

8. Гинюлис В. М., Ананьев Е. В. Молекулярные подходы к систематическому картированию генома человека // Генетика.— 1984.— 20, № 11.— С. 1749—1762.
9. Давиденкова Е. Ф., Ланцов В. А., Шварц Е. И. Основы современной диагностики, профилактики и лечения наследственных заболеваний // Вестн. АМН СССР.— 1986.— № 9.— С. 8—13.
10. Евграфов О. В., Макаров В. Б. Диагностика миодистрофии Дюшенна с помощью зондов ДНК // Журн. невропатологии и психиатрии.— 1987.— 87, № 11.— С. 1732—1736.
11. Patterns of polymorphism and linkage disequilibrium for cystic fibrosis / X. Estiville, P. J. Scambler, B. G. Wainwright et al. // Genomics.— 1987.— 1, N 2.— P. 257—263.
12. Анализ частоты рестрикционного полиморфизма, выявляемого ДНК зондом СС-7 в популяции и в семьях больных муковисцидозом с помощью метода цепной реакции синтеза ДНК / Е. И. Шварц, О. К. Кабоев, А. А. Гольцов и др. // Докл. АН СССР.— 1989.— 307, № 2.— С. 327—330.
13. Saiki R. K. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase // Science.— 1988.— 239, N 4203.— P. 491—495.
14. Same day first trimester antenatal diagnosis for cystic fibrosis by gene amplification / C. Williams, R. Williamson, Ch. Couteille et al. // Lancet.— 1988, July.— P. 102—103.
15. Prenatal diagnosis of cystic fibrosis by DNA amplification for detection of KM-19 polymorphism / G. L. Feldman, R. Williamson, A. L. Beudet, W. E. O'Brien // Ibid.— P. 102.
16. Юров Ю. Б. Молекулярная цитогенетика гетерохроматиновых районов в геноме человека: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— М., 1987.— 34 с.
17. Kogan S. C., Doherty A. B. M., Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences // New Engl. J. Med.— 1988.— 317, N 16.— P. 985—990.
18. Selwyns A., Lorenz R. A noninvasive method for determination of the sex and karyotype of the fetus from the maternal blood // Hum. Genet.— 1988.— 79, N 4.— P. 357—359.
19. Zimmer A., Gruss P. Production of chimeric mice containing embryonic stem cells carrying Hox 1.1 allele mutated by homologous recombination // Nature.— 1989.— 332, N 6211.— P. 150—153.
20. Gene therapy in man. Recommendations of European Medical Research Council // Lancet.— 1988.— N 8597.— P. 1271—1272.
21. Leslie R. New targets for human gene therapy // Science.— 1988.— 241, N 4868.— P. 906.

Ин-т акушерства и гинекологии АМН СССР, Ленинград

Получено 13.06.89

УДК 577.152.1

**А. Л. Шварцман, М. П. Страхова, В. С. Гайцхоки,
В. Бергер, Ч. Кутель**

ДНК-ДИАГНОСТИКА И ПОДХОДЫ К ГЕННОЙ ТЕРАПИИ НАСЛЕДСТВЕННОГО ДЕФИЦИТА α_1 -АНТИТРИПСИНА

*Из библиотеки кДНК печени человека на экспрессионном векторе λ gt11 выделен ряд клонов, содержащих последовательности кДНК α_1 -антитрипсина (АТ). Анализ нуклеотидной последовательности полученных клонов показал, что в их составе отсутствуют последовательности (30—150) нуклеотидов, кодирующие 5'-конец мРНК АТ. Объединением последовательностей кДНК АТ и последовательностей гена АТ в уникальном *С*₁г10.1-сайте экзона II получена кДНК АТ, включающая кодоны мРНК АТ, начиная с позиции +2. Выделенная кДНК АТ использована для ДНК-диагностики наследственного дефицита АТ в семьях носителей мутации в популяциях СССР и ГДР. Выявлено сцепление генотипа при наследственной недостаточности АТ с отсутствием полиморфного *Mac*III-сайта в экзоне III гена АТ.*

Введение. АТ — это гликопротеин плазмы крови, относящийся к семейству белков — ингибиторов сериновых протеаз. АТ представляет собой одноцепочечный белок с молекулярной массой 50 000 и содержанием углеводов до 15% [1]. Ген АТ имеет длину 10,2 тысяч пар нуклеотидов (т. н. н.), включает пять экзонов, общая длина мРНК АТ составляет 1390 н. [2]. Более 30 аллелей АТ определяют полиморфизм этого белка, выявляемый в большинстве случаев изофокусированием белков

сыворотки крови [3]. Наиболее часто в популяциях представлен M-вариант и его субтипы, которые встречаются в разных популяциях людей белой расы со следующими частотами: M1 — 0,668, M2 — 0,155 и M3 — 0,112 [1, 3]. Единственные аминокислотные замены Glu в позициях 264 и 342 соответственно на Val и Lys (S- и Z-варианты) ассоциированы с резко выраженной недостаточностью АТ в кровотоке [1, 3, 4]. Наиболее тяжелая клиническая картина у гомозиготных носителей Z-варианта обусловлена поражением легких и печени. В основе нарушения метаболизма АТ при Z-варианте лежит блок внутриклеточного транспорта АТ и его секреции в кровоток [1, 5]. Наряду с заменой в позиции 342 Glu→Lys у больных с Z-вариантом обнаружена другая точечная замена в позиции 213 Val→Ala, не влияющая, однако, на функцию или обмен АТ. Аналогичная мутация наблюдалась и у 20—30 % носителей аллеля M1 [6, 7]. Эта мутация приводит к исчезновению в гене АТ сайта узнавания для рестриктазы *MaeIII* и потому может быть использована для диагностики наследственного дефицита АТ. Проблема ДНК-диагностики дефицита АТ в настоящее время diskutруется не только возможностью пренатального диагноза, но и значительно более высокой точностью и воспроизводимостью результатов, чем традиционные методы фенотипической диагностики [8, 9]. При лечении больных с наследственным дефицитом АТ необходима терапевтическая доза 4 г АТ за 7 дней [10]. Даже с учетом того, что ряд зарубежных фирм начал производство генноинженерного АТ, его потребность в США, где поставлены на учет более 60 000 гомозиготных носителей недостаточности АТ, может составлять десятки тонн в год. Естественно, при развитии методов генной терапии и пренатального диагноза наследственных заболеваний недостаточность АТ как одна из наиболее часто встречающихся моногенных болезней человека (частота мутантного аллеля 1/50 для европейской популяции) должна стать предметом повышенного внимания. Клонирование кДНК АТ в составе ретровирусных векторов [11] и высокий уровень экспрессии АТ в клетках печени и макрофагах [12] как возможных мишеней позволяют предположить возможность генной терапии недостаточности АТ уже в ближайшем будущем.

Материалы и методы. Библиотека кДНК была предоставлена Д. Хаста (Великобритания). Иммуноскрининг клонов *λgt11* проводили по методу [13]. Электрофорез белковых лизатов с последующей идентификацией иммунореактивных продуктов, электрофорез и ДНК-гибридизационные эксперименты нуклеиновых кислот — согласно монографии [14]. Нуклеотидную последовательность ДНК рекомбинантных клонов по методике Максама — Гилберта определяли на твердых носителях Hybrid M and G, как описано нами ранее [15]. ДНК лейкоцитов больных выделяли с использованием протенназы K по методу [6].

Результаты и обсуждение. При скрининге 5000 БОЕ были изолированы шесть рекомбинантных клонов *λgt11*, программирующих синтез иммунореактивных полипептидных цепей АТ. На рис. 1 представлены результаты их анализа электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем DS-Na, и иммуноблоттингом с моноспецифическими антителами к АТ. Все рекомбинантные клоны продуцировали полипептидные цепи АТ, а множественность идентифицированных зон связана с быстрой деградацией рекомбинантного белка, несмотря на присутствие в лизатах фенолметилсульфонилфторида.

Определение нуклеотидных последовательностей кДНК из 6 рекомбинантных клонов показало, что во всех клонах вставки идентичны по нуклеотидной последовательности 3'-концов и кодируют 3'-концевую область АТ-мРНК [15]. На рис. 2 представлены нуклеотидные последовательности 5'-концов кДНК клонов 7; 9—12 и 15, а также 5'-конца АТ-мРНК. Для всех охарактеризованных кДНК общим является отсутствие 5'-концевых последовательностей АТ-мРНК, в частности, 5'-нетранслируемой зоны и кодонов для сигнального пептида, а также 10—

40 кодонов для N-концевой части зрелого АТ. В клонах 10, 11 и 15 обнаружены 5'-концевые последовательности, представляющие собой комбинацию в одной цепи кодонов мРНК и ее комплементарной цепи. Образование таких последовательностей может быть связано с ошибками ДНК-полимеразного или ревертазного копирования в участках

Рис. 1. Иммуноблоттинг рекомбинантного АТ. Электрофорез клеточных лизатов клонов λ gt11, дающих положительный иммунологический ответ на антитела к АТ: 1— λ gt11/7; 2— λ gt11/9; 3— λ gt11/10; 4— λ gt11/11; 5— λ gt11/12; 6— контрольный лизат (диккий тип λ gt11). 100 мкг белка сонцированного клеточного лизата разделяли в 10%-ном ПААГ с последующим электрофоретическим переносом на нитроцеллюлозный фильтр («Millipore», США). Иммуноблоттинг с 125 I-белком А согласно методу [13]. Стрелкой указано положение маркеров — мономера и димера сывороточного альбумина

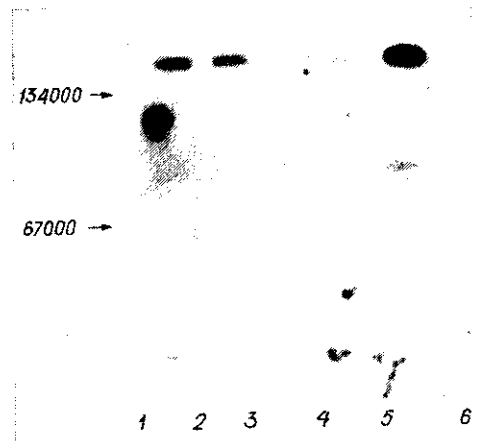


Fig. 1. Immunoblots of recombinant AT. Electrophoresis of cell lysates of λ gt11 clones with positive immunological response to antibodies against AT: 1— λ gt11/7, 2— λ gt11/9, 3— λ gt11/10, 4— λ gt11/11, 5— λ gt11/12, 6— control lysate (λ gt11 wild type). 100 μ g protein of sonicated cell lysates were separated in 10% polyacrylamide gel followed by electrophoretic transfer to nitrocellulose filters (Millipore). Immunoblotting with 125 I-labelled A protein was carried out according to [13]. Arrows indicate the position of molecular weight markers — monomers and dimers of bovine serum albumin

мРНК с разветвленной вторичной структурой. В целом группа клонов, выделенная из библиотеки кДНК печени человека, содержала протяженные последовательности кДНК АТ, которые могли быть исполь-

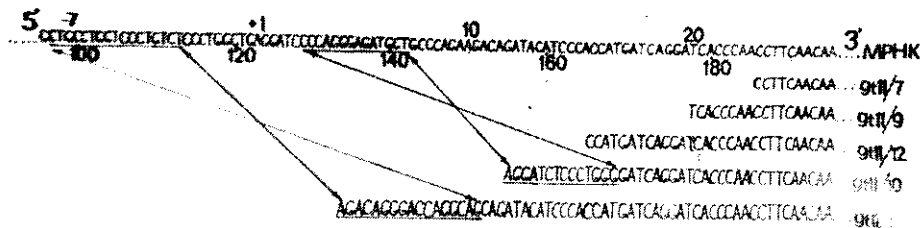


Рис. 2. Нуклеотидная последовательность 5'-концов АТ-кДНК шести рекомбинантных клонов. Обозначения клонов приведены справа. Верхняя строчка — последовательность нуклеотидов 5'-конца полноразмерной АТ-кДНК, приведенной из работы [2]. Цифры внизу — номера нуклеотидов от 5'-конца мРНК; цифры сверху — номера кодонов, +1 — кодон для N-концевой аминокислоты зрелого АТ

Fig. 2. Nucleotide sequences of 5'-ends of AT-cDNAs from six recombinant clones. On the right: designations of clones. Upper line — a sequence of 5'-end of full-length AT-cDNA [2]. Numbers below — numbers of nucleotides from 5'-end, above — positions of codons, + — codon for N-terminal amino acid of mature AT

зованы как для ДНК-диагностики наследственного дефицита АТ, так и для генноинженерных экспериментов, связанных с получением полноразмерной копии кДНК АТ и клонированием ее в составе векторных молекул.

Ранее мы уже отмечали, что вторая точечная нейтральная мутация в гене АТ в случае Z-варианта (позиция 213, Val→Ala) приводит к исчезновению MaeIII-сайта в экзоне III. Хотя подобная мутация обна-

руживается и у 23 % *M1*-аллелей, тем не менее она может служить маркерным признаком для идентификации *Z*-аллеля гена АТ в геномной ДНК. В опытах по анализу полиморфизма длин *MaeIII*-фрагментов гена АТ в качестве зонда использовали АТ-кДНК клон¹², последовательность которой перекрывает полиморфный *MaeIII*-сайт в экзоне III. На рис. 3 представлены данные по определению длин *MaeIII*-фрагментов гена АТ у четырех гетерозигот с генотипом *MIZ* и у двух

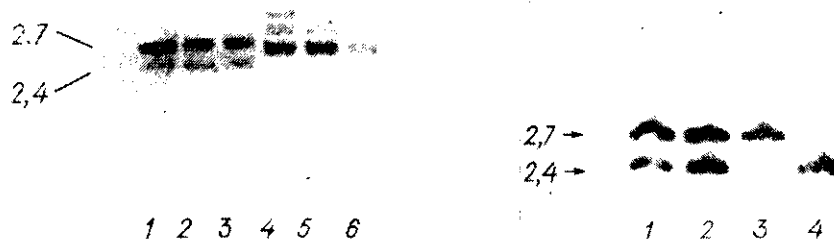


Рис. 3. *MaeIII*-ПДРФ гена АТ, ассоциированный с *M*- и *Z*-аллелями: 1, 2, 3, 6 — генотип *MIZ*; 4, 5 — генотип *ZZ*. Слева указаны длины полиморфных фрагментов (т.п.н.)
 Fig. 3. *MaeIII* polymorphism of length of restriction fragments (RFLP) associated with *M*- and *Z*-alleles of AT gene: 1, 2, 3, 6 — *MZ* genotype, 4, 5 — *ZZ* genotype. The length of polymorphic fragments (2.7 and 2.4 kb) is indicated by arrows

Рис. 4. *MaeIII*-ПДРФ гена АТ в семье с наследственным дефицитом АТ: 1, 2 — сибсы с генотипом *MIZ*; 3 — отец, генотип *ZZ*; 4 — мать, генотип *MIM1*. Положение полиморфных фрагментов (т.п.н.) указано стрелками
 Fig. 4. *MaeIII* RFLP of AT gene in the family with inherited AT deficiency. 1, 2 — sibs with *MIZ* genotype, 3 — father, *ZZ* genotype, 4 — mother, *MIM1* genotype. Position of polymorphic fragments (2.7 and 2.4 kb) is indicated

гомозиготных больных с генотипом *ZZ*. Из приведенных результатов следует, что наличие *Z*-аллеля во всех случаях обусловлено присутствием *MaeIII*-фрагмента размером 2,7 т. п. н. и указывает на элиминацию сайта *MaeIII* в экзоне III гена АТ. При генотипе *MZ* наблюдаются два разных аллеля гена АТ, сопряженных с двумя *MaeIII*-фрагментами (2,7 и 2,4 т. п. н.).

В семье с наследственной недостаточностью АТ (рис. 4) у отца — гомозиготного носителя недостаточности АТ (рис. 4, дорожка 3) обнаруживался лишь *MaeIII*-фрагмент 2,7 т. п. н. У двух гетерозиготных сибсов *MIZ* (рис. 4, дорожки 1, 2) регистрировали наличие двух *MaeIII*-фрагментов 2,7 и 2,4 т. п. н., у матери (рис. 4, дорожка 4) — лишь фрагмента 2,4 т. п. н. Данные, представленные на рис. 4, являются наиболее характерными в ДНК-диагностике наследственного дефицита АТ. Вместе с тем при диагностике на основе использования *MaeIII*-полиморфизма возможна неопределенность и неполная информативность как при скрининге, так и при семейном анализе. Это может происходить в тех редких случаях, когда встречается *M1*-вариант с такой же нейтральной мутацией в позиции 213, как и *Z*-вариант. На рис. 5 приведены результаты анализа полиморфизма гена АТ, проведенного на образцах ДНК от членов двух семей с наследственной недостаточностью АТ. В этих семьях отцы (фенотип *MIZ*) были гетерозиготными по полиморфному *MaeIII*-сайту (рис. 5, дорожки 7 и 8), тогда как у матерей с теми же фенотипами АТ выявлено гомозиготное носительство *MaeIII*-фрагмента длиной 2,7 т. п. н. (рис. 5, дорожки 1 и 10). В семье А из пяти детей четверо были гомозиготами *ZZ* (рис. 5, дорожки 2, 3, 4, 6) и лишь один — гетерозиготой *MIZ* (рис. 5, дорожка 5). В этой семье варианты *MIZ* неразличимы от *ZZ*, что представляет определенные трудности в диагностике заболевания и требует ис-

пользования каких-либо иных полиморфных сайтов или прямого определения мутации после амплификации гена АТ.

Наряду с диагностикой наследственной недостаточности АТ в настоящее время актуальна проблема лечения заболевания. В качестве препарата для заместительной терапии наилучшим является АТ от здоровых доноров либо генноинженерного происхождения. Высокая

Рис. 5. MaeIII-ПДРФ гена АТ в семьях с наследственным дефицитом АТ: 1—7—семья А: 1—отец (генотип MIZ), 7—мать (генотип MIZ), 2, 3, 4, 6—дети (генотип ZZ), 5—ребенок (MIZ); 8—10—семья Б: 8—мать (MIZ), 10—отец (MIZ), 9—ребенок (ZZ). Положение полиморфных фрагментов (г.п.п.) указано стрелками

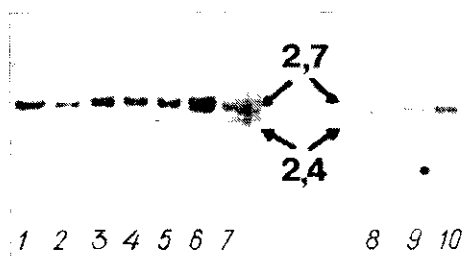


Fig. 5. MaeIII RFLP in two families with inherited AT deficiency 1-7—family A: 1—father (MIZ genotype), 7—mother (MIZ genotype), 2, 3, 4, 6—children (ZZ genotype), 5—child (MIZ genotype), 8-10—family B: 8—mother (MIZ), 10—father (MIZ), 9—child (ZZ). Positions of polymorphic fragments are indicated

потребность в препаратах АТ и широкое распространение вируса СПИД позволяют предположить, что основными препаратами для замещающей терапии недостаточности АТ должен быть белок, выделенный методами генной инженерии. Для получения высокоэффективных штаммов — продуцентов АТ необходимо наличие полноразмерной АТ-кДНК как основы создания рекомбинантных ДНК с высоким уровнем экспрессии АТ. Для этого мы клонировали в плазмиде *pTZ19* фрагменты гена АТ, выделенные нами ранее из библиотеки генов человека на векторе Харон 4А (*BamHI-Cfr10.1*, позиции нуклеотидов 5439—5776) и кДНК клона 12 (*Cfr10.1-EcoRI*). Сконструированная рекомбинантная плазмида включает последовательности кДНК, начиная с кодона АТ, кодирующего Asp в позиции 2, и в настоящее время используется нами для получения штаммов — продуцентов АТ и векторных молекул, которые могут применяться в генной терапии наследственной недостаточности АТ.

DNA DIAGNOSTICS AND APPROACHES TO GENE THERAPY OF HEREDITARY α_1 -ANTITRYPSIN DEFICIENCY

A. I. Schwartzman, M. P. Strakhova, V. S. Gaitshoki, W. Berger, Ch. Coulette

Research Institute for Experimental Medicine,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad
Central Institute for Molecular Biology,
Academy of Sciences of DDR, Berlin-Buch, DDR

Summary

The recombinant clones synthesizing immunoreactive α_1 -antitrypsin were isolated from expression library of human liver cDNA. Their sequencing has shown that they contain AT cDNAs lacking 20-100 codons from 5' terminal region of AT cRNA. These clones were used as probes for the diagnosis of inherited AT deficiency based on linked MaeIII polymorphism. cDNA clones including all the codons for mature AT starting from +2 codon are obtained to construct bacterial strains-producers of AT as well as of recombinant DNAs necessary for gene therapy of AT deficiency.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Structure and variation of human alpha₁-antitrypsin / R. Carrell, J. O. Jeppson, C. B. Laurell et al. // Nature.— 1982.— 298, N 5869.— P. 329—334.
2. Complete sequence of the cDNA for human alpha₁-antitrypsin and the gene for the S variant / G. L. Long, T. Chandra, S. L. C. Woo et al. // Biochemistry.— 1984.— 23, N 21.— P. 4828—4837.
3. Cox D. W., Johnson A. M., Fagerhol M. K. A report of nomenclature meeting for alpha₁-antitrypsin // Hum. Genet.— 1980.— 53, N 2.— P. 429—433.
4. Jeppson J.-O., Laurell C. B. The amino acid substitutions of human alpha₁-antitrypsin M₃, X and Z // FEBS Lett.— 1988.— 231, N 2.— P. 327—330.
5. Alpha₁-antitrypsin and serum albumin mRNA accumulation in normal, acute phase and ZZ human liver / J. H. Riley, I. C. Bathurst, M. R. Edbrooke et al. // Ibid.— 1985.— 189, N 2.— P. 361—366.
6. Identification of second mutation in the protein-coding sequence of the Z type alpha₁-antitrypsin gene / T. Nukiwa, K. Satoh, M. L. Brantly et al. // J. Biol. Chem.— 1986.— 261, N 34.— P. 15989—15994.
7. Cox D., Billinosley G. D. Restriction enzyme MueIII for prenatal diagnosis of alpha₁-antitrypsin deficiency // Lancet.— 1986.— N 9.— P. 27.
8. Fagerhol M., Laurell S. The Pi system inherited variants of serum alpha₁-antitrypsin // Progr. Med. Genet.— 1970.— 8.— P. 96—105.
9. Alpha₁-antitrypsin deficiency by direct analysis of mutation site in the gene / W. Kidd, R. B. Wallace, K. Itakura, S. L. C. Woo // Nature.— 1983.— 304, N 5923.— P. 230—234.
10. Boswell P. R., Carrell R. Alpha₁-antitrypsin: molecules and medicine // TIBS.— 1986.— 11, N 3.— P. 102—103.
11. Retroviral mediated transfer and expression of human alpha₁-antitrypsin in cultured cell / F. D. Ledley, H. E. Grennet, D. P. Bartos, S. L. C. Woo // Gene.— 1987.— 61, N 1.— P. 113—118.
12. Perlino E., Cortese R., Ciliberto G. The human alpha₁-antitrypsin gene is transcribed from two different promoters in macrophages and hepatocytes // EMBO J.— 1987.— 6, N 9.— P. 2767—2771.
13. Young R. A., Davis R. W. Yeast RNA polymerase II genes: isolation with antibody probes // Science.— 1983.— 222, N 4625.— P. 778—782.
14. Маниатис Т., Фритч Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 480 с.
15. Der alpha-1-antitrypsin-mangel-isolation von alpha-1-antitrypsin cDNA gensonnen aus einer cfprimierenden-gIII-humanlebergenbank / W. Berger, A. Schwarzman, C. Coutelle, S. Neifakh // Z. Klin. Med.— 1988.— 43, N 3.— S. 583—586.

НИИ эксперим. медицины АМН СССР, Ленинград
Центр. ин-т молекуляр. биологии АН ГДР, Берлин-Бух

Получено 13.06.89

УДК 616.056.7:616.153.922

М. Ю. Манделъштам, Л. К. Сасина, Л. А. Шварцман

ДНК-ДИАГНОСТИКА СЕМЕЙНОЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ

Семейная гиперхолестеринемия (СГ) — одно из наиболее часто встречающихся генетических заболеваний человека, связанное с мутациями в гене рецептора липопротеинов низкой плотности (рЛНП). ДНК-диагностика является не только наиболее достоверным методом определения СГ, но и позволяет выявлять заболевание до возникновения клинических нарушений. В работе описано получение ДНК-зондов, необходимых для диагностики СГ, на основе определения полиморфизмов длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) гена рЛНП. Рассматривается определение ПДРФ для PvuII, BstEII, AvaII, NcoI, TaqI у больных с СГ как полезных маркеров в семейном анализе. Описан новый полиморфный вариант гена рЛНП для фермента EcoRI.

Введение. СГ — наследственное заболевание человека, передающееся по аутосомно-доминантному типу [1]. Гетерозиготная форма СГ в большинстве европейских популяций выявляется у одного индивидуума среди 500 обследованных, гомозиготная форма встречается с частотой 1 случай на миллион новорожденных. Причиной заболевания является нарушение катаболизма атерогенных ЛНП в результате различных мутаций в гене рЛНП [2]. В интронах гена и в экзоне 18 обнаружены повторы *Alu*-семейства, кроме того, в 5'-концевой области гена содер-