



УДК 577.214.622

© 1994 В. А. Ефимов, Е. А. Аронова, А. А. Бурякова,
А. Л. Калинин, А. Б. Летунова, А. Ф. Фрадков,
О. Г. Чахмахчева

СИНТЕЗ И КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ АНТИСМЫСЛОВЫХ ПЕПТИДОВ КАЛЬЦИТОНИНА И МИНИПРОИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕКА

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*

Ключевые слова: химико-ферментативный синтез, клонирование, экспрессия генов, сенс- и антисенс-пептиды.

С целью экспериментальной проверки правильности теории молекулярного узнавания осуществлены химико-ферментативный синтез и клонирование гена кальцитонина человека, а также генов антисенс-полипептидов к кальцитонину и минипроинсулину человека. Показано, что полученные на основе этих синтетических генов рекомбинантные плазмиды способны обеспечивать биосинтез данных полипептидов в клетках *E. coli* в составе гибридных белков с IgG-связывающим доменом белка А стафилококков.

В последнее время развивается теория «молекулярного узнавания», согласно которой пептиды, кодируемые комплементарными последовательностями нуклеиновых кислот в той же рамке (так называемые сенс- и антисенс-пептиды), обладают гидропатической комплементарностью и способны специфически связываться друг с другом [1, 2]. Согласно недавно предложенной модели, во время взаимодействия комплементарных пептидов гидрофильные аминокислотные остатки в обеих цепях ориентированы по направлению к водному растворителю, в то время как гидрофобные остатки образуют интерфазу между двумя цепями. Еще в 1969 г. Л. Б. Меклсром была выдвинута гипотеза о существовании кода взаимодействия аминокислот: аминокислота — антиаминокислота ($a-\bar{a}$), который обуславливает первичное взаимодействие пептидных цепей как при биосинтезе и самосборке белков, так и при образовании лиганд-рецепторных комплексов [3]. Предполагается, что существует скрытая симметрия генетического кода, а код взаимодействия аминокислот является как бы продолжением генетического кода и составляет его вторую половину. Таким образом, последовательность антисенс-пептида может быть выведена из последовательности сенс-пептида с помощью кода корней кодонов аминокислот (корень — основание второго нуклеотида триплета). Эта модель предусматривает значительную вырожденность

Условные обозначения: IPTG — изопропил- β -D-тиогактопиранозид; SDS — додецилсульфат натрия.

Адрес для переписки: 117871, ГСП-7, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ИБХ РАН. Ефимову В. А.

взаимодействия сенс- и антисенс-пептидов, т. е. несколько антисенс-пептидов могут соответствовать одному сенс-пептиду [4, 5]. Однако, несмотря на то что на примерах взаимодействия ряда сенс- и антисенс-пептидов получены экспериментальные данные, подтверждающие эту теорию [6—9], вопрос о существовании подобного взаимодействия остается дискуссионным, поскольку существуют работы, ставящие под сомнение ее универсальность [10, 11].

Следует отметить, что потенциально теория «молекулярного узнавания» могла бы иметь существенное значение для физико-химической биологии и биотехнологии. В частности, она может быть использована для конструирования аналогов природных биорегуляторов и моноклональных антител, для получения специфических сорбентов и т. д. Так, одной из проблем при разработке технологии получения белков с помощью методов генетической инженерии является выделение и очистка целевого продукта. Перспективным решением этой проблемы могло бы стать использование взаимодействия рекомбинантного белка с соответствующим ему антисмысловым пептидом, закрепленным на твердом носителе.

Известные из литературы попытки доказательства существования связывания сенс- и антисенс-пептидов были предприняты на примерах относительно коротких молекул, синтезированных химическими методами [6—11]. Альтернативным подходом является микробиологический синтез полипептидов, который позволяет создавать более длинные молекулы в практически неограниченных количествах. Последний способ и был выбран нами для получения модельных соединений для доказательства действия кода $a-\bar{a}$ и изучения факторов, определяющих взаимодействие аминокислот в пептидных цепях. При разработке экспериментальной системы нами была учтена возможность проведения изучения нековалентного связывания пептидов как на би-, так и на мономолекулярном уровне, когда сенс- и антисенс-последовательности объединены в одну полипептидную цепь. В качестве объектов исследования были выбраны кальцитонин человека и минипроинсулин.

Настоящее сообщение является первым в серии публикаций на эту тему и посвящено этапу работы, включающему синтез, клонирование и экспрессию генов кальцитонина, минипроинсулина и некоторых соответствующих им антисмысловых полипептидов, а также их комбинаций.

Нуклеотидная последовательность синтетического гена кальцитонина человека (*ct*) была выведена из аминокислотной с использованием кодонов, наиболее часто встречающихся в генах *E. coli*, и с учетом сведения к минимуму возможной вторичной структуры соответствующей мРНК. Причем аминокислотная последовательность кальцитонина (СТ) отличалась от нативной [12] заменой остатка Met в 8-м положении на Val и введением на С-конец дополнительного остатка Leu, который должен был обеспечить возможность модификации полипептида после выделения из бактериальных клеток — удаления Leu действием карбоксипептидазы Y с образованием на С-конце пролинамида [13]. Кроме того, на N-конец кальцитонина был введен дополнительный остаток Met, что предусматривало возможность его отщепления от гибридного белка бромцианом (рис. 1).

Первичные структуры двух из нескольких возможных антисмысловых пептидов к кальцитонину — антисенс-пептида (АСТ) и инвертированного антисенс-пептида (ИАСТ) — выводились из последовательностей кальцитонина и комплементарной цепи его гена в $5' \rightarrow 3'$ - и $3' \rightarrow 5'$ -направлениях согласно принципам теории молекулярного узнавания (схема 1) [3—5]. На N-концы антисенс-пептидов вводился дополнительный дипептид Asn-Gly с целью обеспечения возможности их отщепления от гибридного белка действием гидроксилamina (схема 2) [14]. В свою очередь последовательности генов антисенс-пептидов *act* и *iact* выводились из соответствующих аминокислотных с учетом тех же моментов, что и в случае гена [Val⁸]кальцитонина. Кроме того, учитывалась нежелательность присутствия сильной вторичной структуры не только в мРНК самого антисенс-пептида, но и в мРНК, получающейся при объединении генов сенс- и антисенс-пептидов.

CT

MetCysGlyAsnLeuSerThrCysValLeuGlyThrTyrThrGlnAspPheAsnLysPheHisThrPheProGlnThrAlaIleGlyValGlyAlaProLeu
 AATTATGTGGGGTAACTGTACTGGGTCCTGGGTACCTACCCAGGACTTCAACAATCCACACTCCCGCAGACCGCTATCGGTGTGGTCCCGCTGTA
 GTACACCCCATTTGGACAGATGGACCAAGCCATGGATGTGGGTCCTGAAGTTGTTAAGGTGTGGAAAGCGCTGTGGCGATAGCCACAACCCAGGCGACATTGCA
 33 32 31 30 29 28 27 26 25 24 23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

ACT

AspProAsnGlyLeuLysTrpGlyAlaHisProAsnSerSerLeuGlyLysSerValLysLeuIleLysIleLeuArgIleSerAlaGluHisThrArgGlyGluIleAlaThr
 GATCCAAACGGTTTAAAGTGGGTGCTCACCCAAACTCCAGCCTTGGTAAGAGCGTTAAGCTGATCAAGATTCTTCGCATCAGCGCTGAACACACACAGCGGTGAATCGCTACACATCAAGATCTGG
 GTTTCGGAAATTCACCCCAAGTGGGTTTGAGGTCCGAAACCAATTCGGCAATTCGACTAGTCTAAGAACCGTAGTCGGACTTGTGTGGCCACTTAGCGATGTGTAGACCTTAA

IACT

AspProAsnGlySerAlaLeuThrAlaIleGlyArgThrHisGluAlaSerIleArgLeuIleLysIleLeuLysValSerLysGlyLeuSerGlyAsnProHisAlaGlyTrpLys
 GATCCAAACGGTAGCGCTTAAACAGTATCGAAGGTCGCACACAGGACTAGCATCCGCCCTTATAAGATCCTGAAGGTAGCAAGGCTTAGCGGTAAACCCACAGCGCTGGTTGGAAAGCATCAAGATCTGG
 GTTTCGCAATCCGGAATTTGTCGATAGCTTCCAGCGTGTGTGGTTCGATAGCGGGAATAATTCGACTTCCAAATCGTCCSAGAAATCGCCATTTGGGTGTGGCAGCAACCTTCGTTAGACCTTAA

Рис. 1. Нуклеотидная последовательность синтетических генов кальцитонина (ct), двух возможных его антисмысловых полипептидов (act и iact) и соответствующие им аминокислотные последовательности

MP

1 10 20 30 40
MetPheValAsnGlnHisLeuCysGlySerHisLeuValGluAlaLeuTyrLeuValCysGlyGluArgGlyPhePheTyrThrProLysThrLysArgGlyIleValGluGlnCysCysThr
AATTCATGTTTGTCAATCAGCACCTTTGGTCTCACCTGGTGGAGGCTGTACCTGGTGTGGGGAAAGTGGTTCTCTACACCCCAAGACCAAGCGTGGCATTTGGAAACAGTGTGCACC-
GTACAAAGTAGTTAGTCGTGGAAACCCAAAGTGGACCCACCTCCGAGACATGGACCACACCCCTTGCACCAAGAAGATGTGGGTTCTGGTCCACCCGTAACACCTTGTCAAGACGTTGG

50 53
SerIleCysSerLeuTyrGlnLeuGluAsnTyrCysAsnTerTer
AGCATCTCCCTCTACCAACTGGAGAACTACTGCAACTAGTA
TCGTAGACGGGAGATGGTGCACCTCTGATGACGTTGATCATTCGA

AMP

1 10 20 30
AspProAsnGlySerValLeuIleThrIlePheLysLeuIleLysAlaThrAsnThrArgThrThrLeuLeuTyrAspSerProPheSerPheArgGlyIleLysLysAlaProLeuSerAlaTyr-
GATCCAAACGGTAGCGCTTAAATCACAATTAATCAACTCATCAAAAGCTACAAACACCCGACACATTTGCTGTATGACAGTCCCTTTTCCTCCGTGGCATCAAGAAGGCTCCTGTCTGCATAT
GTTTGCATCGCCAAATAGTGTAAATAGAAATTTAGTAGTTTCGATGTTTGGGCGTGTGTAACGACATACTGTCCAGGAAAAGGAAGCCCGTAGTTCTTCCGAGGAGACAGACGTATA

40 50 53
GluIleGluArgPheTyrGluValGlyProAlaGlnValLeuValAsnGluHisGlnAspLeu
GAAATCGAACCGTTTTATGAAGTTGGTCTGCACAAGTTTTGGTAAATGAGCATCAAGATCTGG
CTTTAGCTTGCAAAATACTTCAACCAGGCGTGTCAAAACCATTTACTCGTAGTTCTAGACCTTAA

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность синтетических генов минипроинсулина человека (mp) и его антисенс-пептида (amp) и соответствующие им аминокислотные последовательности

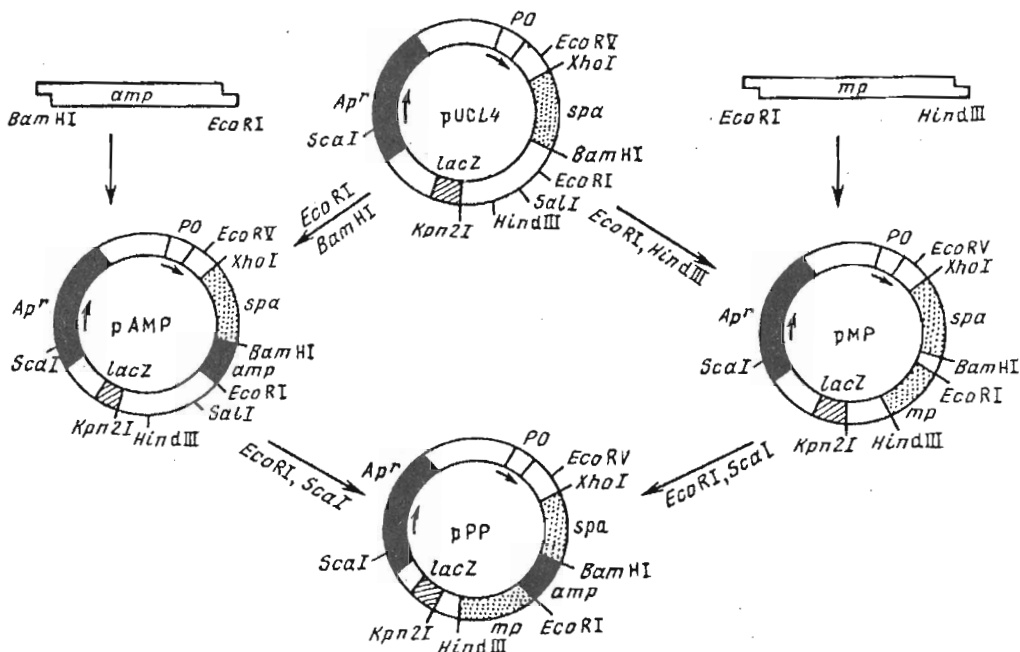


Рис. 3. Схема конструирования плазмид, несущих гены *mp* (pMP), *amp* (pAMP) и комбинированный ген *mp-amp* (pPP1). *spa* — ген IgG-связывающего домена белка А; *PO* — *lac*-промотор и оператор, *lacZ* — часть гена β-галактозидазы *E. coli*

[16]. Белок А играет важную роль вследствие его специфического связывания с Fc-фрагментом иммуноглобулинов. Кроме того, он удобен для получения на его основе гибридных белков с различными полипептидами, которые могут быть эффективно очищены с помощью IgG-аффинной хроматографии [17, 18]. В некоторых случаях такие гибриды могут транслоцироваться через цитоплазматическую мембрану с помощью его сигнальной последовательности и аккумулялироваться в культуральной среде [18]. В других случаях гибриды с фрагментами белка А могут образовывать нерастворимые тела включения в бактериальной цитоплазме, таким образом защищая гетерологичные белки от действия внутриклеточных протеиназ [17].

Аналогичные конструкции на основе вектора pUCL4 (плазмиды pACT1, pIACT1, pCT1, pCCI1, pCCII1) были получены исходя из синтетических генов *ct*, *act* и *iact* (таблица).

Экспрессия гибридных белков целевых полипептидов с SPA изучалась нами в различных штаммах *E. coli* K12. Наиболее удовлетворительные результаты были получены в штаммах *E. coli* HB101 и *E. coli* MN1. Для предотвращения деградации рекомбинантных белков внутриклеточными протеиназами в культуральную жидкость прибавляли глюкозу. Присутствие глюкозы (0,05%) репрессировало транскрипцию с *lac*-промотора в течение *log*-фазы роста клеток. Последующее добавление индуктора (IPTG) давало 2—3-кратное увеличение продукции гибридного белка при минимальной степени деградации [19]. С использованием этих условий гибридные белки SPA-MP, SPA-AMP и SPA-AMP-MP накапливались в клетках *E. coli* в виде нерастворимых тел включения со средним выходом 20—25% от общего количества белка в клетке (рис. 4).

В то же время проверка эффективности биосинтеза кальцитонина и соответствующих антисенс-пептидов в виде гибридов с IgG-связывающим доменом белка А показала значительное снижение выхода целевого продукта (менее 1% от общего количества белка в клетке) по сравнению с другими гибридными белками

Синтетический ген	Плаزمида	Тип промотора	Гибридный белок *
<i>mp</i>	pMP	<i>lac</i>	SPA-MP (20)
<i>amp</i>	pAMP	»	SPA-AMP (22)
<i>amp-mp</i>	pPP1	»	SPA-AMP-MP (25)
<i>ct</i>	pCT1	»	SPA-CT (< 1)
»	pCT2	T7	» (1)
<i>act</i>	pACT1	<i>lac</i>	SPA-ACT (< 1)
»	pACT2	T7	» (2,5)
<i>iact</i>	pIACT1	<i>lac</i>	SPA-IACT (1)
»	pIACT2	T7	» (3)
<i>act-ct</i>	pCC1	<i>lac</i>	SPA-ACT-CT (3)
»	pCC2	T7	» (10)
»	pCCL2	»	» (15)
<i>iact-ct</i>	pCCI1	<i>lac</i>	SPA-IACT-CT (2)
»	pCCI2	T7	» (11)

* В скобках показан уровень экспрессии гибридного белка в процентах относительно количества суммарного клеточного белка.

на основе SPA. Это могло быть результатом как сильного снижения эффективности трансляции, так и нестабильности гибридного белка в бактериальной клетке. Подобные трудности с получением кальцитонина микробиологическим синтезом уже отмечались ранее другими исследователями [20]. В то же время уровень экспрессии тройных гибридов SPA-ACT(IACT)-CT был несколько выше (до 2—3% от общего количества клеточного белка) (рис. 4). При этом, однако, не было зафиксировано образования «тел включения» в клетках *E. coli*, основная часть продуцируемых гибридных белков была обнаружена в цитоплазме в растворенном виде и частично — в культуральной среде.

Для того чтобы обойти эти трудности, как один из вариантов был использован ранее сконструированный нами на основе плазмиды pGEM1 вектор pVEV [21]. В этой системе ген целевого белка находится под контролем тандема T7-промоторов, и его экспрессия может осуществляться после индукции IPTG в специальных штаммах *E. coli*, несущих клонированный в хромосоме ген T7-РНК-полимеразы под контролем *lac-UV5*-промотора, в частности *E. coli* BL21 (DE3) [22].

Гибридные гены, кодирующие комбинации SPA с CT, ACT и IACT, вырезали из плазмид pCT1, pACT1 и pIACT1, pCC1 и pCCI1 и вводили в вектор pVEV между сайтами *XhoI-EcoRI* или *XhoI-HindIII* (рис. 5). Анализ суммарной белковой фракции из клеток *E. coli*, трансформированных полученными рекомбинантными ДНК, показал, что выход гибридных белков SPA-CT, SPA-ACT (IACT) в этой системе был не намного выше, чем в первой, на основе вектора pUCL4, и составил в среднем не более 3% от общего количества белка в клетке. В то же время в случае тройных гибридов SPA-ACT-CT и SPA-IACT-CT (плазмиды pCC2 и pCCI2) (рис. 4) их выход был заметно выше (около 10%). В одном из полученных нами вариантов конструкций ген, кодирующий гибридный SPA-ACT-CT, вводился в плазмиду pVEV между сайтами *SalI* и *HindIII* (рис. 5). При этом между тандемом T7-промоторов и геном гибридного белка располагался участок, соответствующий нетранслируемой 5'-лидерной последовательности мРНК белка оболочки вируса табачной мозаики Ω , известной из литературы как универсальный энхансер трансляции [23]. Таким образом, была получена плаزمида pCCL2, при

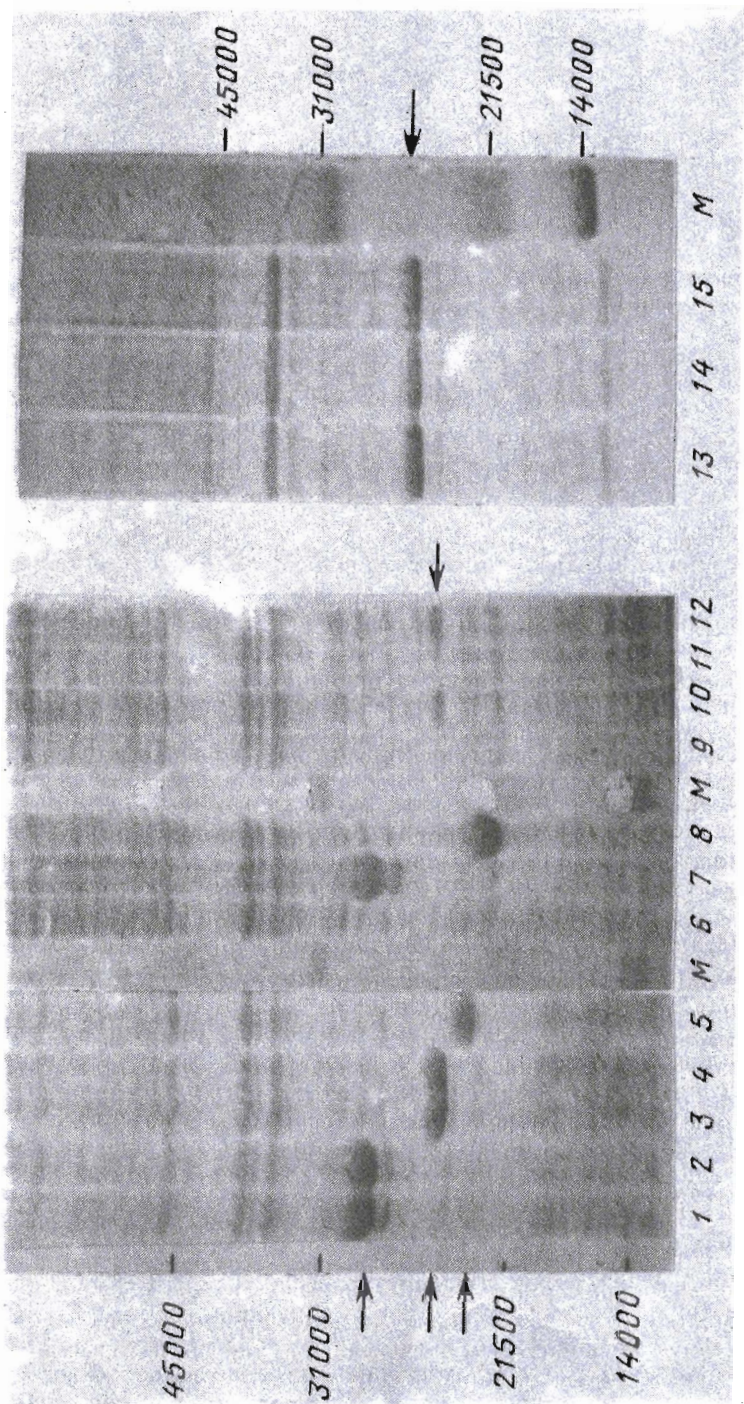


Рис. 4. Электрофорез в 15% ПААГ с SDS суммарной фракции белков из клеток *E. coli* HB101 (1—12) и *E. coli* BL21 (DE3) (13—15), трансформированных рекомбинантными плазмидами рРР1 (1, 2, 7), рАМР (3, 4), рМР (5, 8), рСТ1 (9), рСС1 (10), рАСТ1 (11), рСС12 (12), рСС12 (13), рСС2 (14), рСС12 (15), а также не содержащих рекомбинантных плазмид клеток (6). М — маркеры молекулярных масс. Стрелками показаны полосы, соответствующие целевым гибридным белкам

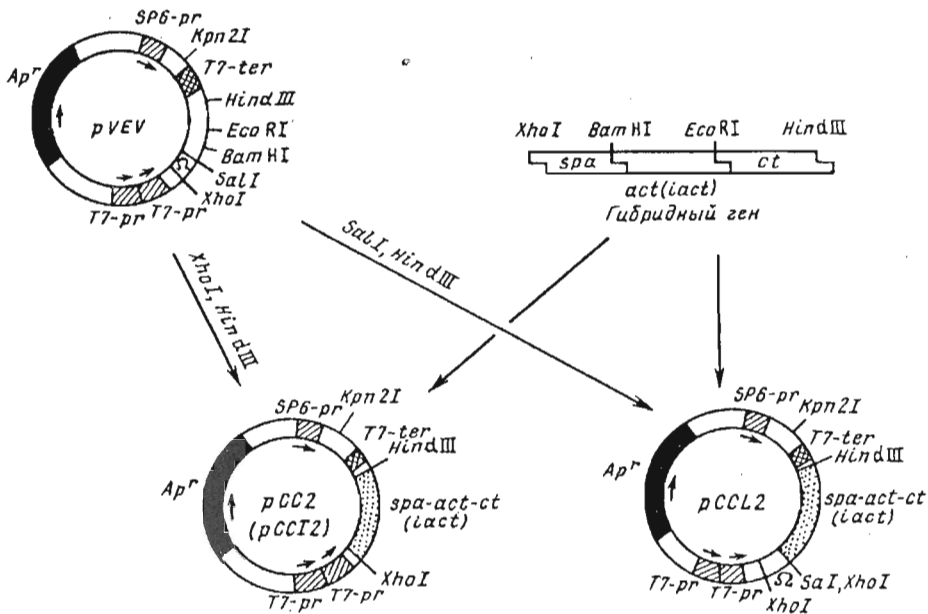


Рис. 5. Схема конструирования экспрессирующих плазмид, содержащих гибридный ген *spa-act(iact)-ct* под контролем тандема T7-промоторов (T7-pr). SP6-pr — промотор SP6-полимеразы; T7-ter — последовательность, соответствующая терминатору фага T7; Ω — последовательность, соответствующая энхансеру трансляции белка оболочки вируса табачной мозаики

введении которой в клетки *E. coli* уровень синтеза целевого гибридного белка составлял около 15% (рис. 4).

Следует отметить, что подобное повышение выхода продукта гетерологической экспрессии в случае комбинации генов сенс- и антисенс-полипептидов является, по-видимому, следствием снижения их протеолитической деградации в клетках *E. coli* и могло бы служить косвенным подтверждением наличия взаимодействия между сенс- и антисенс-молекулами. Если это справедливо, то антисенс-пептиды могут быть полезны для повышения уровня синтеза и стабилизации продуктов гетерологической экспрессии в бактериальных клетках.

После разрушения бактериальных клеток целевые белки обычно находились в нерастворимой фракции в виде тел включения, которые отделяли центрифугированием от цитоплазматических белков (рис. 6). После солиubilизации гибридных белков в 7 М мочеvine или 6 М гуанидинхлориде и удаления последних реагентов диализом рекомбинантные полипептиды, содержащие фрагмент белка А, выделяли аффинной хроматографией на IgG-сефарозе. Аликвоты элюатов анализировали гель-электрофорезом в присутствии SDS с последующим иммуноблоттингом.

Антисенс-полипептиды АМР, АСТ и ИАСТ отщепляли от очищенных гибридных белков действием гидроксилamina [14]. Рекомбинантные кальцитонин и мини-проинсулин отделяли от гибридных белков действием ВгCN по уникальному остатку Met (схема 2) (рис. 7). Обычно более 80% гибрида расщеплялось в стандартных условиях. Целевые полипептиды отделяли от партнера по гибриднему белку IgG-аффинной хроматографией.

Таким образом, полученные в этой работе конструкции способны обеспечивать достаточно эффективный синтез в *E. coli* антисенс-пептидов к кальцитонину и мини-проинсулину человека и их гибридов с соответствующими сенс-пептидами. В настоящее время полученные штаммы-продуценты используются при проведении экспериментов по изучению физико-химических свойств этих рекомбинантных полипептидов, результаты которых будут опубликованы в дальнейшем.

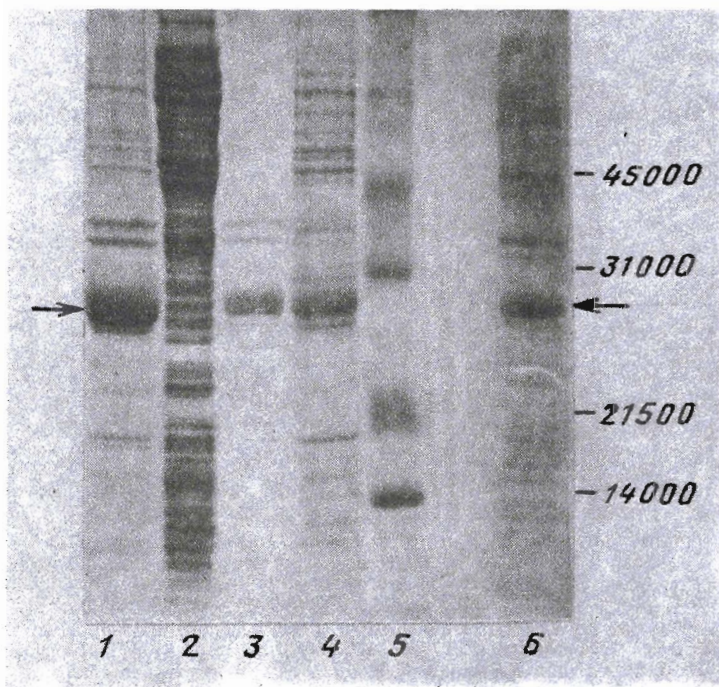


Рис. 6. Электрофорез в 15% ПААГ с SDS белковых фракций при выделении гибрида SPA-AMP-MP из клеток *E. coli* HB101/pRP1. 1 — фракция нерастворимых клеточных белков; 2 — фракция цитоплазматических белков; 3 — гибридный белок после очистки аффинной хроматографией на IgG-сефарозе; 4 — гибридный белок после извлечения из клеточного дебриса экстракцией 6 М гуанидингидрохлоридом; 5 — маркеры молекулярных масс; 6 — суммарная фракция клеточных белков данного штамма

Экспериментальная часть

В работе использованы эндонуклеазы рестрикции фирм Boehringer (ФРГ) и Pharmacia (Швеция), Т4-ДНК-лигаза, Т4-полинуклеотидкиназа и ДНК-полимераза I *E. coli* (фрагмент Кленова) фирмы Pharmacia.

Химический синтез олигонуклеотидов осуществлялся фосфоамидитным методом [24] на синтезаторе 381А фирмы Applied Biosystems (США). Синтетические олигонуклеотиды после удаления защитных групп очищали препаративным электрофорезом в денатурирующем полиакриламидном геле. 5'-Фосфорилирование олигонуклеотидов осуществляли с помощью Т4-полинуклеотидкиназы и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (> 3000 Ки/ммоль). Расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции и реакции ферментативного лигирования проводили как описано ранее [16]. Конструирование рекомбинантных плазмид и трансформацию компетентных клеток *E. coli*, а также скрининг колоний гибридизацией с мечеными синтетическими олигонуклеотидами, выделение плазмид и сиквенс фрагментов ДНК осуществляли согласно работам [17, 25].

Электрофорез белков и полипептидов в пластинах 15 и 20% полиакриламидного геля, содержащего SDS, а также прокрашивание белковых зон кумасси R-250 и иммуноблоттинг проводили как описано в работе [26]. Количество целевого белка в клетках *E. coli* оценивалось после разделения суммарной белковой фракции гель-электрофорезом сканированием пластин, прокрашенных кумасси, на приборе Ultrosan (ЛКВ, Швеция).

Биомассу *E. coli* выращивали на LB-среде, содержащей 0,05% глюкозы и 50 мкг/мл ампициллина. Культуру выращивали при 37° С в течение нескольких часов до оптической плотности A_{600} 0,8—1,0, затем прибавляли индуктор *lac*-оперона

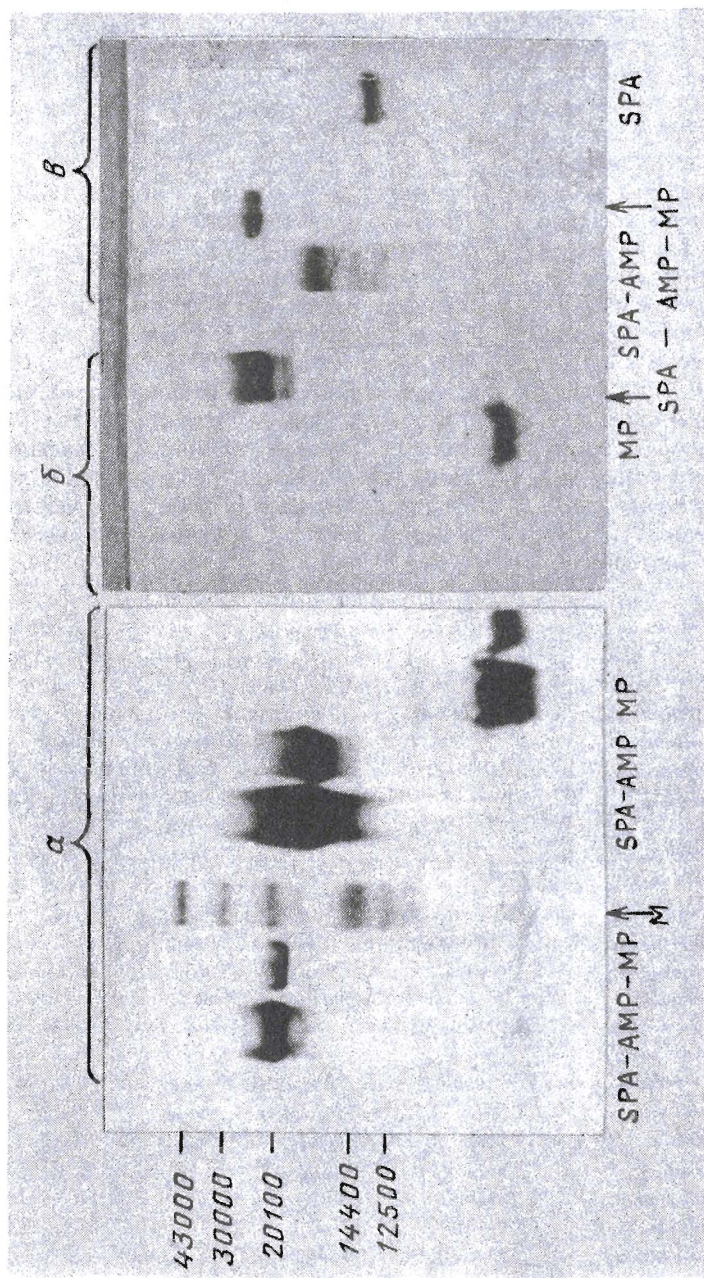


Рис. 7. Анализ очищенного аффинной хроматографией гибридного белка SPA-AMP-MP и продуктов его расщепления: электрофорез в 20% ПААГ, содержащем SDS (а), с последующим иммуноблоттингом с использованием антител к инсулину (б) и PAF-системы на IgG-связывающий домен белка А (в). М — маркеры молекулярных масс

IPTG до концентрации 1 мМ и инкубацию продолжали в течение ночи. Клетки осаждали центрифугированием и хранили при -70°C .

Выделение гибридных белков из биомассы *E. coli* проводили в основном как описано в работе [26]. Клетки разрушали ультразвуком, фракцию растворимых цитоплазматических белков отделяли центрифугированием. Осадок, содержащий клеточный дебрис и нерастворимые клеточные белки, промывали 0,05% раствором тритона X-100 и суспендировали в 6 М гуанидингидрохлориде (или 7 М мочеvine). Клеточный дебрис отделяли центрифугированием, супернатант разбавляли в 6 раз водой и наносили на колонку с IgG-сефарозой 6 Fast flow (Pharmacia, Швеция). Хроматографию на IgG-сефарозе проводили по прилагающейся стандартной прописи. Фракции, содержащие целые белки, объединяли, лиофилизировали и анализировали гель-электрофорезом.

Детектирование и количественную оценку белка А осуществляли иммуноферментным анализом (ELISA) с использованием кроличьего IgG, как описано в работе [16]. Присутствие IgG-связывающего домена белка А визуализовали после электрофореза с использованием PAP-системы (Sigma, США) (рис. 7). Иммуноферментный анализ на наличие рекомбинантных СТ и МР и иммуноблоттинг проводили с использованием кроличьих антител к кальцитонину и инсулину человека (Amersham, США) по стандартной методике [26].

Гибридные белки, содержащие дипептид Asn-Gly, расщепляли инкубацией в 2 М гидроксиламине (0,2 М трис, 6 М гуанидингидрохлорид, pH 9) при 45°C в течение 4 ч и реакционную смесь обессоливали на колонке с сефадексом G-25. Гибридные белки расщепляли бромцаном (50-кратный избыток в расчете на 1 моль остатков метионина) в 70% муравьиной кислоте в течение 24 ч при комнатной температуре. Реакцию останавливали прибавлением воды с последующей лиофилизацией раствора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blalock J. E.//TIVITECH. 1990. V. 8. № 6. P. 140—144.
2. Beattie J.//J. Endocrinol. 1990. V. 126. № 1. P. 179—181.
3. Меклер Л. Б.//Биофизика. 1969. Т. 14. № 4. С. 581—584.
4. Чипенс Г. И., Рудзин Р. В., Иевиня Н. Г.//Биоорг. химия. 1991. Т. 17. № 10. С. 1437—1440.
5. Чипенс Г. И., Иевиня Н. Г., Циликис Э. Э.//Биоорг. химия. 1992. Т. 18. № 12. С. 1445—1453.
6. Bost K. L., Smith E. M., Blalock J. E.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 5. P. 1372—1375.
7. Fassina G., Roller P. P., Olson A. D., Thorgeirsson S. S., Omichinski J. G.//J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 19. P. 11252—11257.
8. Knutson V. P.//J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 28. P. 14146—14151.
9. Shai Y., Flashner M., Chaiken I. M.//Biochemistry. 1987. V. 26. № 3. P. 669—675.
10. Beattie J., Flint D. J.//Biochem. J. 1992. V. 283. № 2. P. 473—478.
11. Guillemette G., Boulay G., Gagon S., Bosse R., Escher E.//Biochem. J. 1989. V. 261. № 1. P. 309.
12. Мышкина Л. А., Коротаев Г. К., Давидович Ю. А.//Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 12. С. 1589—1601.
13. Амосова Т. Н., Попов А. А., Кудрявцева Н. Е., Капитанников Ю. В., Руми Л. Д., Антонов В. К.//Биоорг. химия. 1993. Т. 19. № 4. С. 389—394.
14. Fontana A., Gross E.//Practical Protein Chemistry/Ed. A. Darbre. N. Y.: A Wiley-Intersci. Publ., 1987. P. 108, 109.
15. Ефимов В. А., Бурякова А. А., Пашкова И. Н., Полушин Н. Н., Чахмахчева О. Г.//Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 8. С. 1070—1077.
16. Ефимов В. А., Бурякова А. А., Полушин Н. Н., Пашкова И. Н., Дмитракова Е. В., Чахмахчева О. Г.//Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 4. С. 499—507.
17. Чахмахчева О. Г., Фоти Д., Пашкова И. Н., Полушин Н. Н., Ефимов В. А.//Биоорг. химия. 1992. Т. 18. № 8. С. 1098—1103.
18. Курузов М. А., Шмуклер Б. Е., Сулов О. Н., Заргаров А. А., Абдулаев Н. Г.//Биоорг. химия. 1992. Т. 18. № 5. С. 623—634.
19. De Bellis D., Schwartz I.//Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 5. P. 1311.

20. Alexiev K., Uscheva A., Ivanov I.//Current Microbiol. 1989. V. 18. № 1. P. 5—9.
21. Reverdatto S. V., Beilinson V. A., Fradkov A. F., Polushin N. N., Efimov V. A.//Nucl. Acids Symp. Ser. № 24. 1991. P. 306—307.
22. Studier F. W., Rosenberg A. H., Dunn J. J., Dubendorf J. W.//Meth. Enzymol. 1990. V. 185. P. 60—89.
23. Gallie D. R., Sleat D. E., Watts J. W., Turner P. C., Wilson T. M. A.//Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 8. P. 3257—3273.
24. MacBride L. J., Kierzek A., Beausage S. L., Caruthers M. H.//J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 108. № 8. P. 2040—2048.
25. Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г.//Биооргани. химия. 1982. Т. 8. № 8. С. 2084—2093.
26. Ефимов В. А., Алексюк И. В., Бурякова А. А., Пащикова И. Н., Скиба Н. П., Чахмахчева О. Г.//Биооргани. химия. 1989. Т. 15. № 8. С. 1078—1090.

Поступила в редакцию
2.XI.1993

После доработки
5.I.1994

V. A. Efimov, E. A. Aronova, A. A. Buryakova, A. L. Kalinkina,
A. B. Letunova, A. F. Fradkov, O. G. Chakhmakhcheva

SYNTHESIS AND CLONING OF GENES ENCODING ANTISENSE-PEPTIDES FOR HUMAN CALCITONIN AND MINIPROINSULIN

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow*

Key words: chemical-enzymatic synthesis, cloning, gene expression, sense- and antisense-peptides.

Because of the potential significance of the 'molecular recognition' theory for studies in molecular biology and biotechnology, the theory is worth being examined using methods of chemical-enzymatic gene synthesis, recombinant DNA construction and microbiological peptide synthesis. We therefore undertook the synthesis of human Val¹⁸-calcitonin, miniproinsulin, and the corresponding antisense peptides as model compounds. In designing an experimental system the idea was to combine sense and antisense polypeptides into a single chain and to examine their intramolecular interaction. In this paper the chemical-enzymatic synthesis, cloning and expression of the genes for calcitonin, miniproinsulin, the corresponding antisense peptides and their combinations are described. The recombinant DNAs obtained were able to direct in vivo expression of the target polypeptides as hybride proteins with the IgG-binding domain of the staphylococcal A protein in bacterial cells.