

Резюме

Одержана антисмислова конструкція кДНК рецептору ліпопротеїнів низької щільності (рЛНЩ) людини. Ця конструкція містить 5'-кінцевий фрагмент (1,1 тис. п. н.) кДНК рЛНЩ та промотор гену металотіонеїну миші і може бути використана для створення трансгенних тварин, дефіцитних по рЛНЩ.

Summary

The anti-sense cDNA construction of human low-density lipoprotein receptor (rLDL) was obtained. It includes the 5'-terminal fragment of cDNA rLDL and the murine metallothionein gene promoter. The construction may be used to obtain transgenic animals that are deficient of rLDL.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Green P. J., Pines O., Inouye M. The role of antisense RNA in gene regulation // Ann. Rev. Biochem.— 1986.— 55.— P. 569—597.
2. Michael S., Brown C., Goldstein J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis // Science.— 1986.— 232, N 4746.— P. 34—40.
3. Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice / R. D. Palmiter, G. Norstedt, R. E. Gelinis et al. // Ibid.— 1983.— 222, N 4625.— P. 809—814.
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 420 с.
5. Calvin N. M., Hanawalt P. C. High-efficiency transformation of bacterial cells by electrophoration // J. Bacteriol.— 1988.— 170, N 6.— P. 2796—2801.
6. Hammer R. E. Expression of human growth hormone releasing factor in transgenic mice results in increased somatic growth // Nature.— 1985.— 315, N 6008.— P. 413—416.
7. Моделирование генетической коррекции семейной гиперхолестеринемии / Н. Б. Должанская, М. Ю. Мандельштам, Е. Л. Паткин и др. // Биополимеры и клетка.— 1990.— 6, № 2.— С. 31—35.

НИИ эксперим. медицины АМН СССР, Ленинград

Получено 05.07.90

УДК 616-056.7:616.153.922

М. Ю. Мандельштам, Б. М. Липовецкий, А. Л. Шварцман,
В. С. Гайцхоки

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВОЙ ДЕЛЕЦИИ В ГЕНЕ РЕЦЕПТОРА ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ ЧЕЛОВЕКА У ПАЦИЕНТА С СЕМЕЙНОЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИЕЙ

Семейная гиперхолестеринемия (СГ) — аутосомно-доминантное заболевание человека, причиной которого на молекулярном уровне являются различные мутации гена рецептора липопротеинов низкой плотности (рЛНП). В работе мы описываем новую делецию протяженностью 5 тыс. нуклеотидных пар в локусе рЛНП у больного с фенотипом СГ. Делеция элиминирует экзоны 4, 5 и, вероятно, экзон 6 гена рЛНП. Определение природы наследственного дефекта позволяет осуществить раннюю диагностику СГ у детей больной. Обсуждается значение межиндивидуальных различий в развитии СГ.

Введение. СГ — наследственное заболевание человека, обусловленное нарушениями функций рецептора ЛНП вследствие различных мутаций в его гене. Гетерозиготная форма СГ в большинстве изученных

© М. Ю. МАНДЕЛЬШТАМ, Б. М. ЛИПОВЕЦКИЙ, А. Л. ШВАРЦМАН, В. С. ГАЙЦХОКИ, 1991

популяций выявляется у одного индивидуума среди 500 обследованных, гомозиготная форма встречается с частотой один случай на миллион новорожденных [1].

Спектр изменений, ведущих к заболеванию, чрезвычайно широк. Описаны группы мутаций в локусе рЛНП, имеющих как следствие нарушение способности рецептора связывать липопротеины или интернализировать их, а также таковые, выражающиеся в блоке правильного созревания рецепторного белка или его внутриклеточного транспорта [2]. Также разнообразна и молекулярная природа мутаций, вызывающих нарушение функций рЛНП [3, 4]. Описаны такие из них, как сдвиг рамки считывания, нонсенс- и миссенс-мутации, а также крупномасштабные перестройки локуса рЛНП. Из числа мутаций гена рЛНП заметную долю составляют протяженные делеции (в различных популяциях от 2 [5] до более чем 60 % [6] всех случаев СГ). Подобная ситуация обусловлена тем, что в интронах гена и в экзоне 18 обнаружены повторы Aи-семейства и, кроме того, в 5'-концевой части гена и в самой мРНК содержится значительное число повторов нескольких типов [7].

Различные популяции отличаются по набору присутствующих в них мутаций гена рЛНП. В немногих хорошо очерченных и этнически замкнутых популяциях доминируют определенные мутации, что позволяет легко проводить прямую ДНК-диагностику СГ. Наиболее яркие примеры подобного «эффекта основателя» дают финская популяция и субпопуляция франкоязычных канадцев, в которых соответственно 31 [8] и 63 % [6] всех случаев СГ вызваны делецией одного вида. В популяциях потомков буров в ЮАР [9—11] и у франкоязычных канадцев [6, 12] две различные охарактеризованные мутации определяют высокую частоту СГ в этих этнических группах. В то же время в небольшой островной популяции исландцев существуют по меньшей мере четыре вида генетических дефектов, выражающихся в развитии СГ [13]. Однако в большинстве популяций смешанного происхождения, в том числе среди белых людей — жителей США, каждая описываемая мутация уникальна и обнаруживается лишь у немногих родственников больного. В данной работе мы описываем новую делецию в гене рЛНП в семье с СГ, проживающей в Ленинграде. Характеристика конкретной природы мутаций в локусе рЛНП позволит осуществить диагностику СГ и принять своевременно меры, направленные на предотвращение развития заболевания.

Материалы и методы. Плазмида *pLDLR-3*, содержащая полноразмерную рЛНП «ДНК человека [14], получена для популяционных исследований от Д. Рассела (Университет штата Техас, США) и передана нам А. Н. Климовым.

Липиды плазмы крови доноров анализировали на аппарате «Техникон». Поиск геномных перестроек в локусе рЛНП производили у больных с гиперлипидемией типов IIa и IIb, отобранных таким образом, чтобы они удовлетворяли хотя бы одному из двух критериев: 1) в семье больного в двух поколениях должны быть родственники, страдавшие атеросклерозом коронарных сосудов; 2) у больного имеются подкожные ксантомы или ксантомы сухожилий в сочетании с гиперлипидемией типа IIa.

Геномную ДНК выделяли из 5—10 мл несвернувшейся крови по методу Кюнцеля [15] в модификации Белла и др. [16] для небольших количеств крови.

Гибридизацию геномной ДНК на фильтрах производили, как описано ранее [17].

Результаты и обсуждение. ДНК от 20 не являющихся родственниками пациентов с гиперлипидемией использовали для выявления крупномасштабных перестроек в локусе рЛНП. Для поиска делеций и инсерций в 5'-половине гена ДНК обрабатывали рестриктазой *BamHI* и гибридизовали с ДНК-зондом, специфичным для экзона 1—11 гена рЛНП. Используемая ДНК-проба представляла собой *HindIII-BglIII-*

фрагмент размером 1,8 тыс. пар нуклеотидов (п. н.) плазмиды *pLCLR-3*, содержащей полноразмерную рЛНП кДНК человека. Зонд включал нуклеотиды $-13 + 1708$ последовательности кДНК, нумерация нуклеотидов по [14]. ДНК тех же пациентов переваривали рестриктазами, имеющими полиморфные сайты в 3'-части гена рЛНП, а именно: *PvuII* [18], *StuI* [19], *BstEII* [20]. Для выявления названных полиморфизмов гибридизовали фильтры с клонированным *BamHI*-фрагментом плазмиды *pLCLR-3* размером 1,9 тыс. п. н. (проба для экзонов 11—18 гена рЛНП). Зонд включает нуклеотиды 1570—3489 полноразмерной рЛНП кДНК, нумерация согласно [14].



Гибридизация геномной ДНК, подвергнутой полному гидролизу рестриктазой *BamHI*, с пробой на 5'-половину гена обнаруживает три фрагмента, хорошо разделяющихся на гель-электрофорезе (рис. 1), а именно: 16 тыс. п. н., включающий последовательности экзонов 2—7; 5,5 тыс. п. н., содержащий только экзон 1 из кодирующей последовательности; 2,2 тыс. п. н., выявляемый только с пробой, нескрывающей экзоны 8 и 9 гена (рис. 2). У больной А. Д., однако, в дополнение к названным фрагментам присутствовал фрагмент размером 11 тыс. п. н., не обнаруженный ни у кого из 19 остальных пациентов и у здоровых доноров. В 5'-области гена рЛНП не было описано

Рис. 1. Гибридизация по Саузерну геномной ДНК, обработанной рестриктазой *BamHI*, с зондом на 1—11-й экзоны гена рЛНП. Семья больной А. Д.: 1 — ДНК здоровой дочери; 2 — ДНК больной А. Д. На дорожке 2 видно присутствие необычного фрагмента размером 11 тыс. п. н., не встречающегося у здоровых доноров. Здесь и далее цифры слева указывают длину маркерных рестрикционных фрагментов в тыс. п. н.

полиморфных сайтов для рестриктазы *BamHI*. У здоровой дочери больной А. Д. данный фрагмент также отсутствовал (см. рис. 1). Чтобы исключить возможность часто встречающихся артефактов гибри-

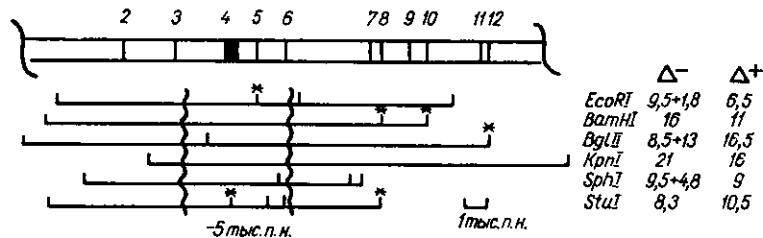


Рис. 2. Новая делеция в гене рЛНП. На физической карте центральной части гена экзоны показаны черным, а интроны — белым цветом. Цифры 2—12 отвечают номерам экзонов. Волнистая линия обозначает границы делеции. Размер фрагментов гена, образующихся под действием различных ферментов рестрикции, у здоровых доноров при отсутствии делеции (Δ^-) и у больной А. Д., несущей мутантный аллель (Δ^+), указан в правой части рисунка в тыс. п. н. Звездочками отмечены сайты для рестриктаз, находящиеся в кодирующей последовательности

зации, мы воспроизвели данный результат в пяти гибридизационных опытах на двух независимо выделенных препаратах геномной ДНК. Кроме того, ДНК больной А. Д. обрабатывали другими ферментами рестрикции для исключения небольшой вероятности того, что *BamHI*-фрагмент размером 11 тыс. п. н. является все же редким полиморфным вариантом. Результаты гибридизации суммированы на рис. 2, а, соответствующие блотинги показаны на рис. 3—5. Использование любого

из перечисленных на рис. 2 ферментов приводит к обнаружению при блот-гибридизации дополнительных фрагментов, несущих последовательности гена рЛНП, необычной молекулярной массы. Чтобы уточнить границы делеции, мы также регидризовали фильтр, изображенный на рис. 1, с *HindIII-PvuII*-фрагментом плазмиды *pLDLR-3* размером 0,24 тыс. п. н. (нуклеотиды —13 +223 последовательности рЛНП кДНК, нумерация по [14]), представляющим собой пробу, специфичную для экзонов 2, 3 гена. При гибридизации и в этом случае обнаруживается фрагмент аномальной молекулярной массы, что свидетельствует о сохранении экзона 2 и, возможно, экзона 3 в составе описываемого аллельного варианта гена рЛНП. *KpnI*-сайт в интроне 2 также

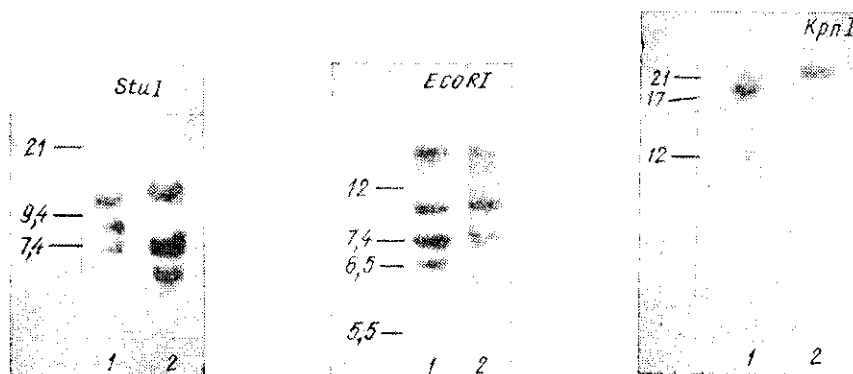


Рис. 3. Гибридизация по Саузерну геномной ДНК, гидролизованной рестриктазой *StuI*, с зондом на 1—11-й экзоны гена рЛНП. Семья больной А. Д.: 1 — ДНК больной А. Д.; 2 — ДНК здоровой дочери. На дорожке 1 видно присутствие необычного фрагмента размером 9 тыс. п. н., не встречающегося у здоровых доноров

Рис. 4. Гибридизация по Саузерну *EcoRI*-фрагментов геномной ДНК с зондом на 1—11-й экзоны гена рЛНП. Семья больной А. Д.: 1 — ДНК больной А. Д.; 2 — ДНК здоровой дочери. На дорожке 1 видно присутствие необычного фрагмента размером 6,5 тыс. п. н., не встречающегося у здоровых доноров

Рис. 5. Гибридизация по Саузерну геномной ДНК, гидролизованной рестриктазой *KpnI*, с зондом на экзоны 1—11-й гена рЛНП. Семья больной А. Д.: 1 — ДНК больной А. Д.; 2 — ДНК здоровой дочери. На дорожке 1 видно присутствие необычного фрагмента размером 16 тыс. п. н., не встречающегося у здоровых доноров

сохранен (рис. 2, 5), *BglII*-сайт в интроне 3 в мутантном гене определенно утрачен (данные не приведены), чем и определяется возникновение рестрикционного *BglII*-фрагмента размером 16,5—17 тыс. п. н. в результате «слияния» двух *BglII*-фрагментов размером 13 и 8,5 тыс. п. н., непосредственно прилежащих друг к другу в структуре гена (см. рис. 2), за вычетом делеции протяженностью 5 тыс. п. н.

Вся совокупность данных, приведенных на рис. 2, совместима только с представлением о наличии делеции протяженностью 5 тыс. п. н. в центральной части гена рЛНП. Левая граница делеции лежит между *KpnI*-сайтом в интроне 2 и *BglII*-сайтом в интроне 3, а правая — между сайтом для рестриктазы *StuI* в интроне 5 и *EcoRI*-сайтом в интроне 6. Окончательное картирование границ делеции может быть произведено только при использовании для гибридизации экзон-специфичных проб, тем не менее представляется вероятным предположение, вытекающее из оценки размеров делеции, о том, что в мутантном аллеле экзон 3 сохранен, а экзон 6 удален. Интрон 6 является своего рода районом внутренней нестабильности гена рЛНП и значительное число делеций имеет свою границу в нем [5]. Экзоны 4, 5 со всей определенностью, а также, по-видимому, и экзон 6 отсутствуют в мутантном аллеле. В 5'-части гена рЛНП ранее описаны две делеции протяженностью около 5 тыс. п. н., однако одна из них элиминирует экзоны 2 и 3 [2]. Другая делеция, как и первая, описана на канадской популяции и элиминирует, вероятно, экзоны 4—6 из гена рЛНП (СГ 154 по [5]). Однако данная делеция захватывает и *EcoRI*-сайт в интроне 6, и находящийся

в 3'-направлении от *EcoRI*-сайта *XhoI*-сайт в интроне 6 и, таким образом, имеет отличную от описываемой нами новой делеции, по крайней мере, правую границу. Секвенирование мутантного аллеля позволит определить, имеет ли значение для его происхождения рекомбинация между повторами семейства *Alu* или другими повторяющимися последовательностями. Так как последовательность интронов гена рЛНП неизвестна, амплификация *in vitro* мутантного аллеля в районе точек рекомбинации невозможна и необходимо его клонирование в фаговом векторе. Хромосома, несущая мутантный ген, принадлежит к наиболее

Липиды плазмы крови больных из родословной с семейной гиперхолестеринемией
Blood serum lipids of patients from a pedigree with familial hypercholesterolemia

Пациент	Возраст	Холестерин плазмы, мг/дл	Триглицериды, мг/дл	Холестерин ЛВП, мг/дл	K_a^*	Примечание	
И., отец А. Д.	42	421	84	36	10,2	Умер в 46 лет от инсульта	
	46	512	90	48	9,3		
А. Д.	30	388	66	67	4,6	Имеет делецию в гене рЛНП	
	30	345	68	67	4,2		
	30	317	70	67	3,5		
(первый месяц лечения ловастатином 40 мг/день)							
А., дочь А. Д.	8	158	44	96	0,5	Не имеет делеции в гене рЛНП	
		Гиперальфалипотенемия					
Сын А. Д., 9 мес.	Необходима ДНК-диагностика для проверки СГ	для проверки					наличия или отсутствия

* K_a — отношение холестерина ЛНП к ЛВП.

часто встречающемуся в популяции типу, в котором нет редко обнаруживаемых полиморфных сайтов для рестриктаз *PvuII* и *StuI*. Известно, что для рестриктазы *PvuII* чаще имеет место отсутствие сайта на дефектных хромосомах, нежели его присутствие [21]. Описываемая нами мутация может вносить небольшой вклад в это неравновесие по сцеплению между *PvuII*-гаплотипом и *C7*.

Идентификация молекулярной природы наследственного дефекта в семье больной А. Д. позволит осуществить постнатальную диагностику у ее детей. Как видно из таблицы, у дочери больной А. Д. гиперхолестеринемия нет, в то же время она не унаследовала мутантного аллеля (см. рис. 1). Особое значение имеет проведение диагностики для новорожденного сына больной А. Д., так как у мужчин рассматриваемое заболевание протекает тяжелее, чем у женщин. Диагностика, основанная только на анализе содержания липидов в плазме, у лиц столь молодого возраста часто не позволяет однозначно судить о перспективах развития у них гиперлипидемии [22]. Своевременно поставленный диагноз предоставит возможность принять меры превентивного характера, направленные на предотвращение развития заболевания у ребенка, в первую очередь коррективы диеты [23]. Кроме того, у больной А. Д. после первого месяца лечения ловастатином (мевинолином) даже при дозе 40 мг в день обнаруживается позитивная тенденция к снижению уровня холестерина плазмы. Ловастатин (мевинолин) — наилучший из существующих к настоящему времени гипохолестеринемических агентов. Однако он отличается по степени своего действия для разных гетерозигот по СГ [24, 25]. Представляется, что в данной семье лечение ловастатином будет весьма эффективным. У отца больной А. Д., больного И., лечение холецирамином не дало положительных результатов, поэтому ловастатин будет являться предпочтительным лекарством для рассматриваемой семьи.

Описанная мутация, удаляющая экзоны 4—6 гена рЛНП, исходя из структуры гена [7] должна приводить к образованию аллеля, образующего правильно сплайсированную мРНК, так как кодирующие после-

довательности прерваны интронами после первого нуклеотида кодонов аминокислот. Удаление трех экзонов не приведет к сдвигу рамки считывания и получаемая «мутантная» мРНК будет способна направлять синтез «укороченного» белкового продукта со всеми доменами, за исключением большей части домена связывания лиганда. Нарушения структуры в этой области белка могут приводить к нарушению его созревания и транспорта (многие точечные мутации) [26, 27] или, не влияя на процессинг белка, вызывать снижение способности рЛНП к связыванию лиганда, либо вести к изменению аффинности рецептора по отношению к разным лигандам (некоторые крупные делеции) [28, 29]. Использование культивируемых лимфоцитов или фибробластов от больной А. Д. позволит определить, на какой стадии процессинга белка или его функционирования осуществляется действие описываемой мутации.

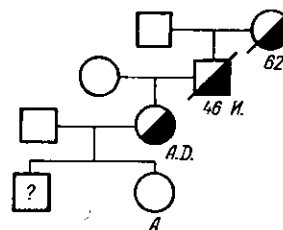


Рис. 6. Родословная семьи больной А. Д. Цифрами указана продолжительность жизни носителей мутантного гена. 9-месячному сыну больной А. Д. требуется проведение диагностики СГ

Обращает на себя внимание еще одно интересное обстоятельство. И., отец больной А. Д., и ее бабушка по отцовской линии (рис. 6) имели не только гиперхолестеринемию, но и страдали облитерирующим атеросклерозом нижних конечностей и ишемической болезнью сердца. У больной А. Д. в возрасте 30 лет нет типичных проявлений ишемической болезни сердца, велоэргометрическая проба характерных проявлений коронарной недостаточности не выявляет, несмотря на то, что переносимость ее низкая. В то же время больная А. Д. имеет типичную гиперлипидотемию типа IIa и ксантомы сухожилий. Причину данного несоответствия между клиническими и биохимическим фенотипами мы усматриваем не только в возрасте больной, но и в высоком уровне альфа-холестерина, препятствующем развитию атеросклеротического поражения сосудов, хотя, по некоторым данным, его содержание положительно коррелирует со степенью развития ксантом [24]. Дочь больной А. Д. не несет мутантного аллеля, тем не менее ее следует причислить к гиперальфалипидотеинемическим субъектам. Коэффициент атерогенности у отца больной А. Д. много выше нормы, у больной А. Д. — приближен к норме, а у дочери он значительно ниже (таблица). Следует предположить наличие неаллельного по отношению к гену рЛНП гена или генов-модификаторов, присутствие которых может в значительной мере способствовать более мягкому протеканию заболевания. Роль индивидуальных особенностей в развитии атеросклероза показана даже для случаев гомозиготной СГ, когда ишемическая болезнь сердца может не развиваться даже до зрелого возраста [30]. Важным является изучение влияния генов, отличных от гена рЛНП, на патогенез СГ.

В заключение отметим, что описание новой делеции позволит осуществить раннюю диагностику СГ в семье больной А. Д., кроме того, данная мутация представляет интерес как первый из охарактеризованных на уровне гена случаев СГ в СССР.

Резюме

Сімейна гіперхолестерінемія (СГ) — аутосомно-домінантне захворювання людини, причиною якої на молекулярному рівні є різні мутації гену рецептору ліпопротеїнів низької щільності (рЛНЩ). В роботі ми описуємо нову делецію довжиною 5 тис. нуклеотидних пар в локусі рЛНЩ у хворого з фенотипом СГ. Делеція елімінує екзони 4, 5 і, напевне, 6 гену рЛНЩ. Виявлення природи спадкового дефекту дозволяє провести ранню діагностику СГ у дітей хворої. Обговорюється значення міжіндивідуальних розбіжностей у розвитку СГ.

Summary

Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant human genetic disease, caused at the molecular level by different mutations in the low density lipoprotein receptor (LDLR) gene. In this paper we describe a new LDLR gene deletion 5 kb in length from a patient with FH phenotype. The deletion is shown to eliminate exons 4 and 5 from the gene and also with a high probability exon 6 of the gene. The elucidation of the nature of inherited disorder makes it possible to perform the early FH diagnostics in children of the sick patient. The role of individual differences in FH development is discussed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goldstein J. L., Brown M. S. Familial hypercholesterolemia // The metabolic basis of inherited disease / Eds J. B. Stanbury et al.—New York: McGraw-Hill, 1983.— P. 672—712.
2. Goldstein J. L., Brown M. S. The LDL receptor and the regulation of cellular cholesterol metabolism // J. Cell. Sci.—1985.— Suppl., N 3.— P. 131—137.
3. Brown M. S., Goldstein J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis // Science.—1986.— 232, N 4746.— P. 34—47.
4. Russell D. W., Esser V., Hobbs H. H. Molecular basis of familial hypercholesterolemia // Arteriosclerosis.—1989.— 9, N 1.— P. 1—8—1—13.
5. Langlois S., Kastelein J. J. P., Hayden M. R. Characterization of six partial deletions in the low density lipoprotein (LDL) receptor gene causing familial hypercholesterolemia (FH) // Amer. J. Hum. Genet.—1988.— 43, N 1.— P. 60—68.
6. Deletion in the gene for the low-density lipoprotein receptor in a majority of French Canadians with familial hypercholesterolemia / H. Hobbs, M. S. Brown, D. W. Russell et al. // New Engl. J. Med.—1987.— 317.— P. 734—737.
7. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins / T. S. Südhof, J. L. Goldstein, M. S. Brown, D. W. Russell // Science.—1985.— 228, N 4701.— P. 815—822.
8. Identification of a deletion in the LDL receptor gene. A Finnish type of mutation / K. Aalto-Setälä, H. Gylling, T. Miettinen, K. Kontula // FEBS Lett.—1988.— 230, N 1,2.— P. 31—34.
9. Haplotype association of three DNA polymorphisms at the human low density lipoprotein receptor gene locus in familial hypercholesterolemia / M. J. Kotze, E. Langenhoven, A. E. Retief et al. // J. Med. Genet.—1987.— 24, N 12.— P. 750—755.
10. Familial hypercholesterolemia in South African Afrikaners: *PvuII* and *StuI* DNA polymorphisms in the LDL-receptor gene consistent with a predominating founder gene effect / P. A. Brink, L. T. Steyn, G. A. Coetzee, D. R. van der Westhuyzen // Hum. Genet.—1987.— 77.— N 1.— P. 32—35.
11. The identification of two low density lipoprotein receptor gene mutations in South African familial hypercholesterolaemia / M. J. Kotze, E. Langenhoven, L. Warnich et al. // S. Afr. Med. J.—1989.— 76, N 8.— P. 399—401.
12. Identification of a second «French Canadian» LDL receptor gene deletion and development of a rapid method to detect both deletions / Y. Ma, C. Bétard, M. Roy et al. // Clin. Genet.—1989.— 36, N 4.— P. 219—228.
13. A study of familial hypercholesterolemia in Iceland using RFLPs / R. Taylor, J. Bryant, V. Gudnasson et al. // J. Med. Genet.—1989.— 26, N 8.— P. 494—498.
14. The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA / T. Yamamoto, C. G. Davis, M. S. Brown et al. // Cell.—1984.— 39, N 1.— P. 27—38.
15. Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants / L. M. Kunkel, K. D. Smith, S. H. Boyer et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1977.— 74, N 3.— P. 1245—1249.
16. Bell J. I., Karam J. H., Rutler W. J. Polymorphic DNA region adjacent to the 5' end of the human insulin gene // Ibid.—1981.— 78, N 9.— P. 5759—5763.
17. Манделъштам М. Ю., Сасина Л. К., Шварцман А. Л. ДНК-диагностика семейной гиперхолестеринемии // Биополимеры и клетка.—1990.— 6, № 1.— С. 56—63.
18. A common DNA polymorphism of the low-density lipoprotein (LDL) receptor gene and its use in diagnosis / S. E. Humphries, B. Horsthemke, M. Seed et al. // Lancet.—1985.— N 8436.— P. 1003—1005.
19. A DNA polymorphism in the human low-density lipoprotein receptor gene / M. J. Kotze, A. E. Retief, P. A. Brink, H. F. H. Weich // S. Afr. Med. J.—1986.— 70, N 1.— P. 77—79.
20. RFLP for the human LDL receptor (*LDLR*) gene: *BstEII* / I. T. Steyn, A. Pretorius, P. A. Brink, A. J. Bester // Nucl. Acids Res.—1987.— 15, N 11.— P. 4702.
21. Pedersen J. C., Berg K. Normal DNA polymorphism at the low density lipoprotein receptor (LDLR) locus associated with serum cholesterol level // Clin. Genet.—1988.— 34, N 5.— P. 306—312.
22. Humphries S. E., Taylor R., Munroe A. Resolution, by DNA probes, of uncertain diagnosis of inheritance of hypercholesterolemia // Lancet.—1988.— N 8614.— P. 794—795.

23. *Kwiterovich P. O., Jr.* Pediatric implications of heterozygous familial hypercholesterolemia. Screening and dietary treatment // *Arteriosclerosis*.— 1989.— 9, Suppl. 1.— P. I-111 — I-120.
24. *Witztum J. L.* Current approaches to drug therapy for the hypercholesterolemic patients // *Circulation*.— 1989.— 80, N 5.— P. 1101—1114.
25. *Cuthbert J. A., Lipsky P. E.* Identification of Low density lipoprotein receptor abnormalities by assaying functional receptors on proliferating lymphocytes // *Arteriosclerosis*.— 1989.— 9, Suppl. 1.— P. I-43 — I-49.
26. *Deletion* in the first cysteine-rich repeat of the low density lipoprotein receptor impairs its transport but not lipoprotein binding in fibroblasts from a subject with familial hypercholesterolemia / E. Leitersdorf, H. H. Hobbs, A. M. Fourie et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 1988.— 85, N 21 — P. 7912—7916.
27. *Esser V., Russell D. W.* Transport deficient mutations in the low density lipoprotein receptor. Alterations in the cysteine rich and cysteine poor regions of the protein block intracellular transport // *J. Biol. Chem.*— 1988.— 263, N 26.— P. 13276—13281.
28. *Deletion* of exon encoding a cysteine-rich repeat of LDL receptor alters its binding specificity in a subject with familial hypercholesterolemia / H. H. Hobbs, M. S. Brown, J. L. Goldstein, D. W. Russell // *Ibid.*— 1986.— 261, N 28.— P. 13114—13120.
29. *Mutational analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor* / V. Esser, L. E. Limbird, M. S. Brown et al. // *Ibid.*— 1988.— 263, N 26.— P. 13282—13290.
30. *A 31-year old woman with homozygous familial hypercholesterolemia without significant lesions in the coronary arteries* / S. Yamashita, Y. Ueyama, T. Funahashi et al. // *Atherosclerosis*.— 1986.— 62, N 2.— P. 117—121.

НИИ эксперим. медицины АМН СССР. Ленинград

Получено 05.07.90

УДК 616-055.5/7-084:614:061.14

**Т. К. Кащеева, Т. В. Кузнецова, Ю. К. Рамша,
В. М. Лебедев, Т. Э. Иващенко, В. С. Баранов**

ПРИМЕНЕНИЕ РЕАКЦИИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ В ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ПОЛА ПЛОДА И ГЕНОТИПИРОВАНИИ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Работа суммирует результаты анализа пола плода с помощью полимеразной цепной реакции синтеза ДНК (ПЦР) и наборов Y-специфичных олигонуклеотидов в клетках биоптата хориона, амниоцитах, в материале цитогенетических препаратов и образцах периферической крови матери. В специальных сериях опытов методом ПЦР определено наличие Y-специфичных последовательностей в клетках крови индивидуумов с нарушениями половой дифференцировки, а также в отдельных сперматозоидах человека. Обсуждаются перспективы использования неинвазивных методов для определения пола внутриутробного плода при помощи ПЦР и олигонуклеотидов, специфичных для X и Y хромосом.

Введение. Полимеразная цепная реакция синтеза ДНК — реакция специфической амплификации (РСА) — благодаря своей простоте и исключительно высокой чувствительности широко применяется в медицинской генетике, в том числе в пренатальной диагностике наследственных болезней [1, 2]. Учитывая большую распространенность X-сцепленных наследственных заболеваний, а также сравнительно высокую частоту числовых и структурных перестроек половых хромосом, проблема точной диагностики генетического пола на разных стадиях онтогенеза человека сохраняет свою актуальность. Между тем, диагностика пола по интерфазным ядрам амниоцитов или клеток хориона не всегда надежна, а метафазные пластинки в биоптате хориона и культурах амниоцитов нередко отсутствуют.

Принципиально новые возможности в этом направлении открывают X- и Y-хромосомоспецифичные зонды и ПЦР. Разработаны удобные системы олигонуклеотидов, с помощью которых в ПЦР можно осуществить направленную амплификацию различных участков Y-хромосомы,

© Т. К. КАШЕЕВА, Т. В. КУЗНЕЦОВА, Ю. К. РАМША, В. М. ЛЕБЕДЕВ,
Т. Э. ИВАЩЕНКО, В. С. БАРАНОВ, 1991