

22. Популяционный и семейный анализ методом блот-гибридизации полиморфизма сайтов ДНК, сцепленных с геном муковисцидоза / О. В. Воронина, В. С. Гайцхоки, Т. Э. Иващенко и др. // Биополимеры и клетка.— 1990.— 6, № 2.— С. 65—71.
23. Молекулярная природа некоторых мутаций как причин фенилкетонурии в популяциях СССР / В. Н. Калинин, Е. И. Шварц, Б. В. Скрябин и др. // Тез. докл. II Всесоюз. съезда мед. генетиков.— Алма-Ата, 1990.— С. 17.
24. Молекулярная природа делеции при β^0 -талассемии, установленная с помощью метода амплификации геномной ДНК *in vitro* / Е. И. Шварц, А. А. Гольцов, О. К. Кобозев и др. // Биоорг. химия.— 1989.— 15, № 4.— С. 556—559.
25. Характер двух мутационных повреждений β -глобинового гена при β^0 -талассемии в Азербайджане / А. А. Гольцов, В. Л. Суриц, А. В. Лукьяненко и др. // Там же.— 1989.— 15, № 7.— С. 1001—1002.
26. DiLella A. G., Huang W.-M., Woo S. J. C. Screening for phenylketonuria mutations by DNA amplification with the polymerase chain reaction // Lancet.— 1988.— 1, N 8584.— P. 497—499.

Ин-т мед. генетики АМН СССР, Москва

Получено 05.10.89

УДК [575.1/2:599.9]:577.2

Т. И. Бужиевская, В. Ю. Черненко, Л. А. Полищук

СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ НАСЛЕДСТВЕННОГО ДЕФИЦИТА α_1 -ИНГИБИТОРА ПРОТЕАЗ

Изложены молекулярно-генетические основы наследственного дефицита α_1 -ингибитора протеаз, приведен обзор литературных данных по современным подходам к генной терапии данной патологии у человека.

Наследственный дефицит α_1 -ингибитора протеаз (α_1 ИП) в настоящее время является одним из наиболее изученных наследственных заболеваний человека в отношении этнопатогенетических его основ и ассоциации с соматической патологией [1—3].

Актуальность изучения данной патологии обусловлена высокой частотой ее распространения в популяциях, которая носит ярко выраженный клановый характер и колеблется от 1 : 40 000 в Южной Италии [4] до 1 : 1 750 в Швеции [5] (гомозиготное носительство Z-аллеля α_1 ИП). Это свидетельствует о том, что 1—3 % населения Европы является гетерозиготным носителем патологического Z-аллеля [4].

Согласно данным популяционных исследований генетического полиморфизма α_1 ИП у населения центрального региона Украины, проведенных в отделе генетики человека Ин-та молекуляр. биологии и генетики (ИМБиг) АН УССР в 1984—87 гг., частота гетерозиготного носительства патологического Z-варианта составляет 1,5 %. Последняя согласуется с данными по другим популяциям европейской части СССР [6—8]. Частота гомозиготных носителей Z-гена в группе больных с хроническими бронхо-легочными заболеваниями составила 1 : 400 (всего обследованы 811 пациентов Киевского НИИ туберкулеза, пульмонологии и грудной хирургии МЗ УССР), что в 12 раз превышает среднюю частоту в европейских популяциях [9]. Частота же гетерозиготных носителей «дефицитных» генов в группе патологии составила 7 %. Полученные результаты согласуются с литературными данными о взаимосвязи между патологическими вариантами ингибитора и заболеваниями легких у людей [3, 4]. Определение генетических вариантов α_1 ИП проводили изоэлектрическим фокусированием образцов сыворотки крови в искусственном борат-глицериновом pH-градиенте. Данный методический подход был разработан в отделе генетики человека ИМБиг АН УССР.

α_1 ИП является одним из основных регуляторов деструктивно-пролиферативных процессов в организме человека. Это поливалентный

ингибитор сериновых протеаз, необратимо связывающий эластазу нейтрофилов (в эквимольных отношениях), катепсина *G* альвеолярных макрофагов, коллагеназу, тромбин, плазмин, трипсин, химотрипсин, папаин, ренин, калликреин, бактериальные протеазы [10].

В настоящее время установлено, что система *PI* обладает довольно широким генетическим полиморфизмом, который включает более 60 вариантов α_1 ИП [11]. Несмотря на широкий полиморфизм системы, наиболее «дефицитные» состояния данного ингибитора в сыворотке крови обуславливают только некоторые аллели: *PIZ*, *PIS*, *PIF*, *PIP*, *PI null* [12]. Если антипротеазные свойства α_1 ИП при нормальном *MI*-варианте принять за 100 %, то при других вариантах имеет место та или иная степень снижения его ингибиторной активности. При гомозиготном состоянии *Z*-аллеля (фенотип *ZZ*) концентрация α_1 ИП в крови составляет 10—15 % от нормы, при *SS* — 60, *SZ* — 30, *MIZ* — 60 % [13]. У гомозиготных носителей патологических аллелей резко снижена антиэластазная активность сыворотки, что обуславливает беспрепятственное развитие воспалительных процессов в тканях — в первую очередь в легких (эмфизема), суставах (синовииты), поджелудочной железе (панкреатиты), печени (цирроз печени) [13]. Ингибиторная неспособность мутантных вариантов α_1 ИП связана с аминокислотными заменами в белковой молекуле, которые в свою очередь обусловлены определенными мононуклеотидными заменами в кодирующей части гена α_1 ИП [14, 15]. Мутации в *Z*- и *S*-аллелях связаны с мононуклеотидными заменами — гуанина на аденин в экзоне 5 и аденина на тимин в экзоне 3 соответственно [14].

Традиционные методы фенотипической коррекции и профилактики наследственной недостаточности α_1 ИП предусматривают применение естественных (контрикал, трасилол, цалол, гордокс, пантрипин) и синтетических (эпсилон-аминокапроновая кислота и амбен) ингибиторов протеаз [16]. Однако существенным недостатком их является кратковременность (несколько часов) и значительно более узкий спектр действия по сравнению с α_1 ИП [17]. Наиболее физиологичным методом терапии является применение чистого белка α_1 ИП, выделенного из плазмы донорской крови. Терапевтическая доза этого препарата составляет 4 г 1 раз в неделю в течение месяца [17]. Лечение столь высокими дозами ингибитора является слишком дорогостоящим (250 долларов за 100 мг по каталогу фирмы «Sigma» (США) за 1988 г.). В настоящее время только в США ежегодные потребности в чистом препарате составляют до 8 000 кг [18], а поскольку содержание α_1 ИП в крови здоровых людей составляет 200—400 мг% [13], то обеспечение столь высоких потребностей, рассчитывая только на переработку донорской крови, невозможно. Определенные надежды возлагаются на генную инженерную α_1 ИП. Этим путем можно преодолеть основные трудности — снизить себестоимость, увеличить количество производимого препарата, сэкономить донорскую кровь. Ряд исследователей сообщили о проведенных ими работах по клонированию человеческого гена α_1 ИП и экспрессии его в различных системах [19—21].

Основные плазмидные конструкции. Авторы работы [19] на основе плазмиды *pCQV2* с геном устойчивости к ампициллину создали рекомбинантную ДНК, содержащую полную последовательность гена α_1 ИП человека, сильный промотор λP_r , рибосомакомпетентный сайт *cro* и термочувствительный репрессор для промотора λP_r . Экспрессия гена α_1 ИП в культуре *Escherichia coli*, несущей сконструированную плазмиду, осуществлялась при повышении температуры культивирования с 30 до 42 °С на 2 ч, в среднем продуцировалось до 9 000 молекул на клетку.

Другие исследователи [20] использовали экспрессирующую α_1 ИП рекомбинантную молекулу, сконструированную на основе плазмиды *pTG920*, содержащей промотор P_L фага λ . Транскрипция клонированной последовательности происходила от фагового промотора, который контролировался термочувствительным репрессором *c1857*. В составе

вектора имелся также сайт *cII* для связывания с рибосомой. Культура *E. coli*, несущая этот вектор, в среднелогарифмической фазе роста (10^6 клеток в 1 мл) при повышении температуры культивирования с 28 до 42 °С экспрессировала ген α_1 ИП, причем продукт экспрессии составлял до 15 % тотального протеина *E. coli* [20].

С помощью плазмидного вектора *pTG922*, имеющего промоторную последовательность, λ -*II*-область для связывания с рибосомой, линкерные нуклеотиды и последовательность, кодирующую 393 из 394 аминокислот нормальной молекулы α_1 ИП, был выделен рекомбинантный белок из трансформированной культуры *E. coli* методом аффинной хроматографии [18].

Во всех трех работах получен продукт экспрессии клоноированного гена α_1 ИП человека, обладающий специфической антиэластазной активностью. Однако α_1 ИП, синтезированный в прокариотической системе *E. coli*, не гликозилирован и поэтому обладает меньшей стабильностью и более высокой термолабильностью по сравнению с α_1 ИП сыворотки крови [21]. Одним из путей преодоления этого недостатка является экспрессия гена α_1 ИП в эукариотической системе, обладающей полноценной системой сплайсинга мРНК и гликозилирования белка (дрожжи [22], фибробласты [23, 24], гепатоциты [25]). Другой путь — сайт-направленный мутагенез в самом клолируемом гене α_1 ИП, позволяющий повысить стабильность негликозилированной молекулы ингибитора с сохранением ее физиологического действия [26, 27].

Клонирование и экспрессия в дрожжевой системе одновременно двух изоформ гена α_1 ИП — с правильной нуклеотидной последовательностью и с заменой метионина на валин в позиции 358 осуществлены авторами [21]. Векторы конструировали на основе плазмиды *pPGAP* путем рекомбинации. Экспрессия обеспечивалась встроенным промотором гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Хотя продукты обоих вариантов гена α_1 ИП не были гликозилированы, валиновый вариант был более устойчив к действию оксидантов, чем метиониновый, но менее устойчив, чем естественный. Кроме того, валиновый α_1 ИП имел суженный спектр активности — ингибировал панкреатическую и нейтрофильную эластазу, но был неактивен по отношению к трипсиноподобным протеазам [21]. Описанный эксперимент по сайт-направленному мутагенезу гена α_1 ИП получил развитие в ряде других работ. Кроме валинового мутанта в позиции 358, был получен аргининовый мутант, который неактивен по отношению к панкреатической эластазе, но хорошо связывает трипсин. Метод аминокислотных замен в позиции 358 описан в [28]; модификация этого метода — в [26].

В работе [27] получена экспрессия валинового, аргининового (в позиции 358) и нормального изоформ гена α_1 ИП, а также гена анти-тромбина в системе *E. coli* при помощи созданного плазмидного вектора.

Гарвер и др. осуществили экспрессию гена α_1 ИП в фибробластах мыши при помощи ретровирусного вектора *pN2-FAT* [23]. Вектор содержал ранний промотор вируса *SV40* и полную последовательность гена α_1 ИП человека в *XhoI*-сайте N2 (фрагмент вируса мышиной лейкемии Молони, содержащий ген резистентности к неомицину). Вектор *pN2-FAT* интегрировали в геном клеток линии $\Psi 2$ кальций-фосфатным методом, затем культуру выращивали на селективной среде с неомицином (G418). Полученная культура выделяла в среду ретровирусные частицы *pN2-FAT*, которые использовали для трансфекции фибробластов мыши *NIH3T3* в селективной среде. Интеграция гена α_1 ИП в геном клеток, а также его транскрипция были подтверждены блот-гибридизацией ДНК и РНК по Саузерну, белок идентифицирован методом иммунопреципитации и электрофореза. Гликозилирование молекулы α_1 ИП определено по включению 3 H-маннозы. Белок проявлял анти-эластазную активность и при внутривенном введении мышам обнаруживал обычные свойства α_1 ИП. В данной работе авторы, решая зада-

чу биотехнологии α_1 ИП (или непрямой генной терапии), одновременно создали рациональный методический подход к разработке методов прямой генной терапии. В следующей работе эти же авторы [24] исследовали секрецию трансфицированными фибробластами *NIH3T3-FAT* человеческого α_1 ИП *in vivo* при введении в брюшную полость бестимусных мышей (*Nude mice*). Идентификацию экспрессии гена и его продукта проводили теми же методами, что и в предыдущей работе [23]. Человеческий α_1 ИП выявлялся в сыворотке и эпителиальной ткани легких, при этом фибробласты *NIH3T3-FAT* сохраняли свою активность в течение трех месяцев [24]. В данном случае α_1 ИП экспрессировался теми клетками, которые в норме его не экспрессируют.

Перспективные направления генной терапии наследственного дефицита α_1 ИП. В последнее время разрабатываются методические подходы к генной терапии на уровне гепатоцитов человека [29]. В 1986 году Чаудари и Диметрис с коллегами из медицинского колледжа Альберта Эйнштейна разработали технику введения генов в клетки печени [29]. Две группы — одна из Калифорнийского ун-та (Сан-Диего), другая — из Медицинского колледжа Бейлор (Техас) — доказали возможность использования ретровирусных векторов для введения генов в гепатоциты с целью проведения прямой генной терапии [30].

По мнению некоторых авторов, синтез α_1 ИП моноцитами, хотя и происходит в гораздо меньшем количестве, чем клетками печени, но, тем не менее, он также имеет определенное значение для поддержания нормального уровня ингибитора в легких [31]. Известно, что синтез α_1 ИП в гепатоцитах и моноцитах осуществляется под контролем разных промоторов [32]. Данный факт предлагается использовать для прямой генной терапии наследственного дефицита α_1 ИП путем введения в клетки-мишени рекомбинантного ретровируса, содержащего кДНК α_1 ИП под регуляцией макрофагоспецифического промотора гена α_1 ИП [33].

Использование ретровирусных векторов для генотерапии имеет ряд существенных недостатков. Прежде всего, интеграция их с ДНК клетки вызывает снижение стабильности генома и его загрязнение чужеродными ДНК-фрагментами, обладающими трансформирующей и мутагенной активностью [34—36]. Кроме того, генная терапия в случае гомозиготного носительства Z-аллеля α_1 ИП требует прекращения его экспрессии, поскольку синтезированный мутантный Z-белок не секретируется из гепатоцитов, а накапливается в виде нерастворимых комплексов, вызывающих холестаз с последующим развитием цирроза печени [4].

Одним из перспективных направлений, лишенных вышеперечисленных недостатков, является сайт-направленный мутагенез непосредственно в мутировавшем участке гена-мишени [27, 28]. Как уже упоминалось, данный подход к мононуклеотидным заменам в кодирующей части гена α_1 ИП успешно разработан в системах экспрессии *Saccharomyces cerevisiae* [21, 26, 28] и *E. coli* [27], получены продукты экспрессии генноинженерных мутантных генов α_1 ИП [28]. Однако реализация этого подхода в системе *in vivo* требует разработки принципиально новых методов манипуляций с геномом человека.

В настоящее время эффективным способом профилактики наследственного дефицита α_1 ИП является пренатальная диагностика с применением олигонуклеотидных зондов [37, 38]. Объект исследования в данном случае — ДНК клеток амниотической жидкости плода либо ворсин хориона. Для гибридизационного анализа используется олигонуклеотид, меченный радиоактивной или флюоресцентной меткой, соответствующий исследуемой области гена-мишени [39]. Доклиническое выявление дефицита α_1 ИП сделает возможной профилактическую коррекцию этого состояния у каждого конкретного больного с помощью генноинженерного белка, управления экспрессией гена либо сайт-направленного мутагенеза в компетентных соматических клетках, что, в свою очередь, позволит предотвратить развитие болезни, не изменяя

генофонда популяции. Последнее обстоятельство чрезвычайно важно в связи с непредсказуемым антропогенным изменением биосферы и отсутствием знаний о возможных селективных преимуществах мутантных генов в условиях векторизованной эволюции.

THE PRESENT AND FUTURE OF THE GENE THERAPY OF HEREDITARY α_1 -PROTEASE INHIBITOR DEFICIENCY

T. I. Buzhievskaya, V. Yu. Chernenko, L. A. Polishchuk

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

Molecular-genetic principles of hereditary α_1 -protease inhibitor deficiency are reported as well as data concerning the current gene therapy views on this human pathological unit are reviewed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alpha₁-antitrypsin gene polymorphism related to respiratory system disease / M. Bucaczynska, D. Schött, A. J. Hanzlik et al. // *Klin. Wochenschr.*—1987.—65, N 12.— P. 538—541.
2. Hodgson I., Katsheker N. DNA polymorphisms of the human α_1 antitrypsin gene in normal subjects and in patients with pulmonary emphysema // *J. Med. Genet.*—1987.—24, N 1.— P. 47—51.
3. The role of α_1 -antitrypsin deficiency in the pathogenesis of immune disorders / S. N. Breit, D. Walefield, I. P. Robinson et al. // *Clin. Immunol. Immunopath.*—1985.—35, N 3.— P. 363—380.
4. Massi G., Bruscalupi G., Auconi P. Serum protease inhibitory capacity. Recent knowledge on α_1 -antitrypsin deficiency // *Ric. Clin. Lab.*—1982.—12, N 3.— P. 449—458.
5. Cox D. W., Hoepfner V. H., Levinson H. Protease inhibitors in patients with chronic obstructive pulmonary disease: the alpha-1-antitrypsin heterozygote controversy // *Amer. Rev. Respirat. Disease.*—1976.—113, N 5.— P. 601—606.
6. α_1 -Ингибитор протеаз: характеристика биохимических и биологических свойств и определение уровня при различных заболеваниях / Т. С. Котова, В. Ю. Басис, О. И. Атовмян и др. // *Терапевт. архив.*—1986.—58, № 4.— С. 77—80.
7. Парик Ю. Я. Распределение субтипов трансферрина и α_1 -антитрипсина у эстонцев // I Всесоюз. съезд мед. генетиков: Тез. докл.—М., 1983.—С. 384—385.
8. Шурхал А. В., Подогас А. В., Алтухов Ю. П. Генетический полиморфизм и редкие варианты α_1 -антитрипсина в населении Москвы. Исследование с помощью изоэлектрофокусирования в сверхтонком геле // *Генетика.*—1984.—20, № 12.— С. 2066—2069.
9. Бочков Н. П., Захаров А. Ф., Иванов В. И. Медицинская генетика.—М.: Медицина, 1984.—368 с.
10. Travis J., Salvesen G. S. Human plasma proteinase inhibitor // *Ann. Rev. Biochem.*—1983.—52.— P. 655—709.
11. Alpha-1-antitrypsin: evidence for a fifth *PiM* subtyp and a new deficiency allele *PiZ*_{Augsburg} / S. Weidinger, W. Jahn, F. Gujnik, F. Schwarzfischer // *Hum. Genet.*—1985.—71, N 1.— P. 27—29.
12. Cox D. W., Johnson A. M., Fagerhol M. U. Report of nomenclature meeting for α_1 -antitrypsin // *Ibid.*—1980.—53, N 3.— P. 429—433.
13. Уорд А. М. α_1 -Антитрипсин // *Иммунохимия в клинической лабораторной практике* / Под ред. А. М. Уорда и Дж. Уилчера.—М.: Медицина, 1981.—С. 186—196.
14. Complete sequence of the DNA for human α_1 -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.
15. Identification of a second mutation in the protein-coding sequence of the Z type alpha-1-antitrypsin gene / T. Nukiwa, K. Satoh, M. L. Brantly et al. // *J. Biol. Chem.*—1986.—261, N 34.— P. 15989—15994.
16. Сыновец А. С., Левицкий А. П. Ингибиторы протеолитических ферментов в медицине.—Киев: Здоровье, 1985.—72 с.
17. Replacement therapy of alpha-1-antitrypsin deficiency / J. E. Gadek, H. G. Klein, P. V. Holland et al. // *J. Clin. Invest.*—1981.—68, N 5.— P. 1158—1165.
18. Evaluation of recombinant DNA-directed *E. coli* produced α_1 -antitrypsin as an anti-neutrophil elastase for potential use as replacement therapy of α_1 -antitrypsin deficiency / Sh. D. Straus, G. A. Fells, D. Wewers et al. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1985.—130, N 130.— P. 1177—1184.
19. Expression of human α_1 -antitrypsin in *Escherichia coli* // A. Bollen, R. Lorian, A. Herzog, P. Herion // *FEBS Lett.*—1984.—166, N 1.— P. 67—70.

20. High-level production of biologically active human α_1 -antitrypsin in *Escherichia coli* / M. Courtney, A. Buchwalder, L. H. Tessier et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1984.— 81, N 3.— P. 669—673.
21. Isolation and properties of recombinant DNA produced variants of human α_1 -proteinase inhibitor / J. Travis, M. Owen, P. George et al. // J. Biol. Chem.— 1985.— 260, N 7.— P. 4384—4389.
22. Шелкунов С. Н. Клонирование генов.— Новосибирск: Наука, 1986.— 228 с.
23. Production of glycosylated physiologically «normal» human α_1 -antitrypsin by mouse fibroblasts modified by insertion of a human α_1 -antitrypsin cDNA using a retroviral vector / R. I. Garver, A. Chitul, S. Karlsson et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1987.— 84, N 4.— P. 1050—1054.
24. Clonal gene therapy: transplanted mouse fibroblast clones express human α_1 -antitrypsin gene *in vivo* / R. I. Garver, A. Chitul, M. Courtney, R. G. Crystal // Science.— 1987.— 237, N 4816.— P. 762—764.
25. Genaro C., Luciana D., Riccardo C. Cell-specific expression of a transfected human α_1 -antitrypsin gene // Cell.— 1985.— 41, N 2.— P. 531—540.
26. Synthesis in yeast of functional oxidation-resistant mutant of human α_1 -antitrypsin / S. Rosenberg, P. J. Barr, R. C. Najarian, R. A. Hallowell // Nature.— 1984.— 312, N 5989.— P. 77—80.
27. Synthesis in *E. coli* of α_1 -antitrypsin variants of therapeutic potential for emphysema and thrombosis / M. Courtney, S. Jallat, L. H. Tessier et al. // Ibid.— 313.— P. 149—151.
28. Pat. 4711848 USA, IC³ C12 P19/34; C12 N1/100. Site specific mutagenesis in alpha-1-antitrypsin / M. Y. Insley, G. Kawasaki.— Publ. 08.12.87.
29. Roberts L. New targets for human gene therapy // Science.— 1988.— 241, N 4868.— P. 906.
30. Ledley F. D., Woo S. L. C. Molecular basis of α_1 -antitrypsin deficiency and its potential therapy by gene transfer // J. Inher. Metab. Dis.— 1986.— 9, suppl. 1.— P. 85—91.
31. Expression of the alpha-1-antitrypsin gene in mononuclear phagocytes of normal and alpha-1-antitrypsin-deficient individuals / J.-F. Mornex, A. Chytil-Weir, Y. Martinet et al. // J. Clin. Invest.— 1986.— 77, N 6.— P. 1952—1961.
32. The human α_1 -antitrypsin gene is transcribed from two different promoters in macrophages and hepatocytes // EMBO J.— 1987.— 6, N 9.— P. 2767—2771.
33. Клонирование гена α_1 -антитрипсина человека и возможные аспекты его применения / Н. С. Незнанов, И. В. Макарова, И. А. Крамерова, К. Г. Газарян // Биополимеры и клетка.— 1989.— 5, № 2.— С. 43—47.
34. Буржневская Т. Н. Вирус-индуцированный мутагенез в клетках млекопитающих.— Киев: Наук. думка, 1984.— 136 с.
35. Müller H. Human gene therapy: possibilities and limitations // Experientia.— 1987.— 43, N 4.— P. 375—378.
36. Utmanen I., Kallio A. Gene therapy of somatic cells, the principle and techniques // Ann. Clin. Res.— 1986.— 18, N 5—6.— P. 316—321.
37. Cox D. W., Mausfield T. Prenatal diagnosis of α_1 -antitrypsin deficiency and estimates of fetal risk for disease // J. Med. Genet.— 1987.— 24, N 1.— P. 52—59.
38. Prenatal diagnosis of alpha-1-antitrypsin deficiency by direct analysis of the mutation site in the gene / Y. J. Kidd, M. S. Globus, R. B. Wallace et al. // New Engl. J. Med.— 1984.— 310, N 10.— P. 639—642.
39. Diagnosis of α_1 -antitrypsin deficiency by enzymatic amplification of human genomic DNA and direct sequencing of polymerase chain reaction products / C. N. Newton, N. Kalsheker, A. Graham et al. // Nucl. Acids Res.— 1988.— 16, N 17.— P. 8233—8243.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
АН УССР, Киев

Получено 23.06.89

УДК 577.2.08:577.214.622

**А. П. Перевозчиков, Б. Л. Вайсман, Д. И. Дозорцев, А. В. Сорокин,
С. В. Орлов, А. Д. Денценко, А. П. Дыбан, А. Н. Климов**

**СОЗДАНИЕ МОДЕЛИ — ТРАНСГЕННЫХ КРОЛИКОВ, —
СОДЕРЖАЩИХ В ГЕНОМЕ АНТИСМЫСЛОВЫЕ КОНСТРУКЦИИ
ГЕНА АПОЛИПОПРОТЕИНА А1 ЧЕЛОВЕКА
ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ
АТЕРОГЕННЫХ НАРУШЕНИЙ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА**

Сконструированные рекомбинантные ДНК, содержащие способный к экспрессии анти-смысловой ген apoA1 человека, были инъецированы в зиготы кроликов для получения трансгенных животных. Методами дот-блот-гибридизации ДНК и биохимического ана-