



УДК 577.152.361*3:577.112.5

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА β -СУБЪЕДИНИЦЫ Na^+ , K^+ -АТФ-азы ПОЧЕК СВИНЬИ

II*. ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ, КЛОНИРОВАНИЕ мРНК.
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛНОЙ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ,
СООТВЕТСТВУЮЩЕЙ СТРУКТУРНОЙ ЧАСТИ ГЕНА

*Броуде Н. Е., Монастырская Г. С., Петрухин К. Е.,
Гришин А. В., Кияткин Н. И., Мелков А. М.,
Смирнов Ю. В., Свердлов В. Е., Малышев И. В.,
Модянов И. Н.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Матричная РНК, кодирующая β -субъединицу Na^+ , K^+ -АТФ-азы из почек свиньи, при гибридизации на нитроцеллюлозе [2] дает полосу специфической гибридизации в области 24–25S с двумя олигонуклеотидными зондами, синтезированными на основании первичной структуры двух пептидов, выделенных из триптического гидролизата β -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы.

Клонирование кДНК позволило определить полную нуклеотидную последовательность структурного гена и вывести аминокислотную последовательность β -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы. β -Субъединица Na^+ , K^+ -АТФ-азы содержит 302 аминокислотных остатка, при этом первичный продукт трансляции не подвергается процессу ни в N-, ни в C-концевой области.

В предыдущей работе [1] были опубликованы результаты структурного анализа пептидов, полученных в результате триптического гидролиза β -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы (КФ 3.6.1.3). На основании полученной информации были синтезированы два специфических олигонуклеотидных зонда, что позволило начать работу по анализу нуклеотидной последовательности структурной части гена β -субъединицы.

Настоящая работа посвящена выделению, анализу и клонированию мРНК, а также определению полной нуклеотидной последовательности структурного гена β -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы.

Выделение и анализ суммарной poly(A⁺)-мРНК из мозгового слоя почек свиньи

Суммарную РНК из мозгового слоя почек свиньи выделяли как описано ранее [3]. Матричную РНК, или poly(A⁺)-фракцию РНК, получали в результате двух циклов аффинной хроматографии суммарной РНК на oligo(dT)-целлюлозе [4]. Полученная фракция poly(A⁺)-мРНК составляла 2% от суммарной РНК. Отсутствие деградации мРНК на каждом этапе выделения контролировали электрофорезом в агарозном геле в денатурирующих условиях. Было показано, что в процессе выделения отсутствовала деградация как суммарной клеточной РНК, так и poly(A⁺)-содержащей фракции.

Для доказательства того, что выделения poly(A⁺)-фракция РНК содержит мРНК, кодирующую β -субъединицу, и для определения размера этой мРНК использовали метод, основанный на гибридизации специфического олигонуклеотидного зонда с РНК. РНК предварительно фракционировали с помощью электрофореза в денатурирующем агарозном геле и иммобилизовали на нитроцеллюлозе. На основании данных о структуре двух пептидов из триптического гидролизата β -субъединицы (пептиды XVIII-2 и XIV-2) [1] были синтезированы два олигонуклеотидных зонда. Один из

* Сообщение I см. [1].

них, 33-звенный зонд (β -33) с уникальной последовательностью, был синтезирован с использованием кодонов, наиболее часто встречающихся в гене α -субъединицы Na^+ , K^+ -АТР-азы из почек свиньи [5, 6]. Второй, 15-звенный (β -15) гетерогенный зонд содержал из-за вырожденности генетического кода 24 варианта нуклеотидной последовательности. Для уменьшения числа вариантов в гетерогенном зонде он был синтезирован тремя группами, так что в каждой группе содержалось по 8 вариантов (см. схему [7]).

Зонд β -33	5'	<i>ValGlyThrMetGluTyrPheGlyLeuGlyGly</i> GCCGCCCAGGCCGAAGTACTCCATGGTGCCAC	3'
Зонд β -15-1	5'	<i>LysPheIleTrpAsn</i> A ^A TTCCAGAT ^A GAA ^T TT	3'
β -15-2	5'	A ^A TTCCAAAT ^A GA ^T TT	3'
β -15-3	5'	A ^A TTCCATAT ^A GA ^T TT	3'
β -15	5'	A ^A TTCCAAAT ^A GA ^T TT	3'

Условия гибридизации с каждым из зондов подбирались эмпирически в широком интервале температур и составляли для зондов β -33 и β -15-1 60 и 35° С соответственно. Оба зонда давали полосу гибридизации с poly(A⁺)-РНК в области 24–25 S, причем эта полоса отсутствовала в случае poly(A⁻)-РНК (см. рис. 1а, б). Следует отметить, что зонд β -15-1 давал дополнительную полосу, по-видимому, неспецифической гибридизации в области 17 S РНК. Интересно также отметить, что, по данным экспрессии poly(A⁺)-РНК в ооцитах *Xenopus laevis*, мРНК, кодирующая β -субъединицу, определяется во фракции 17 S РНК, полученной в результате центрифугирования мРНК в градиенте плотности сахарозы [8]. С другой стороны, по данным работы [9], мРНК, кодирующая β -субъединицу из *Torpedo electrophax*, имеет длину ~3000 нуклеотидных оснований (23S). С чем связано появление второй полосы мРНК (17S), пока объяснить трудно.

Синтез и клонирование кДНК

Синтез первой цепи кДНК проводили на матрице суммарной фракции poly(A⁺)-мРНК с использованием в качестве затравки либо (dT)_{12–18}, либо «рассеянной», или среднестатистической, затравки [2]. Эффективность синтеза составляла 15% от количества исходной мРНК. Синтез второй цепи кДНК проводили с помощью ДНК-полимеразы I и РНКазы H по методу [10].

Длину синтезированных фрагментов кДНК определяли электрофорезом в щелочном агарозном геле. Перед клонированием синтезированную двухцепочечную кДНК фракционировали по длине с помощью электрофореза в агарозном геле для увеличения числа клонов, содержащих вставку необходимого размера. Обогащенную таким образом кДНК клонировали в плазмиду pBR322, предварительно расщепленную *Pst*I, с использованием присоединения 3'-концевых гомополимерных последовательностей dG·dC. При трансформации клеток *E. coli* МН1 [11] рекомбинантной ДНК выход трансформантов составлял 10²–10³ клонов на 1 нг вставки.

Определение нуклеотидной последовательности

При скрининге библиотек клонов, полученных с «рассеянной» и *oligo*(dT)-затравками (9·10⁴ колоний) было идентифицировано 15 клонов, дающих положительный сигнал гибридизации с зондом β -33. Для дальней-

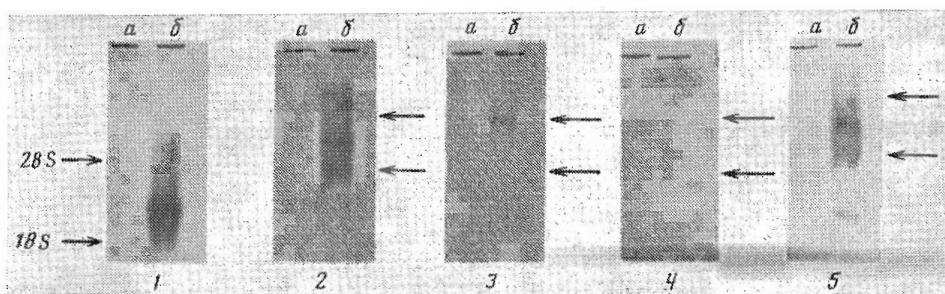


Рис. 1. Результаты гибридизации радиоактивно меченных олигонуклеотидных зондов, комплементарных мРНК β -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы с иммобилизованной poly(A⁻)-РНК (а) и poly(A⁺)-РНК (б) из почек свиньи; стрелками указано положение маркерных 28S и 18S рибосомных РНК; а — 20 мкг poly(A⁻)-РНК; б — 10 мкг poly(A⁺)-РНК; гибридизации РНК с зондами: β -33 (1), β -15-1 (2), β -15-2 (3), β -15-3 (4) и β -15 (5) (см. схему)

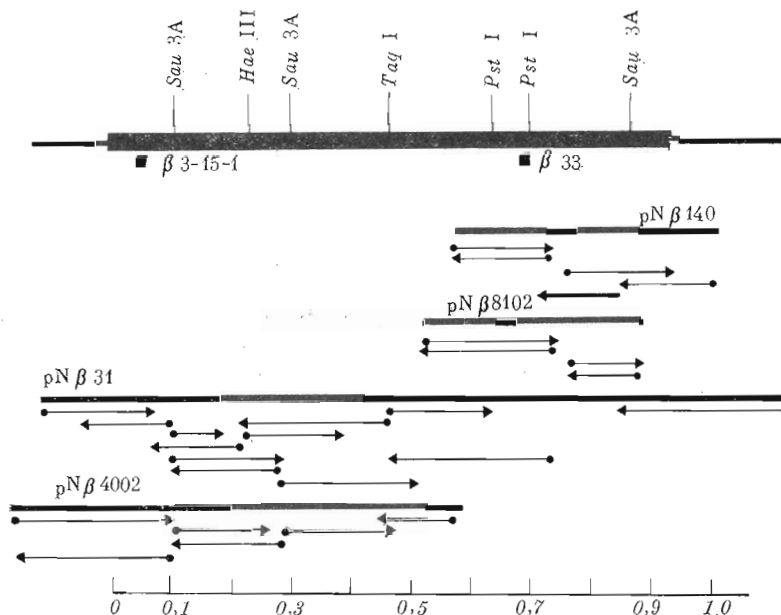


Рис. 2. Стратегия секвенирования и рестрикционная карта структурной части гена, кодирующего β -субъединицу Na^+ , K^+ -АТФ-азы почек свиньи. На рестрикционной карте указаны сайты узнавания только тех рестриктаз, которые использовались для переклонирования фрагментов кДНК в фаговый вектор. Область, соответствующая структурному гену, изображена широкой черной полосой. Под ней обозначены участки, соответствующие специфическим олигонуклеотидным зондам. Сплошными темными линиями под рестрикционной картой кДНК обозначены границы вставок клонов, использованных для установления нуклеотидной последовательности кодирующей области гена β -субъединицы. Стрелками указано направление секвенирования, а также отмечены границы субклонов кДНК в фаговом векторе M13mp8. Внизу приведена шкала в тыс.п.о.

шего анализа этих клонов выделяли плазмидную ДНК по методу Бирнбойма и Доли [3]. Полученную ДНК обрабатывали рестриктазой *Pst*I и определяли размер вставок электрофорезом в 1% агарозном геле. Все вставки имели по крайней мере один внутренний сайт расщепления рестриктазой *Pst*I.

Для идентификации гибридизующихся фрагментов использовали иммобилизованные на нитроцеллюлозных фильтрах *Pst*I-гидролизаты плазмидных ДНК. После гибридизации со специфическим олигонуклеотидным зондом β -33 для секвенирования были отобраны три клон: pN β 31, pN β 8102, pN β 140, плазмидная ДНК которых содержала вставки длиной 1200, 500 и 600 пар оснований (п. о.) соответственно.

1-3 (-1)	TTGGCAGGAGAGGACGCAAGACGCACGGGCAATCACCCATCTTCAA ^{Met} TC ^{Met} CCCCGCA ^{Met} GAGCTGTG ^{Met} TACCCCGCCACC
4-63 1-20	GCC CGC GGA AAA GCC AAG GAG GAG GGC AGC TGG AAG AAA TTG ATG TGG AAC TCC GAA AAG <u>Ala-Arg-Gly-Lys-Ala-Lys-Glu-Glu-Gly-Ser-Trp-Lys-Lys-Phe-Ile-Trp-Asn-Ser-Glu-Lys-</u>
64-123 21- 40	AAG GAG TTT TTG GGC AGG ACC GGT GGC AGT TGG TTT AAG ATC CTT CTA TTC TAC GTT ATA <u>Lys-Glu-Phe-Leu-Gly-Arg-Thr-Gly-Gly-Ser-Trp-Phe-Lys-Ile-Leu-Leu-Phe-Tyr-Val-Ile-</u>
124-183 41- 60	TTT TAT GGC TGC CTG GCT GGC ATC TTC ATT GGA ACC ATC CAA GTG ATG CTG CTC ACC ATC <u>Phe-Tyr-Gly-Cys-Leu-Ala-Gly-Ile-Phe-Ile-Gyl-Thr-Ile-Gln-Val-Met-Leu-Leu-Thr-Ile-</u>
184-243 61- 80	AGT GAA TTT AAG CCC ACA TAT CAG GAC CGA GTG GCC CCA CCA GGA TTA ACA CAG ATT CCT <u>Ser-Glu-Phe-Lys-Pro-Thr-Tyr-Gln-Asp-Arg-Val-Ala-Pro-Pro-Glu-Leu-Thr-Gln-Ile-Pro-</u>
244-303 81-100	CAG AGC CAA AAG ACT GAA ATT TCT TTT CGT CCT AAT GAT CCC CAA AGC TAT GAA TCC TAT <u>Gln-Ser-Gln-Lys-Thr-Glu-Ile-Ser-Phe-Arg-Pro-Asn-Asp-Pro-Gln-Ser-Tyr-Glu-Ser-Tyr-</u>
304-363 101-120	GTG GTA AGC ATA GTG AGG TTC CTG GAG AAG TAC AAA GAT TTG GCG CAG AAG GAT GAT ATG <u>Val-Val-Ser-Ile-Val-Gly-Phe-Leu-Glu-Lys-Tyr-Lys-Asp-Leu-Glu-Lys-Asp-Met-</u>
364-423 121-140	ATT TTT GAA GAT TGT GGC AAT GTG CCC AGC GAA CTC AAA GAA CGA GGA GAA TAT AAC AAC <u>Ile-Phe-Glu-Asp-Cys-Gly-Asn-Val-Pro-Ser-Glu-Leu-Lys-Glu-Arg-Gly-Glu-Tyr-Asn-Asn-</u>
424-483 141-160	GAA CGA GGA GAG CGA AAA GTG TGC AGG TTC AGG CTC GAA TGG TTG GGA AAC TGC TCT GGA <u>Gly-Arg-Gly-Glu-Arg-Lys-Val-Cys-Arg-Phe-Arg-Leu-Glu-Trp-Lys-Asn-Gly-Ser-Ser-Gly-</u>
484-543 161-180	TTA AAT GAT GAA ACC TAT GGC TAC AAA GAT GGC AAA CCC TGT GTC ATT ATA AAG CTC AAC <u>Leu-Asn-Asp-Glu-Thr-Tyr-Gly-Tyr-Lys-Asp-Gly-Lys-Pro-Cys-Val-Ile-Ile-Lys-Leu-Asn</u>
544-603 181-200	CGA GTT CTG GGC TTC AAA CCT AAG CCT CCC AAG AAT GAG TCC TTG GAG ACT TAC CCA GTG <u>Arg-Val-Leu-Gly-Phe-Lys-Pro-Lys-Pro-Pro-Lys-Asn-Glu-Ser-Glu-Thr-Tyr-Pro-Val-</u>
604-663 201-220	ATG AAG TAT AAT CCA TAT GTC CTG CCC GTT CAT TGC ACT GGC AAG CGT GAG GAA GAT AAG <u>Met-Lys-Tyr-Asn-Pro-Tyr-Val-Leu-Pro-Val-His-Cys-Thr-Gly-Lys-Arg-Asp-Glu-Asp-Lys-</u>
664-723 221-240	GAG AAA GTT GGA ACC ATG GAG TAT TTT GGC CTG GGC GGC TAC CCT GGT TTT CCT CTA CAG <u>Gly-Lys-Val-Gly-Thr-Met-Glu-Tyr-Phe-Gly-Leu-Gly-Gly-Tyr-Pro-Gly-Phe-Glu-Gln-</u>
724-783 241-260	TAT TAC CCT TAC TAC GGC AAG CTC TAG CAG CCC AAG TAC CTG CAG CCC CTG ATG GCT GTG <u>Tyr-Tyr-Pro-Tyr-Tyr-Gly-Lys-Leu-Leu-Gln-Pro-Lys-Tyr-Leu-Gln-Pro-Leu-Met-Ala-Val-</u>
784-843 261-280	CAG TTC ACC AAC CTC ACC ATG GAC ACT GAA ATC CGC ATA GAG TGT AAG GCG TAT GGT GAG <u>Gln-Phe-Thr-Asn-Leu-Thr-Met-Asp-Thr-Glu-Ile-Arg-Ile-Glu-Cys-Lys-Ala-Tyr-Gly-Glu-</u>
844-903 281-300	AAC ATT GGG TAC AGT GAG AAA GAC CGT TTT CAG GGA CGC TTT GAT GTA AAA ATT GAA GTT <u>Asn-Ile-Gly-Tyr-Ser-Glu-Lys-Asp-Arg-Phe-Gln-Gly-Arg-Phe-Asp-Val-Lys-Ile-Glu-Val-</u>
904-912 301-302	AAG AGC TGA TCACAAGCTCTTCCCACTAGCCATTTAAAGAGTTTAAAGATTTCAGAAACAAAACCTACTAGTCT <u>Lys-Ser</u>
	TGAACAAACTGTCATACGTAGGGACCTACACTTAATCTATATGCTTTACACTAGCTTCTCGCATTTAATAGGTTAGAAT
	GTAATTTAAAGTGTAGCAATACCAACAAATATTTATTCTACTG

Рис. 3. Нуклеотидная последовательность кодирующей цепи ДНК и аминокислотная последовательность β -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы. Подчеркнуты аминокислотные последовательности, структура которых установлена методами белковой химии [3]. Кругами обозначены гликозилированные остатки аспарагина

*Pst*I-фрагменты плазмидных ДНК выбранных клонов подвергали обработке несколькими ферментами, имеющими сайты расщепления в векторах серии *mp* фага M13. Затем по описанной методике [12] проводили их лигирование с репликативной формой векторной ДНК, расщепленной соответствующей рестриктазой, трансфекцию клеток *E. coli* и выделение однонитевой ДНК рекомбинантных фагов для последующего секвенирования. Нуклеотидную последовательность определяли по методу Сэнгера [12] с использованием его модификации [13]. На рис. 2 представлена стратегия секвенирования. Начало и конец клонов соответствуют следующим координатам нуклеотидной последовательности кодирующей цепи ДНК β -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы (рис. 3): pN β 31 (-126-1120), pN β 8102 (512-879), pN β 140 (562-1002), pN β 4002 (-180-580).

Клон pN β 4002, содержащий N-концевую последовательность структурного гена β -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы и часть 5'-нетранслируемой области, был найден в результате повторного скрининга исходной библиотеки клонов. В качестве специфического зонда использовали шик-транслированный N-концевой *Pst*I-фрагмент из плазмиды pN β 31 (-126-753 в координатах полной структуры). Для получения полного перекрытия последовательностей между *Pst*I-фрагментами (см. рис. 2) нуклеотидную последовательность плазмид pN β 140 и pN β 8102 определяли с использованием в качестве затравки синтетического олигонуклеотида, 5'TAGCCCTT-ACACTCTAT3', комплементарного C-концевому участку pN β 8102 [14].

В результате было установлено наличие двух *Pst*I-сайтов, расположенных на расстоянии 12 п. о. друг от друга (рис. 2 и 3).

Таким образом, кодирующая последовательность гена β -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы была получена в серии перекрывающихся как минимум двух независимых клонов.

На рис. 3 приведена полная нуклеотидная последовательность кодирующей области гена β -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы, часть 3'-нетранслируемой области, включающая сайт полиаденилирования, и часть 5'-нетранслируемой области. Все пептиды, выделенные при гидролизе β -субъединицы трипсином, структура которых была ранее определена методами белковой химии, были найдены в последовательности кДНК в одной рамке считывания. Сайт инициации трансляции был отнесен к кодону АТГ с координатами (1—3) и расположен непосредственно перед последовательностью, кодирующей N-концевую область белка. Аминокислотная последовательность, предшествующая терминатору (TGA), полностью соответствует структуре одного из триптических пептидов белка. Это свидетельствует об отсутствии процесса как в N-концевой, так и в C-концевой области полипептидной цепи β -субъединицы.

Таким образом, полная нуклеотидная последовательность структурной части гена β -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы свиный составляет 909 п. о., и ген кодирует зрелый белок, состоящий из 302 аминокислотных остатков.

Экспериментальная часть

В работе использовали трис и ацетат натрия (Merck, ФРГ); сахарозу, EDTA, MgCl_2 , β -меркаптоэтанол (Sigma, США); SDS (Bio-Rad, США); (dT)₁₂₋₁₈ и дезокси-нуклеозидтрифосфаты (P-L, США); тРНК (Boehringer, ФРГ); LiCl, NaCl, KCl и цитрат натрия квалификации ос. ч. (Союзреактив); pBR322, расщепленная *Pst*I, с 3'-выступающими oligo(dG)-концами (NEN, США); (α -³²P)dCTP (уд. акт. 3000 Кп/ммоль; Amersham, Англия).

Обратная транскриптаза (КФ 2.7.7) с активностью 15 ед. акт./мкл в 50% глицерине была выделена А. В. Чесухиным (ИБХ АН СССР) по методу [15]; РНКазы II (КФ 3.1.26.4) любезно предоставлена Н. В. Чичковой (Межфакультетская лаборатория МГУ); ДНК-полимераза I (КФ 2.7.7.7) выделена Г. М. Долгановым (ИБХ АН СССР) по методу [16]; терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза — препарат фирмы P-L (США).

Выделение РНК, гибридизацию РНК с олигонуклеотидными зондами проводили согласно методу [3].

Одноцепочечную кДНК синтезировали по методу [2] (с. 225—229). Вторую цепь кДНК с помощью ДНК-полимеразы I и РНКазы II синтезировали по методу [8]. Синтез oligo (dC)-последовательностей на 3'-концах кДНК и последующий отжиг таких молекул с pBR322, расщепленной *Pst*I и содержащей oligo(dG)-концы, а также клонирование полученных рекомбинантных ДНК в *E. coli* МН1 [11] проводили по стандартным методикам [10, 2] (с. 234—238). Субклонирование ДНК для последующего секвенирования и определение нуклеотидной последовательности проводили по методике, описанной ранее [13].

Авторы искренне признательны Ю. А. Овчинникову и Е. Д. Свердлову за постоянное внимание и ценные советы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арзамасова Н. М., Гевондян Н. М., Чертова Е. Н., Назимов И. В., Гаврильева Е. Е., Адамова Н. А., Модянов Н. Н. Биоорг. химия, 1987, т. 13, № 1, с.
2. Маннати Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. В кн.: Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
3. Петрухин К. Е., Броуде Н. Е., Арсенин С. Г., Гришин А. В., Джанджугазян К. Н., Модянов Н. Н. Биоорг. химия, 1985, т. 11, № 2, с. 1607—1613.
4. Aviv P., Leder P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, № 6, p. 1408—1412.
5. Монастырская Г. С., Броуде Н. Е., Мельков А. М., Смирнов Ю. В., Малышев И. В., Арсенин С. Г., Саломатина И. С., Свердлов В. Г., Гришин А. В., Петрухин К. Е., Модянов Н. Н. Биоорг. химия, 1987, т. 13, № 1, с. 20—26.
6. Laike R. J. Mol. Biol., 1985, v. 183, p. 1—12.
7. Петрухин К. Е., Гришин А. В., Арсенин С. Г., Броуде Н. Е., Гринкевич В. А., Филиппова Л. Ю., Северцова И. В., Модянов Н. Н. Биоорг. химия, 1985, т. 11, № 12, с. 1636—1641.
8. Geering K., Meyn D. J., Pascolat M.-P., Kraehenbühl J.-P., Rossier B. C. J. Biol. Chem., 1985, v. 259, № 8, p. 5154—5160.
9. Noguchi Sh., Noda M., Takahashi H., Kawakami K., Ohta T., Nagano K., Hirose T., Inayama S., Kawamura K., Numa Sh. FEBS Lett., 1986, v. 196, № 2, p. 315—320.

10. Gubler U., Hoffman B. J. *Gene*, 1983, v. 25, № 2/3, p. 263-269.
11. Casaban M. J., Cohen S. N. J. *Mol. Biol.*, 1980, v. 138, № 2, p. 179-207.
12. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, p. 5463-5467.
13. McGraw R. A. *Anal. Biochem.*, 1984, v. 143, № 2, p. 298-303.
14. Hattori M., Sakaki Y. *Anal. Biochem.*, 1986, v. 152, p. 232-238.
15. Meyers Y. C., Ramizer F., Kacian O. L., Flood M., Spiegelman S. *Anal. Biochem.*, 1981, v. 101, № 1, p. 88-96.
16. Kelley W. S., Slump K. H. *J. Biol. Chem.*, 1979, v. 254, № 9, p. 3206-3211.

Поступила в редакцию
25.VII.1986

THE PRIMARY STRUCTURE OF THE β -SUBUNIT OF Na^+ , K^+ -ATPase FROM PIG KIDNEY. II. REVERSE TRANSCRIPTION OF mRNA AND CLONING OF cDNA. THE COMPLETE NUCLEOTIDE SEQUENCE CORRESPONDING TO THE CODING PART OF THE GENE

BROUDE N. E., MONASTYRSKAYA G. S., PETRUKHIN K. E., GRISHIN A. V.,
KIYATKIN N. I., MELKOV A. M., SMIRNOV Yu. V., SVERDILOV V. E.,
MALYSHEV I. V., MODYANOV N. N.

*M. M. Schemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

mRNA coding for β -subunit of Na^+ , K^+ -ATPase from pig kidney is about 24-25S as deduced from the hybridization pattern of poly(A)⁺-RNA with two synthetic oligonucleotides structurally corresponding to two peptides isolated from the tryptic hydrolyzate of β -subunit. Cloning of cDNA allowed to determine the complete structure of the gene and to deduced the amino acid sequence of β -subunit of Na^+ , K^+ -ATPase. The β -subunit contains 302 amino acid residues and the protein is not processed at the N- nor at the C-terminus.