



УДК 577.175.325'17:577.213.7

ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНОЙ МАТРИЦЫ АНАЛОГА ФРАГМЕНТА 4-10 АДРЕНОКОРТИКОТРОПНОГО ГОРМОНА

Ратманова К. И., Бочарова Т. Н., Андреева Л. А.

Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва

В последние годы интенсивно исследуется действие на центральную нервную систему олигопептидов, вырабатываемых в гипофизно-гипоталамусном комплексе мозга, так называемых нейтропептидов [1]. Одним из наиболее интересных и изученных поведенческих гормонов является адренотропный (АСТН), состоящий из 39 аминокислот. Было установлено, что для проявления поведенческого эффекта, вызываемого гормоном, а именно влияния на обучение и запоминание, достаточно последовательности фрагмента АСТН из семи аминокислот Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly (АСТН-(4-10)) и даже из четырех аминокислот Met-Glu-His-Phe (АСТН-(4-7)) [2].

В нашей лаборатории в течение ряда лет проводятся исследования по синтезу и биологической активности олигопептидов АСТН-(4-10), АСТН-(4-7) и их аналогов [3]. В результате этой работы в качестве стимулятора памяти предложен гептапептид Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro ([Pro⁸, Gly⁹, Pro¹⁰] АСТН-(4-10)). Это соединение сохраняет биологическую активность фрагмента АСТН-(4-10), но обладает более пролонгированным действием [4].

В ходе детального изучения поведенческих эффектов у животных, а также для проведения клинических испытаний гептапептида [Pro⁸, Gly⁹, Pro¹⁰] АСТН-(4-10) возникла необходимость его получения

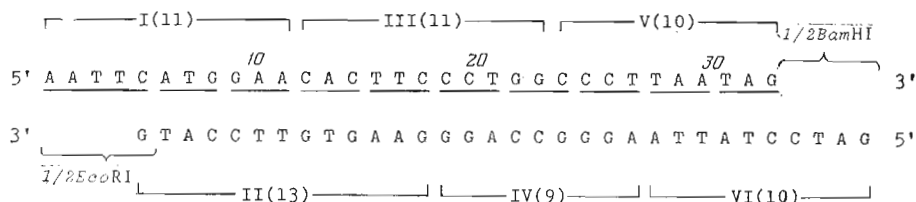
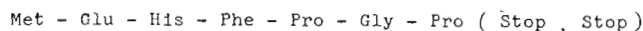


Рис. 1. Первичная последовательность нуклеотидной матрицы, кодирующей [Pro⁸, Gly⁹, Pro¹⁰] АСТН-(4-10)-гептапептид. Подчеркнуты триплеты, соответствующие кодонам мРНК. Римскими цифрами обозначены синтезированные олигонуклеотиды, в скобках указано количество звеньев в каждом из них

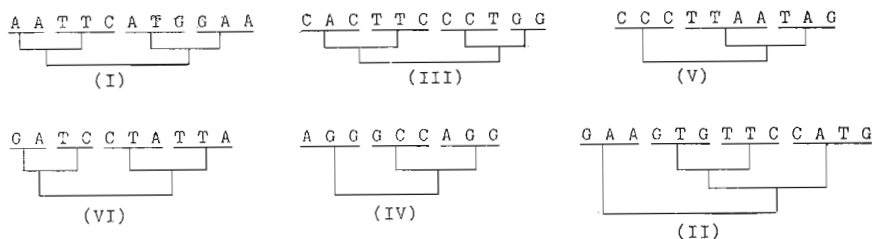


Рис. 2. Схема синтеза олигонуклеотидных сегментов верхней цепи (I), (III), (V) и нижней цепи (II), (IV), (VI) нуклеотидной матрицы [Pro⁸, Gly⁹, Pro¹⁰] АСТН-(4-10)-пептида

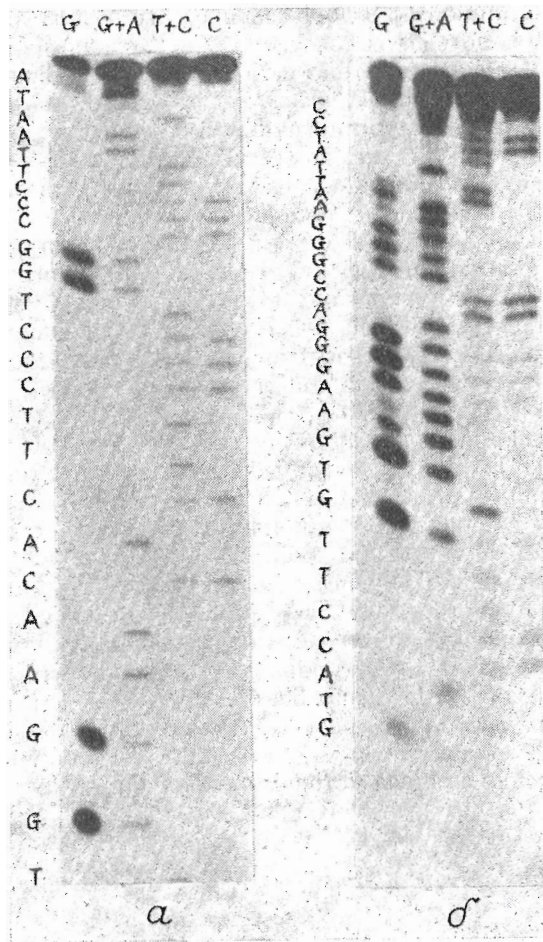


Рис. 3. Анализ нуклеотидной последовательности продукта лигирования сегментов (I)–(VI): *a* – секвенирование верхней цепи, фосфорилированной [γ - ^{32}P]ATP в присутствии T4-полинуклеотидкиназы по 5'-гидроксилу; *b* – секвенирование нижней цепи, достроенной по 3'-концу [α - ^{32}P]dATP и dTTP в присутствии ДНК-полимеразы I *E. coli* (фрагмент Кленова)

в больших количествах. Метод химического синтеза олигопептидов все еще остается дорогостоящим и трудоемким. Уникальные возможности для решения этой задачи открывает метод генной инженерии. Когда необходимо получить не нативную белковую структуру, а ее модифицированный аналог, незаменимы биотехнологические методы с использованием химически синтезированной кодирующей матрицы.

Настоящая работа посвящена химико-ферментативному синтезу нуклеотидной матрицы нейронспитида – стимулятора памяти [Pro⁸, Gly⁹, Pro¹⁰] АСТН-(4–10)-пептида с целью последующей экспрессии ее в простейших организмах.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая выбранный олигопептид (рис. 1), была сконструирована аналогично гену соматостатина [5] и брадикинина [6] с учетом правил, применяемых в этих случаях. Центральная часть предназначена кодировать аминокислотную последовательность пептида, с С-конца она ограничена двумя терминирующими кодонами. В полинуклеотиде предусмотрено наличие «половинных сайтов» рестриктаз *EcoRI* и *BamHI* для последующего соединения с вектором.

При планировании схемы синтеза полинуклеотид был разделен на шесть сегментов так, чтобы их гибридизация приводила к достаточному перекрытию комплементарных последовательностей. Эти сегменты –

олигонуклеотиды длиной от 9 до 13 звеньев были синтезированы блочным фосфотриэфирным методом в растворе [7], исходя из соответствующих нуклеотидов и 3'-мононуклеотидов, в которых 5'-гидроксил защищен диметокситригильной группой, фосфатный остаток — *n*-хлорфенильной и β-цианэтильной группами, аминогруппа гетероцикла и 3'-концевой гидроксил — бензоильными остатками. Последовательность соединения блоков в сегменты (I)–(VI) изображена на рис. 2. В качестве конденсирующего агента использовали триизопропилбензолсульфотетразолид. Защищенные олигонуклеотиды после каждой стадии синтеза выделяли колоночной хроматографией на силикагеле в градиенте метанола в хлороформе, полностью деблокированные олигонуклеотиды (I)–(VI) — ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе при pH 7,5 и 3,5 в градиенте концентрации хлористого натрия в 7 М растворе мочевины. Первичная структура олигонуклеотидов (I)–(VI) была подтверждена методом нуклеотидных карт [8].

Перед лигированием олигонуклеотидные сегменты (II)–(V) фосфорилировали [γ - 32 P]АТР в присутствии Т4-полинуклеотидкиназы. Продукты фосфорилирования (32 pII), (32 pIII), (32 pIV) и (32 pV) выделяли элюцией из 15% денатурирующего полиакриламидного геля и смешивали с 1,5-кратным избытком немеченых сегментов (I) и (VI) в буфере для лигирования в присутствии ДНК-лигазы фага Т4 [5]. Двунитчатый олигонуклеотид, кодирующий [Pro⁸, Gly⁹, Pro¹⁰]ACTH-(4–10) с выходом 80% был выделен элюцией из 15% денатурирующего полиакриламидного геля. Его первичная структура была подтверждена по модифицированному методу Максама — Гилберта [9–11] (рис. 3а, б).

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории биохимии вирусов Института вирусологии АМН СССР Е. А. Скрипкину и Ю. Е. Худякову за проведение анализа методом нуклеотидных карт.

ЛИТЕРАТУРА

1. De Wied D., Gispert W. H. In: Peptides in neurobiology / Ed. Gainer H. N. Y., 1977, p. 397.
2. Ашмарин И. П., Ерошкин М. Ю., Ковалева Т. А., Рожанец В. В. Молекулярная биология, 1978, т. 12, № 5, с. 965–979.
3. Пономарева-Степная М. А., Алфеева Л. Ю., Максимова Л. А., Незавибатько В. Н., Каменский А. А., Антонова Л. В., Ашмарин И. П. Хим.-фармацевт. ж., 1981, № 10, с. 37–42.
4. А. с. 939440 (СССР) Гептапептид в качестве стимулятора памяти пролонгированного действия. Пономарева-Степная М. А., Незавибатько В. Н., Ашмарин И. П., Каменский А. А., Антонова Л. В. Заявл. 6.01.81, № 3233411. Оpubл. в Б. И., 1982, № 24.
5. Takura K., Hirose T., Crea R., Riggs A. D., Heyneker H. L., Bolivar F., Boyer H. W. Science, 1977, v. 198, № 4321, p. 1056–1063.
6. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Болдырева Е. Ф., Северцова И. В., Чернов Б. К., Колосов М. Н., Городецкий С. И., Слюсаренко А. Г., Капелинская Т. В., Лисенков А. Ф., Дубинин Н. П. Биорган. химия, 1979, т. 5, № 12, с. 1802–1815.
7. Stawinsky J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 2, p. 353–371.
8. Jay E., Vambara R., Padmanabhan R., Wu R. Nucl. Acids Res., 1974, v. 1, № 3, p. 331–353.
9. Maxam A. M., Gilbert W. In: Methods in enzymology / Eds Grossman L., Moldave K. N. Y.—L.: Acad. Press, 1980, v. 65, p. 499–560.
10. Коробко В. Г., Грачев С. А., Колосов М. Н. Биорган. химия, 1978, т. 4, № 9, с. 1281–1283.
11. Коробко В. Г., Грачев С. А. Биорган. химия, 1977, т. 3, № 10, с. 1420–1422.

Поступило в редакцию
6.XII.1983

CHEMICAL-ENZYMATIC SYNTHESIS OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDE TEMPLATE FOR AN ANALOGUE OF 4–10 FRAGMENT OF ADRENOCORTICOTROPIC HORMONE

RATMANOVA K. I., BOCHAROVA T. N., ANDREEVA L. A.

Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Six oligodeoxyribonucleotides ranging from 9-mer to 13-mer were synthesized in solution by the phosphotriester approach and enzymatically joined by T4 DNA ligase. The obtained double-stranded DNA (32 b.p.) with protruding 5'-ends corresponding to the recognition sites for restriction enzymes *EcoRI* and *BamHI* represents an oligonucleotide template coding for the modified amino acid sequence 4–10 of the adrenocorticotrophic hormone, [Pro⁸, Gly⁹, Pro¹⁰]ACTH-(4–10).