

О. В. Воронина, В. С. Гайцхоки, Т. Э. Иващенко, В. С. Баранов,
В. Н. Горбунова, В. М. Калинин, Л. А. Лившиц, М. Т. Веножинские

ПОПУЛЯЦИОННЫЙ И СЕМЕЙНЫЙ АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК, СЦЕПЛЕННЫХ С ГЕНОМ МУКОВИСЦИДОЗА

В работе представлены результаты исследования аллельного полиморфизма локусов, сцепленных с геном муковисцидоза (кистозного фиброза поджелудочной железы, КФ) в популяциях здоровых людей-доноров Ленинграда (*D7S8*, *Met*, *D7S23*), Москвы (*D7S8*) и Киева (*Met*). Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов ДНК (ПДРФ) в ленинградской и киевской популяциях соответствует ПДРФ, описанному для стран Северной Европы. В московской популяции отмечается некоторый сдвиг в распределении чистот аллелей локуса *D7S8*, что связано, по-видимому, с наличием в группе московских доноров лиц монголоидной расы, имеющей чрезвычайно низкий уровень КФ в популяции.

Выраженное неравновесие сцепления мутации КФ с определенными аллелями в системах *KM.19* и *XV-2c* локуса *D7S23* обнаружено в семьях больных муковисцидозом. Этот факт позволяет осуществлять пренатальную диагностику КФ в семьях, утративших больного ребенка, но имеющих высокий риск повторных случаев муковисцидоза.

Результаты ПДРФ-анализа изученных локусов свидетельствуют о генетической однородности мутации КФ в Европейской части СССР и Западной Европе и являются основой для применения ДНК-зондов *KM.19* и *XV-2c* в пренатальной диагностике, подтверждения диагноза КФ и поиска гетерозиготных носителей мутации в популяции.

Введение. Муковисцидоз является одним из самых распространенных аутосомно-рецессивных моногенных заболеваний человека. По литературным данным [1], для представителей белой расы частота КФ составляет 1 : 2000 новорожденных, а каждый 20-й европеец является гетерозиготным носителем мутантного аллеля. В ходе работ по идентификации гена КФ были выделены геномные клоны, маркирующие благодаря наличию полиморфных сайтов рестрикции локусы длинного плеча хромосомы 7 (*Met* и *D7S8*) и фланкирующие ген КФ [2]. Впоследствии внутри фрагмента хромосомы, ограниченного указанными локусами, был картирован локус *D7S23*, включающий пробы *XV-2c* и *KM.19* и находящийся в непосредственной близости к гену КФ [3]. Наличие во всех этих локусах полиморфных сайтов, доступных для ПДРФ-анализа, а также достаточно тесное их сцепление с геном КФ, позволяют использовать их, с одной стороны, для молекулярного клонирования гена КФ, с другой — для ранней, в том числе пренатальной, диагностики муковисцидоза [2—4].

Известно, что диагностическая значимость сцепленного ПДРФ ДНК при семейном анализе с целью выявления гомо- и гетерозиготного носительства КФ определяется двумя параметрами: частотой встречаемости аллелей в популяции и степенью их аллельного сцепления с геном КФ. Известно также, что в различных популяциях эти параметры варьируют. Так, имеются данные о расовых отличиях полиморфизма локуса *Met* в Северной Америке [5], отличаются результаты исследования ПДРФ локуса *D7S8* (зонд *I3.11*) в ФРГ [6] и Великобритании [14]. Есть сведения о наличии случаев нестандартного типа сцепления локуса КФ с локусом *D7S23* в Италии [7].

Учитывая национальную гетерогенность популяции СССР, применению ДНК-зондов для пренатальной диагностики должно предшествовать обязательное изучение ПДРФ ДНК в популяции здоровых людей-доноров исследуемого региона.

Целью нашей работы было изучение ПДРФ ДНК, сцепленных с локусом КФ в семьях с муковисцидозом, а также в группах здоровых людей-доноров — жителей Ленинграда, Москвы и Киева. ДНК-пробы, использованные для анализа, охарактеризованы в табл. 1. Все клонированные ДНК-пробы на полиморфные локусы, сцепленные с геном КФ, были любезно предоставлены нам д-ром Р. Вильямсоном (госпиталь

Св. Марии, Лондон, Великобритания). Олигонуклеотидные пробы-праймеры для реакции специфической амплификации в системе *KM.19* были получены от д-ра Ч. Кутеля (Центр. ин-т молекуляр. биологии, Берлин, ГДР).

Таблица 1

Характеристика ДНК-зондов, сцепленных с геном муковисцидоза и использованных для анализа методом блот-гибридизации (БГ) и реакции специфической амплификации (РСА) ДНК
DNA probes closely linked with cystic fibrosis gene and used for blot-analysis and polymerase chain reaction in the present study

| Локус | ДНК-зонд | Рестриктаза | Метод анализа | Обозначение аллели | Размеры, т. н. п. |
|-------------|--------------|-------------|---------------|--------------------|-------------------|
| <i>Met</i> | <i>MeIII</i> | <i>MspI</i> | БГ | 1 | 6,5 |
| | | | | 2 | 2,3 |
| | | | | 3 | 1,8 |
| <i>D7S8</i> | <i>J3.11</i> | <i>TaqI</i> | БГ | 1 | 7,5 |
| | | | | 2 | 4,0 |
| | | | | 1 | 4,2 |
| <i>DS23</i> | <i>KM.19</i> | <i>MspI</i> | БГ | 1 | 1,8 |
| | | | | 1 | 6,0 |
| | | | | 2 | 3,2 |
| | <i>XV-2c</i> | <i>TaqI</i> | БГ | <i>K1</i> | 0,95 |
| | | | | <i>K2</i> | 0,65 |
| | | | | <i>K3</i> | 0,30 |
| | | | БГ | <i>K1</i> | 7,8 |
| | | | БГ | <i>K2</i> | 6,6 |
| | | | БГ | <i>X1</i> | 2,1 |
| | | | БГ | <i>X2</i> | 1,4 |

Материалы и методы. Плазмидную ДНК выделяли из клеток *E. coli* методом очищенного лизата [8] с последующим равновесным центрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия с бромистым этидием.

ДНК клеток крови получали с помощью протеиназы *K* по методу [9]. ДНК хранили в виде водного раствора при -20°C . Рестрикционный анализ ДНК проводили с использованием эндонуклеаз рестрикции *HindIII*, *TaqI*, *MspI* и *PstI* производства НПО «Фермент» (Вильнюс). ДНК (10 мкг) инкубировали с ферментом (30—200 ед. активности в объеме 50 мкл) в соответствующих условиях [8]. Время инкубации 12—16 ч. Полноту гидролиза ДНК контролировали электрофорезом алиquotы инкубационной пробы (5 мкл) в 0,8—1,0 %-ном горизонтальном агарозном геле с бромистым этидием в течение 1—2 ч.

Электрофоретическое разделение рестрикционных фрагментов проводили в горизонтальном агарозном геле той же концентрации (агароза типа V фирмы «Sigma», США) в течение 16—20 ч при градиенте потенциала 2—10 В/см в электродном буфере следующего состава: 40 мМ трис-НСI, рН 8,3, 20 мМ ацетат натрия, 0,2 мМ ЭДТА. В качестве маркера для определения молекулярной массы фрагментов использовали *HindIII*-фрагменты ДНК фага λ .

Перенос ДНК на нейлоновые фильтры Hybond tm-N («Amersham», Великобритания) осуществляли по методу [10].

Плазмидные ДНК-зонды метили, используя [α -³²P]dNTP и наборы для ник-трансляции фирмы «Amersham» до удельной радиоактивности $5 \cdot 10^7$ — $1 \cdot 10^8$ имп/мин на 1 мкг ДНК. Фильтры, содержащие денатурированные фрагменты геномной ДНК, прегибридизовали в течение 4 ч при 65°C в запаянных полиэтиленовых мешках в среде (0,9 М хлорид натрия, 0,09 М цитрат натрия, 0,5 % DS-Na, 0,1 % фикоилл, 0,1 % поливинилпирролидон и 0,1 % бычьего сывороточного альбумина, 100 мкг/мл денатурированной ДНК спермы лосося, 100 мкг/мл тРНК). Затем в среду добавляли 10^6 имп/мин плазмидной ³²P-ДНК и гибридизовали в течение 16—20 ч при 65°C . Под контролем счета радиоактивности фильтры отмывали последовательно по следующей схеме: 0,3 М хлорид натрия, 0,03 М цитрат натрия (65°C , 2 раза по 15 мин); 2) 0,3 М хлорид натрия, 0,03 М цитрат натрия, 0,1 % DS-Na (65°C , 30 мин); 3) 0,015 М хлорид натрия,

0,0015 М цитрат натрия, 0,1 % DS-Na (65 °С, 1—10 мин). Фильтры радиоавтографировали с рентгеновской пленкой в течение 3—10 сут при —70 °С.

Реакцию специфической амплификации (РСА) ДНК для ПДРФ-анализа зонда *KM.19* проводили с использованием набора фирмы «Amersham». ДНК денатурировали при 98 °С в течение 10 мин, охлаждали в ледяной бане, добавляли 2 ед. активности ДНК-полимеразы *Thermus thermophilus* на 0,5 нг ДНК и инкубировали по следующей схеме: денатурация — 1 мин при 95 °С, отжиг праймеров — 1 мин при 58 °С и синтез ДНК — 3 мин при 68 °С. По окончании 25—30 циклов амплификации пробы выдерживали в течение 10 мин при 78 °С для завершения элонгации, после чего проверяли степень амплификации электрофорезом aliquоты реакционной смеси (10 мкл) в 1 %-ной агарозе с бромистым этидием. Для рестрикции отбирали 20 мкл реакционной смеси и в течение 1 ч фрагмент гидролизовали при 37 °С в присутствии 3—30 ед. фермента *PstI*. После рестрикции материал фракционировали в 1 %-ной агарозе с бромистым этидием.

Данные обрабатывали по правилам вариационной статистики. Величину аллельной ассоциации оценивали по коэффициенту стандартного неравновесия Δst [6]:

$$\Delta st = (p - q) / \sqrt{(p + q)(2 - p - q)},$$

где p и q — частоты аллелей нормальной (p) и мутантной по гену КФ (q) хромосомы 7.

Результаты и обсуждение. Как упоминалось выше, диагностическая ценность ДНК-проб для ПДРФ-анализа определяется частотой полиморфных аллелей и степенью их сцепленности с геном КФ. Эти пара-

Таблица 2

Частота аллелей локусов *Met* (зонд *MetH*) и *D7S8* (зонд *J3.11*) в различных популяциях и в семьях с КФ

Allelic frequencies for the loci Met (probe MetH) and D7S8 (probe J3.11) in different populations and in cystic fibrosis families

| Зонд | Рестриктаза | Аллель | Частота аллелей (всего гаплотипов) | | | |
|--------------|-------------|--------|------------------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| | | | Ленинград | | Москва, доноры | Киев, доноры |
| | | | Доноры | Семья с КФ | | |
| <i>MetH</i> | <i>MspI</i> | 1 | 0,06±0,05 | 0,02±0,01 | — | — |
| | | 2 | 0,45±0,05 | 0,74±0,03 | — | — |
| | | 3 | 0,49±0,05 (34) | 0,24±0,03 (59) | — | — |
| | <i>TaqI</i> | 1 | 0,53±0,05 | 0,65±0,03 | — | 0,53±0,06 |
| | | 2 | 0,47±0,05 (36) | 0,35±0,03 (106) | — | 0,47±0,06 (28) |
| | | — | — | — | — | — |
| <i>J3.11</i> | <i>MspI</i> | 1 | 0,37±0,05 | — | 0,24±0,05 | — |
| | | 2 | 0,63±0,05 (46) | — | 0,76±0,05 (62) | — |
| | <i>TaqI</i> | 1 | 0,95±0,02 | — | — | — |
| | | 2 | 0,05±0,02 (56) | — | — | — |
| | — | — | — | — | — | — |

метры были нами исследованы в популяциях здоровых людей-доноров, в семьях которых не обнаруживалось больных КФ, жителей Ленинграда, Москвы и Киева. Из данных, представленных в табл. 2, видно, что частота полиморфных аллелей в системе *MetH/TaqI* в ленинградской и киевской популяциях практически идентична, и аллельные формы ПДРФ встречаются в популяциях с высокой частотой (0,53—0,47). Обнаружено отличие в распределении аллелей в популяциях Москвы и Ленинграда. В то время как в Ленинграде частоты аллелей 1 (4,2 т. н. п.) и 2 (1,8 т. н. п.) в системе *J3.11/MspI* составляют 0,37 и 0,63 соответственно, в группе московских доноров наблюдается смещение в сторону преобладания аллеля 2, частота которого составила 0,76. Различие это связано, возможно, с присутствием в этой группе лиц монголоидной расы, у которых можно предполагать низкую частоту КФ [11].

При сопоставлении данных исследования ПДРФ-локуса *Met* группы доноров и семей с КФ Ленинграда (табл. 2) обращает на себя внимание отличие в частоте аллелей. В это же время в донорской популяции основные аллели локуса *Met* (2 и 3 — *MspI* и 1 и 2 — *TaqI*) встречались примерно с равной частотой, в семьях с КФ было заметное преобладание аллеля, характеризующегося отсутствием сайта рестрикции по обоим рестриктазам. Так, в системе *MetH/MspI* частота аллеля 3 (1,8 т. н. п.) была в 3 раза меньше, чем аллеля 2 (2,3 т. н. п.). В системе *MetH/TaqI* низкомоллекулярный аллельный фрагмент 2 (4,0 т. н. п.) встречался вдвое реже высокомолекулярного фрагмента 1 (7,5 т. н. п.). Различия аллельного полиморфизма донорской популяции и семей с КФ высокодостоверны для системы *MetH/MspI* ($\chi^2=8,2$) и вероятностны для системы *MetH/TaqI* ($\chi^2=1,5$).

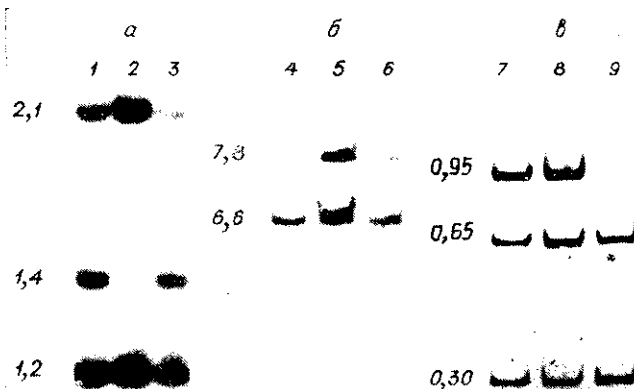
Таблица 3

Частота генотипов полиморфных локусов *XV-2c* и *KM.19* у здоровых доноров, облигатных гетерозигот по КФ и больных КФ
Genotype frequencies for the alleles of polymorphic loci XV-2c and KM.19 in donors, obligatory heterozygotes and in cystic fibrosis families

| ДНК-зонд | Рестриктаза | Генотип | Частоты генотипов | | |
|--------------|-------------|--------------|-------------------|--------------|--------------|
| | | | Доноры | Гетерозиготы | Больные КФ |
| <i>XV-2c</i> | <i>TaqI</i> | <i>X1—X1</i> | 0,21 | 0,35 | 0,64 |
| | | <i>X1—X2</i> | 0,55 | 0,51 | 0,36 |
| | | <i>X2—X2</i> | 0,24 | 0,14 | 0 |
| | | | <i>n</i> =33 | <i>n</i> =35 | <i>n</i> =11 |
| <i>KM.19</i> | <i>PstI</i> | <i>K1—K1</i> | 0,65 | 0,03 | 0 |
| | | <i>K1—K2</i> | 0,35 | 0,76 | 0,17 |
| | | <i>K2—K2</i> | 0 | 0,21 | 0,83 |
| | | | <i>n</i> =33 | <i>n</i> =28 | <i>n</i> =12 |

Особый интерес представляют исследования ПДРФ локуса *D7S23* (пробы *KM.19* и *XV-2c*). Это связано с выраженным неравновесным сцеплением аллелей *K2* (6,6 т. н. п.) и *X1* (2,1 т. н. п.) с мутацией КФ [12, 13]. Результаты определения частот генотипов этих локусов для групп здоровых людей-доноров, облигатных носителей гена КФ (родителей больных детей) и гомозиготных больных с фенотипом КФ суммированы в табл. 3. Из нее следует, что в системе *XV-2c/TaqI* гомозиготный генотип *X2—X2* у облигатных носителей КФ встречается существенно реже (14 %), чем у контрольной группы доноров (24 %), а у больных КФ он вообще не обнаруживается. В то же время частота гомозигот типа *X1—X1* в группе больных была в 3 раза выше (64 %), чем в контрольной группе (21 %). Еще более четкое неравновесие по сцеплению выявилось в системе *KM.19/PstI*. Так, большая часть доноров имела гомозиготный генотип *K1—K1* (65 %), а 35 % являлись гетерозиготами типа *K1—K2*, тогда как гомозиготное состояние *K2—K2* в этой группе не было обнаружено вовсе. У облигатных носителей мутантного аллеля преобладающий в группе доноров генотип *K1—K1* был обнаружен лишь в 3 % случаев, а частота гетерозигот типа *K1—K2* была в 2 раза выше, чем в контрольной группе и составляла 76 %. Среди больных КФ явно преобладал гомозиготный тип *K2—K2* (83 %), лишь 17 % были гетерозиготами типа *K1—K2*, а гомозиготы *K1—K1* не встречались. Таким образом, полученные результаты позволяют сделать заключение о статистически достоверной неравновесности сцепления локуса КФ с аллелями *X1* в системе *XV-2c/TaqI* и *K2* в системе *KM.19/PstI* в популяции Ленинграда ($\chi^2=8,5$ и $60,8$ соответственно). Степень ассоциации аллелей с мутацией характеризуется стандартным коэффициентом неравновесия Δst . Его анализ доказывает наиболее тесное сцепление с мутацией КФ аллеля *K2* ($\Delta st=0,674$) и аллеля *X1* ($\Delta st=0,273$).

На рисунке представлены результаты типичного распределения аллелей у облигатных носителей (родители больного КФ) и больного КФ в системах *XV-2c/TaqI* (рисунок, а) и *KM.19/PstI* (рисунок, б, в). Из рисунка видно, что семья А. является полностью информативной в обеих системах. Облигатные носители имеют стандартный генотип



Анализ ПДРФ, сцепленных с геном муковисцидоза в семье А. с больным ребенком методом блот-гибридизации: а — система *XV-2c*; б — система *KM.19*; в — методом ПСА (система *KM.19*). 1, 5, 7 — ДНК матери; 3, 6, 8 — ДНК отца; 2, 4, 9 — ДНК больного ребенка. Масса фрагментов указана в т. н. п.

RFLP analysis in the family А with cystic fibrosis child by means of blot-hybridization (the probes *XV-2c* (а) and *KM-19* (б) as well as by means of polymerase chain reaction (ПСА) (*KM-19*, в): 1, 5, 7 — maternal DNA samples; 3, 6, 8 — paternal DNA samples; 2, 4, 9 — CF-child's DNA samples. DNA fragment size in kb

X1—X2/K1—K2, а больной ребенок является гомозиготой типа *X1—X1/K2—K2*. Сравнительные исследования ПДРФ этой семьи в системе *KM.19/PstI* методами блот-гибридизации (рисунок, б) и ПСА (рисунок, в) демонстрируют идентичные результаты.

В табл. 4 суммированы данные сцепления мутации КФ с гаплотипами, выявленными в двухзондовой системе. Из таблицы следует, что

Таблица 4

Частота гаплотипов полиморфных аллелей *KM.19* и *XV-2c* в различных популяциях среди здоровых доноров и больных КФ

Allele frequencies for the polymorphic sites of *KM.19* and *XV-2c* loci in different populations and in cystic fibrosis families

| Гаплотип | | Частота, % | | | | | |
|--------------|--------------|-------------|------|----------------------|------|-------------|------|
| <i>KM.19</i> | <i>XV-2c</i> | Наши данные | | Северная Европа [12] | | Италия [13] | |
| | | Доноры | КФ | Доноры | КФ | Доноры | КФ |
| <i>K2</i> | <i>X2</i> | 7,3 | — | 10,7 | 3,1 | 6,8 | 9,4 |
| <i>K2</i> | <i>X1</i> | 12,0 | 73,3 | 16,4 | 84,7 | 23,4 | 72,7 |
| <i>K1</i> | <i>X1</i> | 34,7 | 13,3 | 28,9 | 5,1 | 29,9 | 8,6 |
| <i>K1</i> | <i>X2</i> | 46,0 | 13,4 | 44,0 | 6,8 | 39,2 | 9,4 |

в обследованных нами семьях с КФ гаплотип *K2—X1* маркировал хромосомы, несущие мутантный локус КФ в 73,3 % от общего числа проанализированных хромосом этой группы. Частота этого гаплотипа для нормальных хромосом составляла лишь 12 %. Таким образом, наблюдалось значительное аллельное сцепление мутации КФ с гаплотипом *X1—K2*. Хорошее соответствие результатов, полученных нами и другими авторами по Северной Европе и Италии (табл. 4), свидетельствует о том, что указанный тип сцепления является преобладающим во всех трех регионах. В нашем распоряжении имеется маркерный локус, ко-

горый можно использовать: для верификации диагноза КФ; для определения носительства мутантного аллеля в популяции; а также для пренатальной диагностики КФ на ранних стадиях беременности. Надежность и высокая информативность метода (70—80 % семей являются полностью информативными хотя бы в одной из изученных систем) позволяют не только своевременно начать симптоматическое лечение КФ, но также и предупредить рождение гомозигот, больных КФ.

Работа частично финансируется Всемирной организацией здравоохранения (гранты №№ 3/181/38 и 3/181/139).

POPULATION AND FAMILY ANALYSIS OF POLYMORPHISM OF DNA SEQUENCES LINKED TO THE CYSTIC FIBROSIS GENE

*O. V. Voronina, V. S. Gaitshoki, T. E. Ivashchenko, V. S. Baranov,
V. A. Gorbunova, V. M. Kalinin, L. A. Livshitz, M. T. Venozhinskas*

Institute of Experimental Medicine,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad
Institute of Obstetrics and Gynecology,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad
Institute of Medical Genetics,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow
Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences, of the Ukrainian SSR, Kiev
Institute for Protection of Mothers and Children,
Ministry of Public Health of the Lithuanian SSR, Vilnius

Summary

The allelic polymorphism of human DNA loci linked to cystic fibrosis gene (D7S8, Met and D7S23) was studied using blot hybridization and polymerase chain reaction in the populations of healthy donors in Leningrad and in donors from Moscow (D7S8) and Kiev (Met). The restriction fragment length polymorphism (RELP) in Leningrad and Kiev populations corresponds to RELP found in Northern Europe countries while in Moscow population a shift in the allele frequencies is observed, that appears to depend upon the contribution of mongoloids having very low frequency of cystic fibrosis. The marked linkage disequilibrium between cystic fibrosis mutation and particular RELP alleles in D7S23 locus (KM.19 and XV-2c probes) is found in the affected families.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Harris A., Super M.* Cystic fibrosis. The fact.— Oxford: Univ. press, 1987.— 133 p.
2. *Construction of a general human chromosome jumping library with application to cystic fibrosis / F. Collins, M. L. Drumm, C. L. Effery et al. // Science.— 1987.— 235, N 4792.— P. 1046—1049.*
3. *Linkage disequilibrium and the origins of cystic fibrosis / X. Estivill, P. Frederick, B. Wainwright et al. // Excerta med. Int. Congr. Ser.— 1988.— 74.— P. 9—10.*
4. *Schmidtke J., Krawczak M., Schwartz M.* Linkage relationships and allelic association of the cystic fibrosis locus and four marker loci // *Hum. Genet.— 1987.— 76, N 4.— P. 337—343.*
5. *Cystic fibrosis DNA markers in Alabama blacks / R. K. Martin, G. C. Kaplan, T. W. Hodge, P. E. Barker // Genomics.— 1988.— N 3.— P. 385—388.*
6. *Allelic association of the cystic fibrosis locus and two DNA markers, XV-2c and KM.19 in 55 German families / M. Krawczak, D. S. Konecki, J. Schmidtke et al. // Hum. Genet.— 1988.— 80, N 1.— P. 78—80.*
7. *Pattern of polymorphism and linkage disequilibrium for cystic fibrosis / X. Estivill, P. J. Scambler, B. C. Wainwright et al. // Genomics.— 1987.— N 1.— P. 257—263.*
8. *Maniatis T., Fritsch E. E., Sambrook J.* Molecular cloning A laboratory manual.— New York: Cold Spring Harbor Lab, 1982.— 477 p.
9. *Bell G. I., Karam T. H., Rutter W. F.* Polymorphic DNA region adjacent to the 5' end of the human insulin gene // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1981.— 78, N 9.— P. 5759—5763.*
10. *Southern E.* Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // *J. Mol. Biol.— 1975.— 98, N 3.— P. 503.*
11. *Goodchild M. C., Dodge J. A.* Cystic fibrosis. Manual of diagnosis and treatment.— London: Bailliere Tindall, 1985.— 212 p.
12. *Use of linkage disequilibrium data in prenatal diagnosis of cystic fibrosis / L. Strain, A. Curtis, M. Memil et al. // Hum. Genet.— 1988.— 80, N 1.— P. 75—77.*

13. *Linkage disequilibrium between cystic fibrosis and linked DNA polymorphism in Italian families: a collaborative study* / X. Estivill, M. Farrall, R. Williamson et al // Amer. J. Hum. Genet.— 1988.— 43, N 1.— P. 23—28.

НИИ эксперим. медицины АМН СССР, Ленинград
Ин-т акушерства и гинекологии АМН СССР, Ленинград
Ин-т мед. генетики АМН СССР, Москва
Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев
НИИ охраны материнства и детства МЗ ЛитССР, Вильнюс

Получено 23.06.89

УДК 577.21

**В. П. Шульженко, С. Н. Новикова, И. Е. Костецкий,
Л. П. Богацкая, В. В. Фролькис, В. А. Кордюм**

ИМПЛАНТАЦИЯ КЛОНИРОВАННОГО ГЕНА АпоА1 ЧЕЛОВЕКА ВЗРОСЛЫМ И СТАРЫМ КРОЛИКАМ

Сконструирована рекомбинантная ДНК, содержащая Апо-повтор человека и клонированный нами ген АпоА1 человека. Инъекция заключенного в липосомы генетического материала взрослым и старым кроликам приводит к появлению в крови экспериментальных животных белкового продукта гена АпоА1 человека, который обнаруживается иммуноэлектрофорезом в агарозном геле со специфической антисывороткой к этому белку. У экспериментальных животных происходит существенная перестройка содержания холестерина (ХС) и различных классов липопротеидов.

Введение. В соответствии с современными представлениями о роли нарушений липидного и липопротеидного метаболизма в развитии атеросклероза многочисленные клинические и экспериментальные попытки профилактики и лечения этого заболевания основываются на использовании средств, снижающих уровень липидов в крови [1, 2]. Вместе с тем известно, что развитие атеросклероза сопряжено с изменениями не только липидной, но и белковой части липопротеидов — апопротеинов [3]. Аполипопротеин А1 — главный компонент (70 %) белковой фракции липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), которые обладают способностью регулировать уровень ХС в крови и удалять его из клеток сосудов. Важная антиатерогенная роль этой фракции липопротеидов подтверждается большим количеством эпидемиологических исследований, показывающих, что представители человеческой популяции, имеющие высокий уровень ЛПВП, не болеют атеросклерозом, а дефициты данной фракции липопротеидов коррелируют с риском возникновения сердечно-сосудистых патологий [4—6]. Это определяет новые подходы к поиску антиатеросклеротических препаратов среди веществ, влияющих на синтез ЛПВП.

Исходя из вышесказанного, перспективной представляется попытка в случаях дефицита повысить уровень ЛПВП с помощью генотерапевтической коррекции. Данные литературы свидетельствуют о проведении большого числа исследований по клонированию Апо-генов человека и АпоА1-гена в частности [7, 8]. Показана экспрессия гена АпоА1 человека в культуре клеток человека и животных [9—11]. Вместе с тем характер экспрессии в культуре клеток и на уровне интактного организма, как можно ожидать, будет существенно отличаться. В этой связи нами поставлена задача — осуществить имплантацию гена А1 в клетки разных тканей модельных животных и изучить их функционирование на уровне интактных организмов. Настоящая работа является первым этапом данного исследования и посвящена определению принципиальной возможности экспрессии клонированного нами гена АпоА1 человека на экспериментальных животных *in vivo*.

Материалы и методы. Для клонирования гена АпоА1 человека была использована библиотека генов человека, сконструированная на основе λ -вектора Харон. 4А.