

## Есть ли место антисенс-пептидам в теории молекулярного узнавания?

Е. Ю. Маркелова, А. Д. Швед

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

---

*В обзоре приведены данные исследований взаимодействия сенс-антисенс-пептидов. Результаты рассмотренных работ свидетельствуют, в одних случаях, о высокой аффинности и специфичности связывания, в других — об отсутствии какого-либо взаимодействия между ними. Экспериментальные данные и теоретические рассуждения различных авторов не позволяют в настоящее время однозначно судить о том, имеют ли место антисенс-пептиды в теории молекулярного узнавания. Тем не менее, высказано убеждение в необходимости продолжения поисковых работ в обсуждаемом направлении.*

---

В развитии теории молекулярного узнавания существенное значение имели работы по выявлению закономерностей взаимодействий полипептидов друг с другом, с полинуклеотидами, а также кодирующей роли нуклеиновых кислот в реализации специфичности таких взаимодействий. В настоящем обзоре суммированы данные по исследованиям белок-белковых взаимодействий, где в качестве препаративного инструмента использовались антисенс-пептиды. При анализе доступной литературы встречаются материалы, отражающие весьма противоречивые взгляды на использование антисенс-пептидного подхода. При этом отечественные публикации по данному вопросу отсутствуют. На наш взгляд, эта тема интересна для изложения в кратком обзоре.

В работе [1] о биологическом значении комплементарной гидропатичности аминокислот первенство в теоретическом обосновании комплементарного кодирования как основы специфичности взаимодействия белков отводится Биро [2]. Однако на самом деле первые предсказания на этот счет были опубликованы Меклером [3]. На основе анализа структурно-функциональных взаимоотношений вирусного генома и кодируемых им белков был сформулирован принцип перекрестной стереокомплементарности, согласно которому закономерность

белково-нуклеинового взаимодействия состоит в том, что полипептид должен специфически образовывать комплекс с антисмысловым полинуклеотидом, то есть комплементарным матрице, на которой он был синтезирован [3, 4]. Постулированный принцип предусматривал существование кода взаимодействия между аминокислотами и аминокислот с нуклеотидами, по которому аминокислота способна специфически связываться со своими антикодонами и соответствующими антиаминокислотами [4, 5]. Изложенная теория предполагала, что сенс-пептид, кодируемый мРНК, должен обладать гидропатической комплементарностью по отношению к антисенс-пептиду, кодируемому в той же рамке считывания РНК, комплементарной данной мРНК.

Позднее были представлены экспериментальные доказательства гипотезы о существовании кода молекулярного узнавания на модели взаимодействия сенс-антисенс-пептидов, кодируемых мРНК и их комплементарными копиями для кортикотропина [6], гормона роста, трансферрина, интерлейкина-2 и соответствующих им рецепторов [7]. В работах было показано, что, действительно, молекулярное узнавание некоторых гормонов и их рецепторов обусловлено тем, что кодоны для гидрофобных аминокислот в одной нити ДНК комплементарны кодомам для гидрофильных — в противоположной нити и наоборот, а кодомам для незаряженных аминокислот (слабогидрофильных) комплементарны кодоны для других незаряженных

аминокислот. То есть пептиды, кодируемые комплементарными РНК в той же рамке считывания, должны принимать конформации, способствующие специфическому и высокоаффинному связыванию молекул.

Анализ структуры 41 гормона и нейромодулятора, а также их рецепторов свидетельствовал, что для гормон-рецепторного взаимодействия и связывания должна иметь место комплементарность соответствующих гидрофобных и гидрофильных доменов [8], а мРНК инсулина оказалась на 75 % комплементарной мРНК его рецептора [9].

Благодаря механизму взаимодействия комплементарных аминокислот может осуществляться построение активного центра антитела. По некоторым представлениям [4], схема этого процесса состоит в переводе аминокислотной последовательности антигенной детерминанты в нуклеотидную последовательность через антикодоны транспортных РНК. Допускается возможность связывания тРНК-аминокислотных комплексов с антигеном таким образом, что аминокислота антигенной детерминанты связывается с аминокислотой этого комплекса. В результате вдоль антигенной детерминанты будут выстроены антисенс-аминокислоты, физико-химические свойства которых способны обеспечить наиболее прочную связь с сенс-аминокислотами антигена. Последовательность линейно расположенных антикодонов дискретных молекул тРНК может быть транскрибирована в линейный рибополинуклеотид (антисенс-РНК), который может служить матрицей в трансляции антисенс-пептида — активного центра антитела. Если бы предложенная схема имела место в действительности, это было бы ничем иным, как механизмом передачи информации от белка к РНК, он заполнил бы многие брешы в системе осмысления ряда биодинамических процессов, однако автор этой гипотетической модели своих рассуждений в таком контексте не излагал.

В дальнейшем была сделана попытка объяснить, как гидропатическая комплементарность может приводить к взаимодействию между пептидами [10]. Предполагалось, что гидрофильные остатки обоих взаимодействующих пептидов ориентируются к водному раствору, а гидрофобные — образуют интерфейс между двумя пептидными цепями. Компактная упаковка обуславливается тем, что всякий раз, когда гидрофильный остаток поворачивается по направлению к водной фазе, освобождается пространство, которое может быть занято гидрофобным остатком противоположной цепи. Основным выводом, который, по мнению авторов, можно сделать на основе собственных аналитических дан-

ных, состоит в том, что в попытках найти объяснение сильным взаимодействиям между пептидами основное внимание должно уделяться детальному рассмотрению их гидропатического профиля, составленного из индексов гидропатичности аминокислот вдоль пептидной цепи. Последнее представляет собой как бы «микроскопическое» изображение гидропатичности, позволяющее предсказать, будут ли две пептидные цепи проявлять сильное стремление (притяжение) друг к другу. При подходящей ориентации пептидов сильное взаимодействие между ними должно обеспечиваться скорее последовательностями гидропатических индексов, чем конкретными аминокислотными остатками.

В связи с возникновением и развитием концепции «тетингов» [11] — олигопептидных биорегуляторов — возникла необходимость разработки методов определения мест их локализации в молекулах белков-предшественников, что, по сути, аналогично нахождению сайтов связывания или активных центров полипептидов. С использованием многофакторного анализа была выявлена скрытая симметрия аминокислотных последовательностей в ряде биологически активных белков [12]. Показано, что активные центры белков и пептидов расположены в участках молекул, имеющих симметричную структуру. Скрытую симметрию пептидного полимера обуславливает эквивалентность аминокислот, которая определяется либо подобием и общностью элементов химической структуры — общими корнями кодонов (корнем кодона служит второй нуклеотид триплета), либо их общими физико-химическими свойствами (сходство зарядов, функциональных групп) — при отсутствии общих корней кодонов.

Цитированные выше работы дают возможность по последовательности сенс-пептида с помощью кода корней кодонов аминокислот [3] определять последовательность антисенс-пептида. И хотя на этом пути исследователь в большинстве случаев сталкивается с заметной вырожденностью в наборе аминокислот, проявляющейся в соответствии одного сенс-пептида несколькими антисенс-пептидами, подход, основанный на коде взаимодействия аминокислот, в совокупности с методом определения профиля гидропатичности белков [13] дает значительные шансы для выяснения последовательности и практического получения антисенс-пептидов. Последние могут найти применение как в дальнейшем изучении тонкостей молекулярного узнавания, так и в решении ряда задач практического плана, например, искусственного получения пептидных биорегуляторов типа упомянутых выше тетингов, аналогов моноклональных антител для создания

тест-систем и диагностикумов. Пришитые к носителю антисенс-пептиды могут быть полезны в биотехнологии получения и очистки рекомбинантных белков. Попытки использования антисенс-пептидов в этих направлениях уже предпринимались разными авторами на различных экспериментальных моделях, правда, и с неодинаковым успехом. Ниже мы рассмотрим посвященные данной теме публикации, некоторые из них будут приведены в более детальном изложении.

В одной из начальных попыток экспериментальной проверки изложенных выше теоретических рассуждений в качестве модельных были химически синтезированы 24-членные пептиды, соответствующие кодам РНК, комплементарных мРНК бычьего адреналокортикотропного гормона (АКТГ) и бычьего  $\gamma$ -эндорфина. Иммуоферментным методом было показано связывание гормона адсорбированным антисенс-пептидом АКТГ (обозначенным авторами как ГТКА), тогда как в лунках, покрытых инсулином, связывания АКТГ отмечено не было [14]. Предварительная инкубация АКТГ с ГТКА предотвращала связывание гормона с сорбированным на твердой фазе антисенс-пептидом. Специфичность связывания АКТГ с ГТКА составляла 90 %, а по аффинности оно было сравнимо со связыванием гормона с клеточным рецептором. На модели второй пары —  $\gamma$ -эндорфина и комплементарного ему антисенс-пептида — были получены аналогичные результаты, подтвердившие неслучайность их появления. Интересно, что антитела, выделенные при иммунизации животных антисенс-пептидом, связывались *in vitro* с рецепторами на мышинных адреналовых клетках и вызывали стероидогенный эффект подобно АКТГ, причем они активно конкурировали с АКТГ за клеточные рецепторы.

Понятно, что первичная структура антисенс-пептида будет прямо зависеть от направления ( $5' \rightarrow 3'$  или  $3' \rightarrow 5'$ ) считывания (трансляции) антисенс-РНК. Однако специально подчеркивалось [10, 14],

что гидропатичность аминокислоты определяется центральным нуклеотидом триплета, поэтому независимо от направления считывания присущая нуклеиновым кислотам комплементарность обуславливает и гидропатическую комплементарность кодируемых ими пептидов, способствующую их связыванию.

В последующем было показано [15], что моноклональные антитела к антисенс-пептиду ГТКА также связывались с рецепторами крысиных адреналовых клеток и активно конкурировали с АКТГ за места связывания. С использованием различных пептидных фрагментов ГТКА удалось выявить, что эпитоп данного антигена расположен во второй половине пептидной цепи (с 10-го по 24-й аминокислотный остаток), поскольку только этот из всех испытанных фрагментов по эффективности связывания с анти-ГТКА моноклональными антителами был сравним с полным антисенс-пептидом длиной 24 аминокислотных остатка. Оценивая собственные результаты, авторы отметили, что получение антител к сайтам связывания рецептора общепринятыми методами иммунологии — задача довольно сложная, а предложенный ими путь получения моноклональных антител с использованием антисенс-пептидов имеет существенное преимущество, поскольку не требует выделения и очистки клеточных рецепторов. Предполагается, что такой подход будет полезен в решении множества вопросов, связанных с разработкой гипотезы молекулярного узнавания.

В одной из ранних работ [16] была предпринята попытка использования антисенс-пептида для изучения лиганд-рецепторного узнавания на модели лютеинизирующего релизинг-гормона (ЛГ-РГ). ЛГ-РГ представляет собой декапептид, синтезируемый гипоталамическими нейронами. Попадая в переднюю долю гипофиза, он стимулирует секрецию лютеинизирующего и фолликул-стимулирующего гормонов. В работе был искусственно синтезирован антисенс-декапептид, кодируемый РНК,

ЛГ-РГ

мРНК

Комплементарная РНК

Комплементарный пептид

Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly  
 5' CAG CAC UGG UCC UAU GGA CUG CGC CCU GGA 3'  
 3' GUC GUG ACC AGG AUA CCU GAC GCG GGA CCU 5'  
 Leu Val Pro Gly Ile Ser Gln Ala Arg Ser

Рис. 1. Аминокислотная последовательность комплементарного (антисенсового) декапептида, кодируемого РНК, комплементарной мРНК ЛГ-РГ [16]

комплементарной мРНК ЛГ-РГ (рис. 1). Иммунизация животных этим антисенс-пептидом вызывала образование антител, которые в опытах *in vitro* узнавали рецептор ЛГ-РГ на клетках передней доли гипофиза, поскольку было выявлено, что в иммуноцитохимических исследованиях антитела связывались только с гипофизарными клетками, содержащими и секретирующими лютеинизирующий гормон. Преприкубация антител с антисенс-пептидом предотвращала иммунопероксидазное окрашивание клеток, что свидетельствовало о специфичности антител к пептиду и их направленности к рецепторному сайту связывания ЛГ-РГ. И антитела, и антисенс-пептид подавляли стимулирующее влияние ЛГ-РГ на секрецию клетками лютеинизирующего гормона, поскольку первые связывались с рецепторами, перекрывая к ним доступ ЛГ-РГ, второй — связывал сам гормон, лишая его возможности контакта с рецепторами и стимуляции секреции.

Таким образом, по мнению авторов [16], синтетический декапептид, последовательность которого кодирована РНК, комплементарной мРНК ЛГ-РГ, является если не идентичным, то достаточно подобным рецептору ЛГ-РГ. Они убеждены также, что полученные результаты подтверждают гипотезу о взаимном узнавании пептидных молекул, кодируемых комплементарными участками геномной ДНК.

На модели S-пептида панкреатической рибонуклеазы А были проведены эксперименты с использованием аналитической аффинной хроматографии [17]. Методом зональной элюции было показано, что фиксированный на колонке фермент связывал антисенс-пептид, а растворимый S-пептид препятствовал его связыванию. Степень связывания антисенс-пептида линейно зависела от количества иммобилизованного на колонке S-пептида, но с чистым (незаполненным) матриксом связывания не происходило. То есть было получено подтверждение того, что удерживание на колонке антисенс-пептида определяется аффинностью взаимодействующих сенс- и антисенс-пептидов.

Примерно одинаковая эффективность связывания наблюдалась как для антисенс-пептида 20 → 1 ( $H_2N-Arg^{20}Gly...PheLeu^1-COOH$ ), так и для его инвертированного варианта 1 → 20 ( $H_2N-Leu^1Phe...GlyArg^{20}-COOH$ ). Поскольку использованные варианты антисенс-пептидов имели различную аминокарбоксильную ориентацию, авторы считают маловероятным подобие их конформационных тенденций, в связи с чем взаимодействие обоих с сенс-пептидом, по-видимому, не определяется какими-то признаками компактно свернутой структу-

ры. При использовании укороченных антисенс-пептидов отмечено прогрессивное снижение их аффинного связывания с сенс-пептидом, однако некоторые из них (отвечающие различным последовательностям S-пептида) все же сохраняли аффинность. Эти результаты, по мнению исследователей, свидетельствуют, что контакты сенс- с антисенс-пептидами могут быть многосайтовыми с вовлечением нескольких аминокислотных остатков вдоль пептидной последовательности. Реализация такого взаимодействия осуществляется скорее на протяженных, чем на компактно свернутых формах, хотя определенное количество упорядоченной локальной конформации вдоль протяженной пептидной цепи вполне вероятно. Полученные данные авторы [17] рассматривали как доказательство высокой избирательности в узнавании антисенс- и сенс-пептидов, а также как подтверждение существующих представлений о вкладе гидрофильных и гидрофобных элементов в механизм их взаимодействия. Предсказания относительно практической ориентации результатов работы сводились к возможности использования антисенс-пептидов для развития препаративной аффинной технологии.

Подход, основанный на принципе гидропатической комплементарности, был использован также при изучении взаимодействия между фибронектином (Фн) и его специфическим рецептором на плазматической мембране клетки [18]. Фибронектин, представляющий собой крупный гликопротеидный компонент экстрацеллюлярного матрикса, содержит тетрапептидный сайт Arg-Gly-Asp-Ser, посредством которого связывается со своим клеточным рецептором. К инертным подложкам, покрытым этим тетрапептидом, эффективно прикреплялись клетки, он активно конкурировал с клетками за связывание с подложками, покрытыми Фн, а также обеспечивал выделение клеточного рецептора при аффинной хроматографии клеточных экстрактов. Единичные аминокислотные замены в тетрапептиде лишали его этих свойств. Взяв за основу ранее полученные сведения, авторы синтезировали и использовали в работе несколько олигопептидов (рис. 2). Специфическое взаимодействие антисенсовых гексапептидов (δ и ж) с Arg-Gly-Asp-Ser-доменом молекулы Фн изучали с помощью хроматографии  $^{125}J$ -меченного Фн на аффинной гексапептид-сефарозной колонке. В экспериментах было показано, что 90 % нанесенного на колонку Фн связывалось с ней, 70 % связанного с колонкой Фн освобождалось при элюции раствором гексапептида, содержащего Arg-Gly-Asp-Ser-домен. Замена Asp на Glu снижала эффективность элюции Фн до 25 %. В экспериментах по прямому взаимодей-

<i>a</i>		<b>Gly Arg Gly Asp Ser Pro</b>		<b>GRGDSP</b>
<i>б</i>		<b>GGG CGT GGA GAC AGC CCC</b>		
<i>в</i>	<b>5'</b>	<b>GGC CGT GGG GAC AGT CCA</b>	<b>3'</b>	
<i>г</i>	<b>5'</b>	<b>TGG ACT GTC CCC ACG GCC</b>	<b>3'</b>	
<i>д</i>		<b>Trp Thr Val Pro Thr Ala</b>		<b>WTVPTA</b>
<i>е</i>		<b>GGG GCT GTC TCC ACG GCC</b>		
<i>ж</i>		<b>Gly Ala Val Ser Thr Ala</b>		<b>GAVSTA</b>
<i>з</i>		<b>Gly Ala Gly Ser Thr Ala</b>		<b>GAGSTA</b>
<i>и</i>		<b>Gly Ala Arg Ser Thr Ala</b>		<b>GARSTA</b>

Рис. 2. Последовательность сайта связывания Фн и его предполагаемых рецепторов: *a* — аминокислотная последовательность Фн (справа она представлена в однобуквенном выражении, подчеркнутый тетрапептид — сайт связывания с клеточным рецептором); *б* — нуклеотидная последовательность сайта связывания, выведенная из клонированного Фн человека; *в* — соответствующая нуклеотидная последовательность клонированного Фн крысы; *г* — нуклеотидная последовательность антисенсовой нити ДНК, комплементарной участку, кодирующему Фн крысы (приведен в линии *в*); *д* — аминокислотная последовательность антисенсового пептида сайта связывания Фн крысы; *е* — нуклеотидная последовательность антисенсовой нити ДНК, комплементарной участку, кодирующему сайт связывания Фн человека (приведен в линии *б*); *ж* — аминокислотная последовательность антисенсового пептида сайта связывания Фн человека; *з, и* — антисенсовые пептиды Фн человека с заменами Val на Gly либо Arg; *a-ж* — компиляция из [18]; *з, и* — из [19]

вию меченого лиганда с рецепторами клеток показано, что преинкубация Фн с антисенс-гексапептидом блокирует его связывание с клетками остеосаркомы человека, причем оба антисенс-пептида (и человека, и крысы) были равно активными. По мнению исследователей, полученные данные позволяют использовать принцип гидропатической комплементарности для конструирования пептида, способного взаимодействовать с Arg-Gly-Asp-Ser-доменом, обеспечивающим связывание Фн с клеточным рецептором. Иными словами, пептид, антисенсовый по структуре (и гидропатичности) к этому домену, подобен клеточному рецептору для Фн. В подтверждение своих рассуждений авторы провели эксперимент, показывающий, что антисенсовый гексапептид действительно подобен сайту связывания на молекуле рецептора. Оказалось, что антитела против антисенс-гексапептида к крысиному Фн одинаково эффективно узнают как данный гексапептид, так и антисенс-пептид к Фн человека. Эти антитела позволяли выявлять рецепторы Фн на различных типах клеток человека и животных, а также аффинно очищать рецепторы Фн. Столь выраженную перекрестную реактивность антител, несмотря на существенное различие в структуре антигенов (гексапептидов и, несомненно, рецепторов), авторы объясняют ничтожным различием в их гидропатичности — около 6 % от максимально возможного.

Тот же принцип комплементарной гидропатичности был применен для выявления сайта связывания для Фн и  $\alpha$ -цепи фибриногена (Фг) в тромбоцитарном рецепторном комплексе гликопротейна GPIIb-IIIa [19]. Оба эти лиганда связываются с последним посредством домена, содержащего тетрапептид RGDS. Антитела против бессмысленного пептида WTVPTA (см. рис. 2, *д*) блокировали агрегацию тромбоцитов, а добавление в среду Фг препятствовало этому блоку, поскольку Фг участвует в процессе агрегации тромбоцитов за счет связывания с GPIIb-IIIa на их мембранах. То есть антитела к бессмысленному (комплементарному сайту связывания лиганда) пептиду подобны самому пептиду и способны связываться с его рецептором на клеточной мембране. Пептиды WTVPTA и GAVSTA (см. рис. 2, *д, ж*), кодируемые нитью ДНК, бессмысленной по отношению к кодирующей рецепторный участок для Фн крысы и человека соответственно, с одинаковой эффективностью блокировали связывание меченого GPIIb-IIIa-комплекса с адсорбированным фибронектиновым фрагментом. Данное обстоятельство, как и в предыдущей работе [18], авторы объясняют идентичным профилем гидропатичности упомянутых пептидов, несмотря на существенное различие в их аминокислотной последовательности. С другой стороны, варианты пептида GAVSTA с заменами Val на Gly и Arg — GAGSTA и GARSTA (см. рис. 2, *з, и*) —

были лишены ингибиторной активности, присущей исходному — GAVSTA. Замена всего лишь одной аминокислоты приводит к существенному изменению профиля гидропатичности пептида, если аминокислота для вставки не комплементарна замещенной. Именно этим, по мнению исследователей, объясняется утрата ингибиторной активности измененных пептидов GAGSTA и GARSTA.

Тот же подход был использован в экспериментах на модели ангиотензина II (А II) крысы [20]. Антисенс-октапептид (II A), кодируемый РНК, комплементарной мРНК гормона А II, специфически ингибировал связывание последнего с рецепторами на мембранах надпочечника крысы, т. е. пептид II A по своим физико-химическим свойствам подобен рецепторному сайту связывания для А II. Антитела к комплементарному антисенс-пептиду II A блокировали связывание меченого гормона с клеточными рецепторами и подавляли секрецию адреналовыми клетками альдостерона, другими словами проявляли свойства антагониста А II. Кроме того, с помощью анти-II A-антител авторам удалось аффинно выделить из растворенных адреналовых мембран единичный белок, представляющий собой рецептор гормона, поскольку он связывался с меченым А II, а преинкубация рецепторного белка с немеченым А II лишала способности меченого лиганда связываться с рецептором.

Интересным было развитие этой работы на той же модели, где авторы [21], используя два разных подхода, получили два новых антагониста А II. Комплементарный пептид, последовательность которого (H<sub>2</sub>N-K-G-V-Y-M-H-A-L-CO<sub>2</sub>H) определена в работе [21], взаимодействовал непосредственно с А II, тогда как антисенсовый пептид с последовательностью (H<sub>2</sub>N-E-G-V-Y-V-H-P-V-CO<sub>2</sub>H), выясненной методом [14], взаимодействовал только с А II рецептором. Для определения связывания авторы использовали три метода. Результаты, как и полученные ранее на модели опийного рецептора [22, 23], являются, по мнению авторов, убедительным свидетельством в пользу того, что лиганды и их сайты связывания с рецептором могут кодироваться комплементарными нуклеотидными последовательностями, а подход с использованием антисенс-пептидов вполне применим для изучения лиганд-рецепторных взаимодействий, а также для выделения рецепторов в чистом виде.

Антагонисты ангиотензина, способные блокировать его клеточные рецепторы, могут быть физиологически специфическими агентами для терапии гипертоний. Поэтому выявление детерминант, активно связывающихся с рецептором, способствовало бы ускорению разработки таких терапевтиче-

ских средств. Преследуя эту цель, было проведено испытание [24] ряда синтетических пептидов, кодируемых последовательностью, комплементарной мРНК А II. Оказалось, что анти-А II-пептиды способны ингибировать влияние ангиотензина на сокращение гладкой мускулатуры матки крысы. Действуя подобно антагонистам типа I, антисенс-пептиды на рецепторах А II связывались с негативными модулирующими сайтами, которые отличаются от сайтов связывания собственно ангиотензина. Данные экспериментов, по мнению авторов, иллюстрируют наличие на А II-рецепторах сайтов связывания ингибиторов ангиотензина, которые существуют для приспособления природно возникающих ингибиторов, кодируемых нитью ДНК, комплементарной нити, кодирующей А II.

Синтетические антисенс-пептиды, кодируемые антисмысловой нитью ДНК и соответствующие 20 аминокислотным остаткам N-концевой части предшественника Arg<sup>8</sup>-вазопрессина (АВП) и связывающего его белка бычьего нейрофизина II (БНФ II), аффинно связывались со своими сенс-партнерами — полипептидами АВП и БНФ II [25]. Связывание сенс- и антисенс-пептидов отличалось высокой селективностью, так как при хроматографии кислотных экстрактов из задней доли гипофиза быка антисенс-АВП удерживал на колонке только АВП, но не окситоцин, а антисенс-БНФ II связывался только с полипептидом БНФ II, но не с БНФ I (нейрофизин, биосинтетически относящийся к окситоцину). Различные варианты условий (возрастающие концентрации 2-пропанола, ионной силы элюирующих растворов) элюции гормонов, связанных на колонках с антисенс-пептидом, свидетельствовали, что в узнавании сенс-антисенс партнеров имеют место как ионные, так и гидрофобные взаимодействия.

Обнаружение селективного узнавания АВП антисенс-пептидом [25] стимулировало разработку метода выделения рецепторов вазопрессина из различных клеточных источников [26]. При планировании работы авторы исходили из предположения, что вазопрессин, одной частью аминокислотной последовательности связанный с клеточным рецептором, другой частью аминокислот будет связываться с иммобилизованным на носителе 20-мерным антисенс-пептидом. Эксперименты показали, что, действительно, солюбилизованный [<sup>3</sup>H]АВП-рецепторный комплекс из мембран печени крысы связывался с антисенс-пептидной колонкой, а последующая его элюция позволяла получить в чистом виде этот рецептор, пригодный для дальнейшего исследования его свойств в процессах лиганд-рецепторного узнавания. Оценивая полу-

ченные результаты, авторы пытались механистически объяснить способ белок-белкового взаимодействия в использованной экспериментальной модели. Их рассуждения опирались на ранее сформулированную гипотезу [4, 5, 13], согласно которой сенс- и антисенс-пептиды взаимодействуют вследствие узнавания гидропатических признаков друг друга и связываются через многоточечные контакты вдоль пептидных цепей, которые, по-видимому, должны быть скорее конформационно вытянутыми, чем свернутыми в компактную трехмерную структуру. Биологически активные пептиды, связавшись со своими рецепторами, могут иметь еще достаточно экспонированных группировок для образования избирательных контактов с иммобилизованным антисенс-пептидом, что должно обеспечивать селективное удерживание на колонке лиганд-рецепторных комплексов. В условиях связывания антисенс-пептид может ограничивать конформационную подвижность сенс-пептида до состояния, способствующего его связывающей возможности, и, как следствие, усилению связывания с рецептором.

В принципе, получение рецепторных участков с помощью аффинных колонок с иммобилизованным антисенс-пептидом представляется вполне реальным для фракционирования любого пептида или белкового рецептора, однако его универсальность не определена, а отсюда — сомнительна. Тем не менее, результаты, полученные на модели рецептора вазопрессина [25, 26], авторы рассматривают как достаточно убедительные, чтобы признать этот подход к получению рецепторов биологически активных белков и пептидов достаточно эффективным. Это предположение подтвердила работа [27] по очистке рскомбинантного  $\beta$ -интерферона человека с помощью иммобилизованных антисенсовых пептидов. Были синтезированы пептиды, соответствующие 1—14, 42—54, 103—115 аминокислотным фрагментам последовательности  $\beta$ -интерферона человека. Все антисенсовые пептиды показали селективную аффинность по отношению к  $\beta$ -интерферону, позволившую достичь 10-кратной очистки белка из культуры клеток млекопитающих.

Ощутимую экспериментальную поддержку те-

ории молекулярного узнавания составили результаты испытания антисенс-пептидов к овечьему пролактину (оПр) [28]. На основании известных данных о критической роли His27 и His30 оПр в его связывании с рецептором были синтезированы два антисенс-пептида к области с 23-го по 35-й аминокислотный остаток молекулы оПр в обоих направлениях — 5'→3' и 3'→5', а также сенс-пептид того же участка. Как и ожидалось, оба антисенс-пептида связывались на твердой фазе как с сенс-пептидом, так и с оПр, антитела против антисенс-пептидов конкурентно блокировали связывание. Интересно, что антисенс-тетрапептид VMNV, гидропатически комплементарный участку 27—30 оПр, не связывался с нелактогенными гормонами, не имеющими участка, комплементарного пептиду VMNV, однако эффективно связывался с сенс-пептидом и оПр, что подтвердило предположение о решающей роли пептида 27—30 в связывании с клеточным рецептором [29].

Ранее опубликованные результаты [28] были использованы нами для определения участков пролактина, которые бы эффективно взаимодействовали с антисенс-пептидами. Для выяснения местоположения этих участков мы провели сравнительный анализ последовательностей аминокислот пролактинов из различных организмов, а также анализ вторичной структуры пролактина человека. В результате были определены три участка-мишени молекулы гормона для исследования взаимодействия с соответствующими им антисенсовыми пептидами, которые, по нашему мнению, могли бы эффективно связываться с молекулой пролактина.

Первый олигопептид (рис. 3) является структурно антисенсовым относительно участка 5—13 аминокислот пролактина человека. Этот фрагмент пролактина был использован [30] для получения специфических антител, что представляет перспективным при производстве вакцин или диагностических реагентов. Синтезированный антисенсовый олигопептид использовался нами как специфический носитель. Предполагалось, что радиоиммунологическим методом нам удастся обнаружить замедление хроматографической подвиж-

*Пролактин человека*

*мРНК*

*Комплементарная РНК*

*Антисенсовый пептид*

**ProGlyGlyAlaAlaArgCysGlnVal**  
 5' **CCCGGCGGGGCGCCCGAUGCCAGGUG** 3'  
 3' **GGGCGCCCCGACGGGCUACGGUCCAC** 5'  
**HisLeuAlaSerGlySerProAlaGly**

Рис. 3. Последовательность антисенс-пептида, комплементарного участку 5—13 аминокислот пролактина человека

ности рекомбинантного пролактина [31] из культуры клеток насекомых на колонке с бромциансефарозой, связанной с олигопептидом. Однако связывания с колонкой использованного пролактина этим методом выявлено не было, что оставило без решения вопрос о способности использованного пептида взаимодействовать с гормоном. Поскольку рекомбинантный пролактин не был достаточно охарактеризован, то вероятно, что он представляет собой некую химерную белковую структуру, где участок-мишень для антисенс-пептида недоступен; возможно также, что раствор рекомбинантного продукта нужно было предварительно очистить.

Второй использованный нами пептид является структурно антисенсовым к участку молекулы пролактина, консервативному для пролактинов из различных организмов [32]. Кроме того, показано [33], что Lys69 участвует в формировании сайта связывания 1 пролактина и рецептора (пролактин связывается с двумя молекулами рецептора пролактина, определенными как сайты связывания 1 и 2). Работы по химической модификации [29, 34] позволили определить структуру третьего олигопептида, бессмысленного к фрагменту молекулы гормона, который вовлекается во взаимодействие с рецептором и является существенным для митогенетической активности пролактина. Исследования взаимодействия полученных нами антисенс-пептидов с пролактином человека продолжаются.

Существенный вклад в выяснение роли гидропатичной комплементарности в узнавании был сделан в исследовании, проведенном на модели белка *c-raf Escherichia coli* [35]. Авторы синтезировали два антисенс-пептида, один из которых соответствовал коду антисенс-РНК по отношению к мРНК *c-raf*, другой — компьютерной программы, способной рассчитать последовательность пептида с профилем гидропатичности, комплементарным заданной последовательности аминокислот. В последнем случае это был 20-членный пептид, отвечающий участку последовательности от 356-го до 375-го аминокислотного остатка белка *c-raf*. Хотя гомология аминокислотного состава антисенс-пептидов не превышала 50 %, их гидропатические профили были почти идентичными. Специфическое связывание наблюдалось при нанесении любого из антисенс-пептидов на колонку с иммобилизованным 20-членным *c-raf*-пептидом либо последнего на колонку с одним пришитым антисенс-пептидом. Одинаковой способностью к связыванию обладали антисенс-пептиды, синтезированные с использованием аминокислот как L-, так и D-конформации. По мнению авторов, гидропатические характеристики конкретной аминокислоты являются ее физико-хи-

мическим свойством и не определяют ее стереохимической конфигурации, из чего следует, что гидропатический профиль пептидов в L- или D-конформации должен быть одинаков. Экспериментальные данные исследователи оценивают как достаточно убедительное доказательство в пользу того, что взаимное узнавание и связывание сенс- и антисенс-пептидов не зависят ни от их аминокислотной последовательности, ни от конформации. Предполагается, что связывание обусловлено, скорее всего, профилями гидропатичности взаимодействующих пептидов.

Здесь уместно упомянуть данные [36] по испытанию связывания с изолированным клеточным рецептором октапептида, частично гомологичного соответствующему участку А II, а также его различных аналогов и производных. В работе показано, что амидирование или ацилирование концевых остатков октапептида существенно снижало эффективность его связывания с рецептором, а замена L- на D-аминокислоты полностью лишала его способности к узнаванию рецептора. Из полученных результатов был сделан вывод о том, что рецептор узнает специфическую конфигурацию лиганда, поэтому при конструировании пептидных антагонистов следует признать важным моментом определение их предпочтительной конформации.

Интересные результаты были получены в скрупулезно проведенном исследовании [37] на модели инсулина и синтетического антисенс-октапептида, соответствующего антисмысловой нити ДНК этого гормона. Синтезированный инсулин-связывающий пептид (ИСП) был комплементарен участку связывания инсулина с клеточным рецептором, а именно: аминокислотным остаткам 22—27 его В-цепи. Инсулин связывался с иммобилизованным на твердой фазе ИСП примерно с одинаковой скоростью при 4 и 25 °С. Это связывание не было обусловлено взаимодействием сульфгидрильных групп в цепи инсулина и антисенс-пептида, поскольку их алкилирование не препятствовало связыванию. О специфичности связывания свидетельствовали эксперименты, где вместо инсулина использовали другие гормоны и синтетические пептиды случайной последовательности, с которыми ИСП связывался на 2—2,5 порядка слабее инсулина. Специфичность взаимодействия подтверждена также экспериментами по конкурентному связыванию, где меченый инсулин отдельно либо в смеси с проинсулином, А- или В-цепью инсулина, ИСП вносили в пластиковые кюветы с адсорбированным ИСП, а также инсулином, лишенным восьми С-концевых остатков В-цепи. Оказалось, что пептиды, не имевшие последовательностей, комплементарных ИСП (А-



цепь и дезоктапептидный инсулин), не влияли на связывание  $^{125}\text{I}$ -инсулина с иммобилизованным антисенс-пептидом. Далее в работе было показано, что инкубация инсулина с ИСП снижала на 50 % связывание гормона с его рецептором на Т3-L1 адипоцитах — клетках, отвечающих на воздействие инсулина поглощением меченой 2-дезоксиглюкозы. Однако изменения уровня поглощения последней в таких условиях не наблюдалось. Поликлональные антитела против ИСП, по сути представляющего собой инсулиновый клеточный рецептор, также на 50 % подавляли связывание с ним гормона, но не влияли на стимулированное инсулином поглощение глюкозы. Полученные данные, по мнению автора, дают основание утверждать, что молекула инсулина содержит, по меньшей мере, два домена, ответственных за связывание с клеточным рецептором, а один из них обеспечивает не только связывание, но и стимулирует клетки к поглощению глюкозы.

Убедительно выглядят данные [38], полученные при изучении взаимодействия цистатина С человека (ингибитора цистеиновых протеаз) с С4 (четвертым компонентом комплемента) и антисенс-пептидом, комплементарным сегменту 55—59 аминокислотных остатков цистатина С, наиболее консервативному среди всех известных цистатинов. Анализ базы данных белковых последовательностей выявил наличие такой антисенсовой последовательности в С4 (позиция в районе 611—614 аминокислотных остатков). Эксперименты показали, что цистатин С связывается с С4 благодаря наличию у последнего антисенс-участка по отношению к сегменту 55—59 цистатина С, поскольку при аффинной хроматографии с последующим иммуноферментным анализом было выявлено конкурентное, зависящее от дозы, ингибирование связывания этих белков в присутствии искусственно синтезированного антисенс-пептида. На связывание не влияла преинкубация цистатина С с иными белками, не имеющими комплементарной антисенс-пептидной последовательности, но сенс-пептид 55—59, пришитый к БСА, взаимодействовал с С4 так же активно, как и цистатин С. Поскольку эффективность связывания критично зависела от ионной силы реакционной среды, предполагалось, что в механизме взаимного узнавания сенс- и антисенс-пептидов существенную роль играют как зарядное окружение, так и трехмерная структура пептидов.

На основании ряда положительных результатов, полученных с использованием антисенс-пептидов, последние стали рассматривать как возможный инструмент в изучении механизма молекуляр-

ного узнавания [39], а также в разработке аффинных методов разделения макромолекул [40]. И хотя механизм, контролирующий взаимодействие антисенсовых или, в более общей форме, гидропатически антикомплемментарных пептидов с их природными партнерами, далек от полного понимания, автор непоколебим в убеждении относительно перспективности этого подхода для исследовательских и биотехнологических целей. Недавно в оценке методов препаративной аффинной хроматографии искусственно синтезированные антисенс-пептиды также упоминались как возможные эффективные лиганды для выделения специфических белков и пептидов [41].

Используя технику создания множественных антигенных пептидов [42], была осуществлена попытка получения восьмимерных антисенс-пептидов длиной 14 аминокислотных остатков, комплементарных большому эндотелину (асБЭТ), пришитых к октадентатной полилизиновой сердцевине [43]. Таким же путем получали мультимерные формы 17-членных фрагментов БЭТ. В экспериментах было показано 100-кратное повышение аффинности связывания мультимерных форм пептидов в сравнении с активностью связывания мономерных пептидов. Результаты позволили авторам утверждать, что мультимеризация гидропатически комплементарных пептидов может повысить возможности количественной оценки связывающих свойств комплементарных пептидов.

Наряду с сообщениями об эффективном связывании антисенс- и сенс-пептидов [44] существуют работы, показавшие отсутствие каких-либо положительных результатов изучения их взаимодействия. Так, в одной из публикаций [45] на основании экспериментальных данных и теоретических соображений высказывались сомнения относительно применимости данного подхода в ряде опубликованных исследований. Авторам на модели паратиреоидного гормона человека не удалось выявить его связывания с антисенс-пептидом, хотя рассчитанные профили гидропатичности антисенс-пептида и соответствующей ему сенс-последовательности аминокислот были строго антипараллельными: гидрофобным доменам одной последовательности соответствовали гидрофильные в ее комплементарной паре и наоборот. Исследователи отмечали, что аналогичные результаты (отсутствие связывания) были получены также другими авторами на модели гипоталамического гонадотропин-релизинг гормона, однако не исключали полностью, что данный подход может дать положительные результаты при изучении других лигандов, поскольку разные пептиды обычно свертываются в конформации,

способствующие совместному сближению взаимодействующих эпитопов.

Позднее появились подобные публикации, касающиеся антисенс-пептидного подхода на модели А II [46, 47]. Связывания гормона (А II) с антисенс-пептидом не было выявлено [46] ни в экспериментах по его стероидогенному действию на адреналовых клетках, ни в опытах по стимуляции сократительной активности гладких мышц на изолированных полосках аорты животных. Не наблюдалось также ингибирования связывания А II с мембранами коры надпочечников в присутствии различных концентраций антисенс-пептида (II А).

При точном следовании методикам ранее опубликованной работы [20] не удалось воспроизвести ни одного из полученных в ней результатов [47] по связыванию А II с антисенс-пептидом. Авторам удалось выделить антитела в высоких титрах при иммунизации животных препаратами А II и II А, однако анти-II А-антитела не связывались ни с А II, ни с его рецептором на гладкомышечных клетках крысы. На основании собственных данных исследователи подвергли сомнению предположение [2] о том, что белки, специфически взаимодействующие с рецептором, кодируются нуклеотидной последовательностью, комплементарной последовательности, кодирующей рецептор, и заключили, что «идея использования антител против комплементарных пептидов как инструмента для выделения соответствующих рецепторов неприменима в любом случае».

В ответах на критические замечания оппонентов [46, 47] авторы публикации [20] утверждают [48], что они не нашли ни одного подходящего аргумента для объяснения невозможности их результатов, кроме различий в использованных экспериментальных системах. Труднообъяснимым они считают отсутствие интерференции II А с исследовании блока связывания мочного А II с рецептором, поскольку подтверждение положительного эффекта на этой модели уже было представлено в работе других авторов [36], а также ссылаются еще на десятки публикаций, описавших существенные успехи в использовании антисенс-пептидов в различных экспериментальных моделях, что, по их мнению, является убедительным доказательством действенности этого подхода для решения ряда научных и биотехнологических задач.

В недавней работе [49] было показано, что ни один из антисенс-пептидов, комплементарных наиболее экспонированным участкам трех различных ферментов, не связывался со своим сенс-партнером, несмотря на идсальную антикомплемментар-

ность их профилей гидропатичности. Обсуждая полученные результаты, авторы высказали суждение о необходимости дальнейших исследований для выяснения возможности взаимодействия комплементарных пептидов в иных условиях. Однако все же предполагалось, что отсутствие связывания трех пептидов с комплементарными им антисенс-пептидами в проведенных экспериментах коррелирует с подобными результатами ряда других авторов, также не обнаруживших взаимодействия между парами комплементарных пептидов. Поэтому, несмотря на биохимическую и биологическую привлекательность, теория молекулярного узнавания не заслуживает всеобщего признания, а возможность взаимодействия сенс- и антисенс-пептидов непредсказуема и строго зависит от типа взаимодействующих пептидов. К тому же химическая основа такого взаимодействия остается невыясненной ввиду отсутствия данных ЯМР или рентгеноструктурного анализа специфических пар сенс-/антисенс-пептидов.

Использование антисенс-пептида ГТКА (1—24 аминокислотных остатка АКТГ человека) как антигена не привело к получению рецептор-специфических антител [50]. Антитела, предварительно очищенные от молекул IgG и неочищенные, не связывались с АКТГ, МСГ (рецептор АКТГ) и антителами к АКТГ. Однако при больших концентрациях пептид связывался с аффинным сайтом клеток меланомы мыши В16 и индуцировал образование меланина в этих клетках. Этот сайт был независим от сайта связывания МСГ/АКТГ.

Отсутствие взаимодействия антисенс-пептидов (ПВА) с [8-arginine]вазопрессином (АВП) отмечено в работе [51], где были синтезированы два пептида, комплементарных АВП крысы (H-Ser-Ser-Trp-Ala-Val-Leu-Glu-Val-Ala-OH) и быка (H-Ala-Pro-Trp-Ala-Val-Leu-Glu-Val-Ala-OH). Исследовали взаимодействие пептидов с вазопрессином и V2 рецептором. Оба пептида не связывались с гормоном или рецептором мембран почек быка, клетками LLC-PK1 почек свиньи и не влияли на индукцию вазопрессином сАМР в LLC-PK1 клетках. ПВА крысы изучали с помощью вазопрессин-специфических поликлональных и моноклональных антител с различной эпитопной специфичностью. Авторы не наблюдали ингибирования связывания [<sup>3</sup>H]АВП с антителами на твердой и в жидкой фазе после преинкубации с ПВА.

Анализ частоты использования кодонов [52] показал, что в антисенс-последовательностях должно быть большое число стоп-кодонов. Это ставит под сомнение возможность синтеза с антисенс-нити ДНК протяженных белков, каковыми являются

рецепторы. Согласно расчетам [53], между стоп-кодонами может быть кодировано в среднем около 50 аминокислот, то есть усредненно любой из белковых продуктов, кодируемых антисенс-ДНК, будет по длине намного короче кодируемого транслируемой нитью. Таким образом, допущение [20—23] о вероятном синтезе рецепторного белка с нити, комплементарной нити, кодирующей лиганд, по-видимому, следует признать ошибочным.

При анализе аминокислотной последовательности, кодируемой смысловой нитью ДНК и нетранслируемой (антисмысловой), была замечена определенная зависимость структуры антисенс-пептида от его аминокислотного состава, кодируемого антикодонами транслируемой мРНК [53]. Авторы составили диаграмму всех возможных сенс-антисенс-замен кодонов аминокислот для случая, если бы антисмысловая нить ДНК кодировала транслируемый белок. Оказалось, что кодоны всех аминокислот можно распределить на три независимые группы, антикодоны которых будут диктовать построение пептидной последовательности с определенными свойствами для каждой группы. Так, I группа включает аминокислоты, наиболее часто встречающиеся в  $\alpha$ -спиралях белков, аминокислоты II группы наиболее часто составляют  $\beta$ -изгибы, аминокислоты III группы преимущественно образуют вытянутые  $\beta$ -структуры. Это обуславливает возможность того, что антисенс-кодоны преимущественно обеспечивают включение аминокислот, сохраняющих вторичную структуру полипептида, сходную с таковой для белка, кодируемого сенс-кодонами. Исключение, однако, составляет несколько аминокислот, антисенс-кодоны которых кодируют включение аминокислот, искажающих вторичную структуру антисенс-пептида в сравнении с реальным (транслируемым) белком. На основе таблицы частоты использования кодонов был проведен анализ вторичной структуры предполагаемых антисенс-белков к 135 различным белкам человека, и значительных различий (искажений) вторичной структуры транслируемых и антисенс-белков обнаружено не было. Однако было показано, что в случае, когда транслируемый белок имеет тенденцию к преобладанию гидрофильных свойств, то антисенс-белку будет присуща повышенная гидрофобность. Важным фактором, определяющим структуру белков, является также наличие боковых цепей аминокислот, поэтому если антисенс-нить ДНК кодирует аминокислоты с большими боковыми цепями вместо аминокислот с малыми боковыми группами, кодируемых сенс-нитью, это будет приводить к искажению вторичной структуры антисенс-полипептидной цепи в сравнении со струк-

турой сенс-белка. Таким образом, в зависимости от аминокислот, включенных в антисенс-пептид, его вторичная структура может быть либо подобной реальному белку, либо существенно искаженной.

Не было обнаружено связи между структурой белка и внутренними антисенсами, т. е. последовательностями аминокислот в одной цепи [54]. Авторы провели компьютерный анализ кодирующих последовательностей для 132 белков, результат для каждой специфической последовательности сравнивали с 1000 случайными последовательностями нуклеиновых кислот, длина и состав пар оснований которых были идентичными природным. Исследования проводили для всех трех рамок считывания. Обнаружено, что для первой, обычной рамки считывания содержание внутренних антисенсов ниже, чем случайных последовательностей, тогда как для второй — результаты были значительно выше. Содержание внутренних антисенсов в рамке три не отличалось от случайных последовательностей. Количество внутренних антисенсов в рамках считывания два и три коррелирует с содержанием GC в центральном положении кодонов в этих рамках, но подобной корреляции нет в рамке считывания один. Не обнаружено соответствия длины цепи. Качественно сходные результаты были получены, когда случайная модель была ограничена таким же соотношением пуринов/пиримидин, как в природных последовательностях в каждом положении кодона, но в случае рамки считывания три содержание внутренних антисенсов было значительно больше, чем случайных последовательностей. Эти результаты показывают, что содержание внутренних антисенсов в правильной рамке считывания имеет качественно отличающееся от двух других рамок происхождение. Значительное содержание в рамках два и три связано с асимметричным распределением G и C в кодонах, тогда как низкое количество внутренних антисенсов в рамке один может служить подтверждением эволюционного отбора против внутренних антисенсов.

Однако столь категоричные выводы не убедили в беспредметности изучения взаимодействий внутренних антисенсов с сенс-участками [55]. Было показано наличие сенсовых и соответствующих им антисенсовых участков (названных antisense homology boxes) длиной порядка 15 аминокислотных остатков внутри молекулы белка. Сенс- и антисенс-участки разделены, примерно, 50 аминокислотными остатками. Был синтезирован антисенсовый пептид, гомологичный фрагменту рецептора эндотелина A (CALSVDRYRAVASW), который вел себя как специфический ингибитор эндотелина (ET-1) и блокировал у крыс шок, вызванный эндо-

токсинам. Возможно, способность сенс/антисенс-пептидов узнавать и связываться друг с другом имеет значение для образования пространственной структуры белка. Это допущение созвучно ранее опубликованным предположениям [56].

Опубликованная работа [55] имела продолжение на модели С5а-рецептора и С5а-анафилотоксина [57]. Два участка антисенсовой гомологии были обнаружены в С5а и восемь — внутри С5а-рецептора. Синтезировали несколько антисенсовых пептидов и проверили их способность перекрывать функции С5а-рецептора. Фрагмент С5а-рецептора, соответствующий участку 226—245 аминокислотных остатков, антисенсовый по отношению к С5а, проявлял себя как антагонист С5а при высоких концентрациях (больше 0,5 мкМ). Однако, когда клетки И737 с С5а-рецептором преинкубировали с этим пептидом в значительно меньших концентрациях (менее 40 пМ), пептид проявлял себя как агонист. Другой пептид, соответствующий участку 10—27 аминокислотных остатков С5а-рецептора, взаимодействовал с соответствующими антисенсовыми пептидами, последовательность которых антисенсово гомологична участкам 37—43 и 61—74 аминокислотной последовательности С5а-анафилотоксина. Таким образом, С5а-рецептор может связываться с С5а в двух различных ориентациях. Два других пептида, антисенсовых к участку 12—27 аминокислотной последовательности PL12 и участку 61—74 PL61, также проявляли ингибирующую активность. Локализация участков сенс-антисенсового взаимодействия в белке может помочь в идентификации пептидов, функции которых, возможно, перекрываются с белком-мишенью.

Таким образом, в научной литературе можно найти как публикации, свидетельствующие о чрезвычайно эффективном взаимодействии сенс- и антисенс-пептидов, так и работы, отрицающие возможность такого взаимодействия. По-видимому, однозначный ответ на вопрос, вынесенный в заголовке данной публикации, в настоящее время был бы преждевременным. Привлекательность идеи, интригующие результаты значительного количества экспериментальных работ, заманчивые перспективы использования антисенс-пептидов все еще удерживают исследователей от решения о полном отказе от них. Несмотря на ощутимые затраты, связанные с синтезом пептидов, количество которых должно быть исчерпывающим для решения поставленной экспериментальной задачи, поисковые работы в обсуждаемом направлении, несомненно, заслуживают поощрения. Существующий опыт, арсенал методических подходов, техника компьютерного анализа будут способствовать более целе-

направленному планированию и проведению экспериментов, снижению риска неудач и неопределенности в отыскании положительных или негативных ответов. Возможно, разрабатываемые генноинженерные подходы [58] к получению пептидов со временем дополнят (либо вытеснят) существующие методы химического их синтеза, что также может удешевить и ускорить выполнение исследований.

О. Ю. Маркелова, А. Д. Швед

Чи мають місце антисенс-пептиди в теорії молекулярного впізнавання?

Резюме

В огляді наведено результати довіджень взаємодії сенс-антисенс-пептидів, які свідчать, з одного боку, про високу афінність і специфічність зв'язування, з другого — про відсутність будь-якої взаємодії між ними. Експериментальні дані і теоретичні викладки різних авторів не дозволяють однозначно судити про те, чи мають місце антисенс-пептиди в теорії молекулярного впізнавання. Однак є впевненість у необхідності продовження пошукових робіт в обговорюваному напрямку.

E. Y. Markelova, A. D. Shved

Whether antisense peptides take place in molecular recognition theory?

Summary

A review summarizes the literature data devoted to sense-antisense peptide recognition. Results of cited papers reveal as high affinity and selectivity of sense-antisense peptide binding, as lack such an interaction. Experimental and theoretical data do not allow to say unequivocally to-day if antisense peptides take part in molecular recognition theory. Nevertheless it is expressed conviction that further investigations in this field are necessary.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Brentani R. R. Biological implications of complementary hydrophathy of amino acids // J. Theor. Biol.—1988.—135.—Р. 495—499.
2. Biro J.-C. Comparative analysis of specificity in protein-protein interactions // Med. Hypotheses.—1981.—7.—Р. 981—993.
3. Меклер Л. Б. О специфическом избирательном взаимодействии между аминокислотными остатками полипептидных цепей // Биофизика.—1969.—14, № 4.—С. 581—584.
4. Меклер Л. Б. О происхождении живых клеток: эволюция биологически значимых молекул — переход химической эволюции в биологическую. Новый подход к проблеме // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева.—1980.—25, № 4.—С. 460—473.
5. Идлис Р. Г. Принцип перекрестной стереокомплемментарности и симметрия генетического кода // Там же.—С. 431—434.
6. Blalock J. E., Smith E. M. Hydrophathic anti-complementarity of amino acids based on the genetic code // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1984.—121.—Р. 203—207.
7. Bost K. L., Smith E. M., Blalock J. E. Regions of complementarity between the messenger RNAs for epidermal growth factor, transferrin, interleukin-2 and their respective receptors // Ibid.—1985.—128.—Р. 1373—1380.

8. Snell C. R. A classification of peptide ligands based on their predicted receptor conformations // *Biochim. et biophys. acta.*—1984.—787.—P. 53—59.
9. Segersteen O., Nordgren H., Biro J.-C. Frequent occurrence of short complementary sequences in nucleic acids // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1986.—139.—P. 94—101.
10. Markus G., Tritsch G. L., Parthasarathy R. A model for hydrophobic-based peptide interactions // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1989.—272.—P. 433—439.
11. Чиненс Г. И. Структурные основы действия пептидных и белковых иммунорегуляторов.—Рига: Зинатне, 1990.—48 с.
12. Чиненс Г. И., Иевия Н. Г., Цилинскис Э. Э. Скрытая симметрия первичных структур пептидов и белков // *Биоорг. химия.*—1992.—18, № 12.—С. 1445—1453.
13. Kyte J., Doolittle R. F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein // *J. Mol. Biol.*—1982.—157.—P. 105—132.
14. Bost K. L., Smith E. M., Blalock J. E. Similarity between the corticotropin (ACTH) receptor and a peptide encoded by an RNA that is complementary to ACTH mRNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1985.—82.—P. 1372—1375.
15. Clarke B. L., Bost K. L. A monoclonal anti-peptide antibody recognizes the adrenocorticotrophic receptor // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1990.—168.—P. 1020—1026.
16. Mulchahey J. J., Neill J. D., Dion L. D. et al. Antibodies to the binding site of the receptor for luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH): generation with a synthetic decapeptide encoded by an RNA complementary to LHRH mRNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1986.—83, N 24.—P. 9714—9718.
17. Shai Y., Flashner M., Chaiken I. M. Anti-sense peptide recognition of sense peptides: direct quantitative characterization with the ribonuclease S-peptide system using analytical high-performance affinity chromatography // *Biochemistry.*—1987.—26.—P. 669—675.
18. Brentani R. R., Ribeiro S. F., Potocnjak P. et al. Characterization of the cellular receptor for fibronectin through a hydrophobic complementarity approach // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1988.—85.—P. 364—367.
19. Pasqualini R., Chamone D. F., Brentani R. R. Determination of the putative binding site for fibronectin on platelet glycoprotein IIb-IIIa complex through a hydrophobic complementarity approach // *J. Biol. Chem.*—1989.—264.—P. 14566—14570.
20. Elton T. S., Dion L. D., Bost K. L. et al. Purification of an angiotensin II binding protein by using antibodies to a peptide encoded by angiotensin II complementary RNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1988.—85.—P. 2518—2522.
21. Holsworth D. D., Kiely J. S., Root-Bernstein R. S. et al. Antisense-designed peptides: a comparative study focusing on possible complements to angiotensin II // *Pept. Res.*—1994.—7.—P. 185—193.
22. Carr D. J. J., Bost K. L., Blalock J. E. An antibody to a peptide specified by an RNA that is complementary to  $\gamma$ -endorphin mRNA recognizes an opiate receptor // *J. Neuroimmunol.*—1986.—12.—P. 329—337.
23. Carr D. J. J., DeCosta B., Jacobson A. E. et al. Immunoaffinity-purified opiate receptor specifically binds the d-class opiate receptor ligand, *cis*-(+)-3-methylfentanylisothiocyanate, SUPERFIT // *FEBS Lett.*—1987.—224.—P. 272—276.
24. Moore G. J., Ganter R. C., Franklin K. J. Angiotensin «antipeptides»: (-)messenger RNA complementary to human angiotensin II (+) messenger RNA encodes an angiotensin receptor antagonist // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1989.—160.—P. 1387—1391.
25. Fassina G., Zamai M., Brigham-Burke M., Chaiken I. M. Recognition properties of antisense peptides to Arg8-vasopressin/bovine neurophysin II biosynthetic precursor sequences // *Biochemistry.*—1989.—28.—P. 8811—8818.
26. Lu F. X., Aiyar N., Chaiken I. Affinity capture of [Arg8]vasopressin-receptor complex using immobilised antisense peptide // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1991.—88.—P. 3642—3646.
27. Scapol L., Rappuoli P., Viscomi G. C. Purification of human interferon-beta by immobilized antisense peptides // *J. Chromatogr.*—1992.—600.—P. 235—242.
28. Bajpai A., Hooper K. P., Ebner K. E. Interactions of antisense peptides with ovine prolactin // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1991.—180.—P. 1312—1317.
29. Andersen T. T., Ebner K. E. Reaction of the histidines of prolactin with ethoxyformic anhydride. A binding site modification // *J. Biol. Chem.*—1979.—254.—P. 10995—10999.
30. Nestor J. J., Moffatt J. G., Chan H. W. Патент 4493795 США.
31. Строчковская Л. И., Калинина Н. О., Кихно И. М., Соломко А. П. Экспрессия рекомбинантного человеческого гена пролактина в клетках насекомых с использованием бакуловирусного вектора на основе вируса ядерного полиодроза кольчатого шелкопряда // *Докл. АН Украины.*—1997.—1.—С. 166—169.
32. Kohmoto K., Tsunasawa S., Sakiyama F. Complete amino acid sequence of mouse prolactin // *Eur. J. Biochem.*—1984.—138.—P. 227—239.
33. Kinet S., Goffin V., Mainfroid V., Martial J. A. Characterization of lactogen receptor-binding site I of human prolactin // *J. Biol. Chem.*—1996.—271.—P. 14353—14360.
34. Luck D. N., Gout P. W., Ketsay K. et al. Recombinant methionyl bovine prolactin loss of bioactivity after single amino acid deletions from putative helical regions // *Mol. Endocrinol.*—1990.—4.—P. 1011—1016.
35. Fassina G., Roller P. P., Olson A. D. et al. Recognition properties of peptides hydrophobically complementary to residues 356—375 of the *c-raf* protein // *J. Biol. Chem.*—1989.—264.—P. 11252—11257.
36. Soffer R. L., Bandyopadhyay S., Rosenberg E. et al. Unexpected binding of an octapeptide to the angiotensin II receptor // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1987.—84.—P. 9219—9222.
37. Knutson V. P. Insulin-binding peptide. Design and characterization // *J. Biol. Chem.*—1988.—263.—P. 14146—14151.
38. Ghiso J., Saball E., Leoni J. et al. Binding of cystatin C to C4: The importance of sense-antisense peptides in their interaction // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1990.—87.—P. 1288—1291.
39. Blalock E. J. Complementarity of peptides specified by «sense» and «antisense» strands of DNA // *Trends Biotechnol.*—1990.—8.—P. 140—144.
40. Chaiken I. M. Bioaffinity chromatography: synergy between interactive chromatography and molecular recognition for the separation and analysis of macromolecules // *J. Chromatogr.*—1989.—488.—P. 145—160.
41. Narayanan S. R. Preparative affinity chromatography of proteins // *Ibid.*—1994.—658.—P. 237—258.
42. Tam J. P. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1988.—85.—P. 5409—5413.
43. Fassina G., Corti A., Cassani G. Affinity enhancement of complementary peptide recognition // *Int. J. Peptide Protein Res.*—1992.—39.—P. 549—556.
44. Misra P. K., Hag W., Katti S. B., Mathur K. B. et al. Enkephalin antisense peptides: design, synthesis, and biological activity // *Pharm. Res.*—1993.—10.—P. 660—661.
45. Rasmussen U. B., Hesch R.-D. On antisense peptides: the parathyroid hormone as an experimental example and a critical

- theoretical view // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1987.—149.—P. 930—938.
46. *Guillemette G., Boullay G., Gagnon S. et al.* The peptide encoded by angiotensin II complementary RNA does not interfere with angiotensin II action // *Biochem. J.*—1989.—261.—P. 309.
47. *De Gasparo M., Whitebread S., Einsle K., Heusser C.* Are the antibodies to a peptide complementary to angiotensin II useful to isolate the angiotensin II receptor? // *Ibid.*—P. 310—311.
48. *Blalock J. E., Elton T. S., Oparil S.* Complementary peptides: a response // *Ibid.*—P. 311—312.
49. *Stefani M., Bucciantini M., Taddei N. et al.* Antisense peptides to the 43-57 region of acylphosphatase and to the 46—60 region of two isoenzymes of low-M<sub>r</sub> Ophosphotyrosine protein phosphatase do not interact with the corresponding proteins // *Biotechnol. Appl. Biochem.*—1994.—20.—P. 241—249.
50. *Eberle A. N., Drozd R., Baumann J. B., Girard J.* Receptor-specific antibodies by immunization with «antisense» peptides? // *Pept. Res.*—1989.—2.—P. 213—220.
51. *Jurzak M., Pavo I., Fahrenholz F.* Lack of interaction of vasopressin with its antisense peptides: a functional and immunological study // *J. Recept. Res.*—1993.—13.—P. 881—902.
52. *Goldstein A., Brutlag D. L.* Is there a relationship between DNA sequences encoding peptide ligands and their receptors? // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1989.—86.—P. 42—45.
53. *Zull J. E., Smith S. K.* Is genetic code redundancy related to retention of structural information in both DNA strands? // *TIBS.*—1990.—15.—P. 257—261.
54. *Zull J. E., Taylor R. C., Michaelis G. S., Rushforth N. B.* Nucleic acid sequences coding for internal antisense peptides: are there implications for protein folding and evolution? // *Nucl. Acids Res.*—1994.—22.—P. 3373—3380.
55. *Baranyi L., Campbell W., Ohshima K. et al.* The antisense homology box: a new motif within proteins that encodes biologically active peptides // *Nat. Med.*—1995.—1.—P. 894—901.
56. *Tropsha A., Kizer J. S., Chaiken I. M.* Making sense from antisense: a review of experimental data and developing ideas on sense-antisense peptide recognition // *J. Mol. Recogn.*—1992.—5.—P. 43—54.
57. *Baranyi L., Campbell W., Okada H.* Antisense homology boxes in C5a receptor and c5a anaphylatoxin: a new method for identification of potentially active peptides // *J. Immunol.*—1996.—157.—P. 4591—4601.
58. *Ефимов В. А., Бурякова А. А., Фрадков А. Ф., Чахмачева О. Г.* Биосинтез в бактериальных клетках кальцитонина и мини-проинсулина человека в виде гибридных белков с соответствующими антисмысловыми пептидами и метал-лосвязывающим пептидом // *Биоорг. химия.*—1996.—7.—С. 503—510.

Поступила в редакцию 21.08.97