V. 356. P. 327–329.
2. Смирнова Е.В., Ракитина Т.В., Евтодченко А.Ю., Костанян И.А., Липкин В.М. // Биоорг. химия. 2000. Т. 26. С. 392–396.
3. 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. // Биоорг. химия. 2000. Т. 26. С. 340–351.
4. Baehner R.L., Nathan D.G. // J. Med. 1968. V. 278. P. 971–976.
5. Lakowicz J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York: Plenum Press, 1984. P. 122–155.
6. Dinarello C.A. // Blood. 1996. V. 87. P. 2095–2147.
7. Novick D., Cohen B., Rubinstein M. // Cell. 1994. V. 77. P. 391–400.
8. Leftwich J.A., Hall R.E. // Cancer Res. 1989. V. 49. P. 4459–4465.
9. Leftwich J.A., Hall R.E. // J. Leukoc. Biol. 1990. V. 47. P. 87–96.
10. Hall R.E., Agarwal S., Kestler D.P., Cobb J.A., Goldstein K.M., Chang N.-S. // Biochem. J. 1996. V. 319. P. 919–927.
11. Kestler D.P., Agarwal S., Hall R.E. // Immunology. 1995. V. 86. P. 463–468.
12. Hermanek P. // Pathol. Res. Pract. 1994. V. 190. P. 97–102.
13. Akaza H. // Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi. 1994. V. 85. P. 229–241.
14. Rodionov I., Baru M., Ivanov V. // Pept. Res. 1992. V. 5. P. 119–125.
15. Тесенков В. // Реакция бласт-трансформации лимфоцитов селезенки под влиянием антигена *in vitro*. Иммунологические методы / Ред. Х. Фримель. М.: Мир, 1979. С. 80–92.
16. Gray R. // Meth. Enzymol. 1967. V. 11. P. 138–151.
17. Zolotarev Yu.A., Nezavibatko V.N., Borisov Yu.A., Rosenberg S.G., Myasoedov N.F. // Amino Acids. 1993. V. 5. P. 121–122.
18. Chang K.J., Jacobs S., Cuatrecasas P. // Biochim. Biophys. Acta. 1975. V. 406. P. 294–303.
19. Salacinski P.R.P., McLean C., Sykes J.E.C., Clement-Jones V.V., Lowry P. // Anal. Biochem. 1981. V. 117. P. 136–146.
20. Holtman H., Wallach D. // J. Immunol. 1987. V. 139. P. 1161–1167.
21. Liposomes: A Practical Approach / Ed. R.R.C. New Oxford: University Press, 1990. P. 52–56.
22. Yelton D.E., Diamond B.A., Kwan S.P., Scharff M.D. // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1978. V. 81. P. 1–7.
23. Galfre G., Milstein C. // Preparation of Monoclonal Antibodies: Strategies and Procedures. Methods in Enzymology. Chap. 1 / Eds I.I. Langohe, H. van Vunakies. Orlando: Acad. Press, 1981. P. 73.
24. Histopathologic Technic and Practical Histochemistry / Ed. R.D. Lillie. London: Acad. Press, 1965. P. 166–167.

A Biologically Active Fragment of the Differentiation Factor of the HL-60 Line Cells: Identification and Properties

I. A. Kostanyan^{*,#}, M. V. Astapova^{*}, E. V. Navolotskaya^{**}, T. N. Lepikhova^{**},
S. M. Dranitsyna^{*}, G. B. Telegin^{**}, I. L. Rodionov^{**}, L. K. Baidakova^{**},
Yu. A. Zolotarev^{***}, I. M. Molotkovskaya^{*}, 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

^{***}Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow

Six-membered peptide fragment TGENHR (HLDF-6) was identified in the HL-60 cell culture of human promyelocyte leukemia treated with retinoic acid when studying the differentiation factor HLDF of this cell line. HLDF-6 retains the ability of the full-size factor to induce the differentiation and arrest the proliferation of the starting HL-60 cells. It was shown that the synthetic peptide HLDF-6 has no specific receptors on the surface of the HL-60 cells but can affect the binding of interleukin IL-1 β , a cytokine involved in proliferation, to the cell surface. It was found on a model of transplantable NSO myeloma that HLDF-6 has an antitumor activity.

Key words: cell differentiation factor, biologically active fragment; peptide; HL-60 cell line

[#] 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. 7. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.