

6. Subbanaidu R. Unintegrated viral sequences in rat cells transformed by simian virus 40 and a temperature sensitive A gene mutant // Cell Biol. Int. Repts.—1983.—7, N 9.—P. 735—743.
7. Sharon E., Wang J. Transcription of the human β -globin gene is stimulated by an SV40 enhancer to which it is physically linked but topologically uncoupled // Cell.—1986.—45, N 4.—P. 575—580.
8. Robbins P. D., Rio D. C., Botchan M. R. Transactivation of the simian virus 40 enhancer // Mol. and Cell. Biol.—1986.—6, N 4.—P. 1283—1295.
9. Activation of gene expression is adversely affected at high multiplicities of linked simian virus 40 enhancer / R. Kumar, T. A. Firak, C. T. Schroll, K. N. Subramanian // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83, N 10.—P. 3199—3203.
10. Lusk M., Botchan M. Inhibition of SV40 replication of simian cells by specific pBR322 DNA sequences // Nature.—1981.—293, N 3.—P. 79—81.
11. Transfer of genes into hematopoietic cells using recombinant DNA viruses / S. Karlsson, R. K. Humphries, J. Gluzman, A. W. Wienhuis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1985.—82, N 1.—P. 158—162.
12. Efficient introduction of plasmid DNA into human hematopoietic cells by encapsidation in simian virus 40 pseudovirions / A. Oppenheim, E. Peleg, E. Fibach, E. Rachmilewitz // Ibid.—1986.—83, N 18.—P. 6925—6929.
13. Введение бактериального гена дигидрофолатредуктазы в колониеобразующие клетки костного мозга мыши / А. В. Титомиров, А. Е. Переверзев, Л. И. Степаньян и др. // Цитология.—1985.—27, № 10.—С. 1183—1189.
14. Трансформация клеток костного мозга грызунов рекомбинантной плазмидой pBRSV / Т. Б. Казакова, В. А. Шатов, И. А. Вербина и др. // Там же.—1986.—28, № 12.—С. 1345—1350.
15. Bing L., David W. A., Orkin S. Retrovirus-mediated gene transfer of human adenosine deaminase: expression of functional enzyme in murine hematopoietic stem cells *in vivo* // Mol. and Cell. Biol.—1987.—7, N 10.—P. 3459—3465.
16. Gene transfer and expression in nonhuman primates using retroviral vectors / W. F. Anderson, P. Kantoff, M. Eglitis et al. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.—1986.—41, pt 2.—P. 1073—1081.
17. Getnig M. Y., Sambrook J. Cell-surface expression of influenza haem-agglutinin from a cloned DNA copy of the RNA gene // Nature.—1981.—293, N 5834.—P. 620—625.
18. Active influenza virus neuraminidase is expressed in monkey cells from cDNA cloned in simian virus 40 vectors / D. Alan, R. Bos, J. Timothy, D. Nayak // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1983.—80, N 13.—P. 3976—3980.
19. Sequences involved in the regulated expression of the human interferon- β_1 gene in recombinant SV40 DNA vectors replicating in monkey cells / J. Marteaux, C. Kahana, J. Mory et al. // EMBO J.—1983.—2, N 3.—P. 325—332.
20. Expression of two human growth hormone genes in monkey cells infected by simian virus 40 recombinants / G. N. Pavlakis, N. Hizuka, P. Gorden et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1981.—78, N 12.—P. 7398—7402.
21. Crowley C. W., Liu C.-C., Levinson A. D. Plasmid directed synthesis of hepatitis B surface antigen in monkey cells // Mol. and Cell. Biol.—1983.—3, N 1.—P. 44—55.
22. Laub O., Rutter W. J. Expression of the human insulin gene and cDNA in a heterologous mammalian system // J. Biol. Chem.—1983.—258, N 10.—P. 6043—6050.
23. Zeitlmeissl G., Ragg M., Karges H. E. Expression of biologically active human antithrombin III in chinese hamster ovary cells // Biotechnology.—1987.—5, N 7.—P. 13—22.

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

Получено 16.09.88

УДК 612.349.7.018

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА α_1 -АНТИТРИПСИНА ЧЕЛОВЕКА И ВОЗМОЖНЫЕ АСПЕКТЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

Н. С. Незнанов, И. В. Макарова, И. А. Крамерова, К. Г. Газарян

Введение. α_1 -антитрипсин (α_1 АТ) — один из основных белков сыворотки крови. Этот белок входит в состав семейства белков — ингибиторов протеаз — и подавляет активность эластазы. Анализ сывороток крови различных людей позволил выявить значительную гетерогенность α_1 АТ [1]. Наиболее распространенные его формы получили обозначения М (дикий тип), S и Z [2]. Люди, гомозиготные по S-форме, содержат в плазме крови около 60 % [2], а по Z-форме — лишь 10—15 % от уровня этого белка у гомозиготных по M-форме [3]. В настоящее время из-

вестно, что S-форма α_1 AT содержит в 264-м положении Val вместо Glu аналогично M-форме, тогда как Z-форма содержит в 342-м положении Lys вместо Glu [2]. Указанные замены вызваны точечными мутациями в соответствующих участках гена α_1 AT.

Наибольшую опасность для здоровья представляет собой мутация, приводящая к образованию Z-формы белка. Эта мутация достаточно распространена. Так, среди европейского населения приблизительно 5 % содержат Z-ген, а 0,2 % — гомозиготны по этому гену [3]. У людей, гомозиготных по данной мутации, повышена опасность двух видов заболеваний: цирроза печени, развивающегося преимущественно у детей [3], и эмфиземы легких, встречающейся чаще у взрослых [3].

Наиболее надежным способом профилактики этих заболеваний является пренатальный анализ гена α_1 AT. Для выявления мутации, приводящей к образованию Z-формы белка, можно провести гибридизационный анализ, причем в качестве зонда достаточно использовать олигонуклеотид, соответствующий исследуемой области гена [3]. Однако возможны подходы к лечению указанных заболеваний, основанные на методах генной инженерии и терапии. В настоящей работе описано клонирование гена α_1 AT человека, кДНК и обсуждаются возможности их использования в таких подходах.

Материалы и методы. В работе использованы рестрикционные эндонуклеазы и ДНК-лигаза фага T4 производства НПО «Фермент», ВНИИ прикл. эцимологии (Вильнюс).

Геномная библиотека человека на фаге Харон 4А любезно предоставлена Т. Маннатисом (США). Библиотека молекул кДНК, синтезированных на поли(A)⁺мРНК из эмбриональной печени человека, получена от фирмы «Clontech Laboratories» (США). Фрагмент кДНК α_1 AT человека, использованный для скрининга геномной библиотеки, любезно предоставлен Н. Хасты (Англия). Олигонуклеотид, соответствующий Z-форме α_1 AT, предоставлен А. А. Ковальской (Ин-т генетики человека АН ПНР, Познань).

Скрининг библиотеки проводили по методике, описанной Ву [4]; определение нуклеотидной последовательности ДНК — по методу Сенгера [5].

Результаты и обсуждение. Для клонирования гена α_1 AT человека использовали геномную библиотеку на фаге Харон 4А, полученную неполным переваром геномной ДНК человека *AluI* и *HaeIII*-рестриктазами [6]. Для скрининга использовали 3'-конец кДНК α_1 AT человека. Скрининг $8 \cdot 10^5$ клонов позволил выявить из них около 10, содержащих ген α_1 AT. Рестрикционный анализ ДНК этих клонов показал, что все они идентичны друг другу и содержат полную копию гена α_1 AT с прилегающими к нему последовательностями ДНК. На рис. 1 представлена рестрикционная карта ДНК одного из изолированных клонов и экзон-интронная структура гена α_1 AT человека, как она приведена в работе [7].

Так как для получения дрожжевого продуцента α_1 AT, а также для решения задач, связанных с генотерапией, более удобно использовать кДНК копию мРНК для этого белка, а не его большой и сложно устроенный ген, нами была предпринята попытка клонирования полнокопийной молекулы кДНК α_1 AT из библиотеки молекул кДНК эмбриональной печени человека, сконструированной на векторе λ gt11. Для скрининга этой библиотеки использовали *BamHI/Xba*-фрагмент геномной ДНК, содержащий большую часть первого кодирующего экзона гена α_1 AT. Наибольшая из изолированных нами молекул кДНК α_1 AT имела размер 1,2 т. п. н. Известно, что размер полной молекулы кДНК α_1 AT из печени человека 1390 п. н. [8]. Для детального картирования 5'-конца клоноированной молекулы кДНК (клон 5) мы переклонировали ее в векторе *m13mp8* и определили нуклеотидную последовательность ее 5'-конца по методу Сенгера [5]. Сравнение этой нуклеотидной последовательности (рис. 2, а) с ранее опубликованной [8] показало, что изолированная нами молекула кДНК не содержит 345 п. н. с 5'-конца кодирующей области полнокопийной молекулы кДНК. Однако, так как

вся недостающая кодирующая часть молекулы кДНК соответствует одному экзону гена, то она может быть легко присоединена к имеющейся у нас молекуле кДНК по уникальному сайту для рестриктазы *Cfr10-1*. Эта работа в настоящее время проводится. Обнаружено также, что кДНК из клона 5 вместо кодона СТА в положении 103 содержит кодон СТС, однако эта замена не существенна, поскольку оба триплета кодируют Leu.

Чтобы убедиться в том, что клонированные нами кДНК и ген α_1 АТ не кодируют Z-формы этого белка, была проведена гибридизация этих

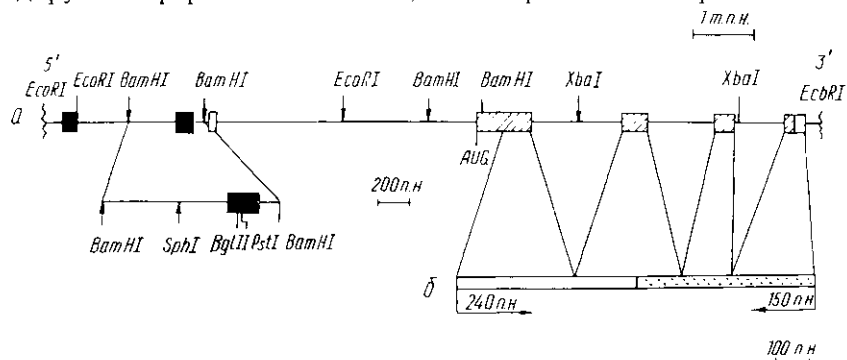


Рис. 1. Рестрикционная карта и структура гена α_1 АТ человека (а) и схема клонированной молекулы кДНК (б): а — заштрихованы кодирующие области; темные прямоугольники — экзоны, экспрессирующиеся только в макрофагах; на 5'-конце первого кодирующего экзона отмечен иницирующий кодон AUG; б — стрелками внизу обозначены участки кДНК, для которых определена нуклеотидная последовательность; расстояние от иницирующего кодона AUG до 5'-конца молекулы — 345 п. н.; область кДНК, гомологичная использованному при скрининге библиотеки генов зонду, показана точками

Fig. 1. The restriction map and structure of the human antitrypsin gene (a) and scheme of the cloned cDNA molecule (b): a — the boxes indicate the exons: coding exons — hatched boxes, exons expressed in liver — solid boxes. Initiating AUG codon is marked on 5' end of the first coding exon; b — the distance from its 5' end to initiating AUG codon is 345 b. p. Arrows show cDNA sites whose nucleotide sequence is determined. cDNA region, homologous to probe in screening of gene library is marked with points

молекул ДНК с 19-членным олигонуклеотидным зондом, соответствующим Z-форме α_1 АТ. Анализ результатов гибридизации показал, что изолированные кДНК и ген α_1 АТ не кодируют его Z-формы. Однако мы не можем точно указать, какие из других возможных форм этого белка они кодируют. Не исключено, что ген кодирует S-форму, так как из использованной нами библиотеки генов ранее изолирован ген α_1 АТ, кодирующий именно эту форму белка [2].

α_1 АТ относится к категории генов, экспрессия которых носит сильно выраженный тканеспецифический характер. Этот ген экспрессируется преимущественно в печени как в эмбриональном, так и в зрелом состоянии. Ранее было показано [8], что дис-действующие факторы, определяющие тканеспецифический характер экспрессии гена, расположены на его 5'-конце в непосредственной близости от точки инициации транскрипции. Так как в дальнейшем планируется изучение механизма регуляции экспрессии этого гена, мы определили нуклеотидную последовательность участка, примыкающего к его 5'-концу. Известно, что *BglII/BamHI*-фрагмент (300 п. н.), расположенный перед первым транскрибирующимся в печени экзонам, содержит регуляторные последовательности, ответственные за экспрессию гена α_1 АТ в печени [8]. На рис. 2, б, приведена фотография участка автографа геля, полученного при определении указанной нуклеотидной последовательности, которая полностью идентична описанной ранее этой части гена [2].

Кроме печени, ген α_1 АТ также экспрессируется в макрофагах, где уровень его экспрессии на порядок ниже, чем в гепатоцитах. Тем не менее ряд авторов считает, что важную роль в поддержании уровня α_1 АТ в легких играет его синтез в макрофагах [9]. Недавно было показано,

что экспрессия этого гена в макрофагах и печени происходит под контролем различных промоторов [7]. Выделенный нами клон содержит обе промоторные последовательности. Экспрессия гена α_1 АТ в макрофагах открывает реальный путь для применения методов генотерапии при обнаружении мутаций в данном гене, в частности в случае Z-формы α_1 АТ. Это определяется тем, что костный мозг, где находятся клетки — предшественники моноцитов, доступен для воздействия рекомбинантных

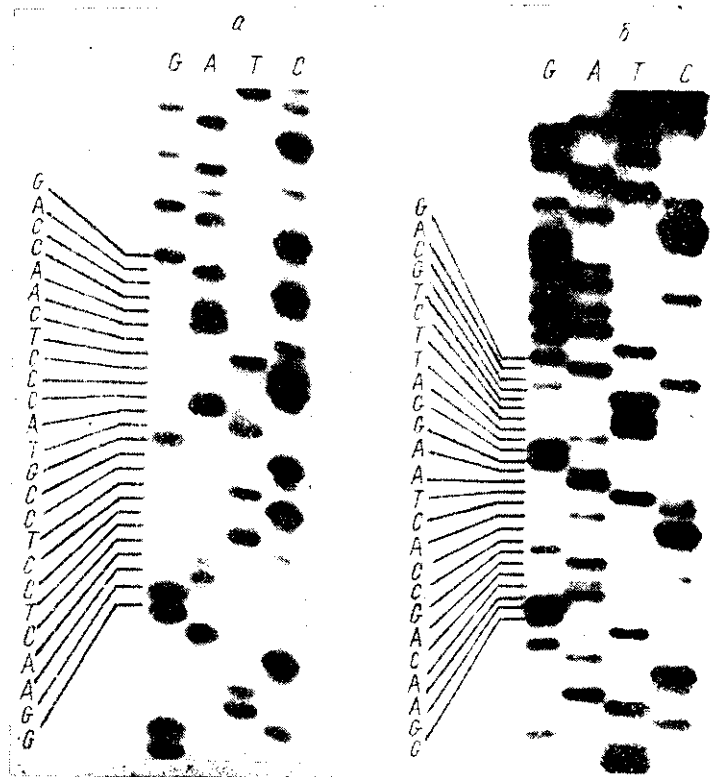


Рис. 2. Фотография автордиограммы структурного геля: анализ нуклеотидных последовательностей 5'-конца кДНК α_1 АТ из клона 5 (а) и *Bam*HI/*Bgl*II-фрагмента ДНК (300 п. н.), прилегающего к 5'-концу той части гена α_1 АТ человека, которая экспрессируется в печени (б)

Fig. 2. The autoradiogram of sequencing gel: analysis of DNA sequence of the 5' end of α_1 antitrypsin cDNA from clone N5 (a) and DNA sequence of the 300 b. p. *Bam*HI/*Bgl*II DNA fragment, flanking the 5' end of the region of α_1 antitrypsin gene, expressing in the liver (b)

ретровирусов, которые могут служить векторами для переноса гена, кодирующего функционально активную форму α_1 АТ. Мы предполагаем сконструировать такой рекомбинантный ретровирус, который бы содержал кДНК α_1 АТ под регуляцией макрофагоспецифичного промотора этого же гена. На наш взгляд, в настоящее время это одна из немногих реальных возможностей использования метода генотерапии для лечения широко распространенного заболевания, связанного с конкретной мутацией в гене.

Так как специфичность ингибиторов протеаз легко менять, внося *in vitro* замены в область гена, кодирующую активный центр молекулы [10], то указанный подход может быть распространен и на случаи мутаций в генах других ингибиторов протеаз, таких как антитромбин, антихимотрипсин и т. д. Кроме того, как уже указывалось, можно получать более стабильные формы ингибиторов протеаз [11], что в случаях более низкого уровня экспрессии экзогенных генов, чем эндогенных, может оказаться существенным.

Авторы чрезвычайно благодарны А. А. Ковальской за предоставленный ею олигонуклеотидный зонд.

CLONING OF HUMAN α_1 -ANTITRYPSIN GENE AND POSSIBLE ASPECTS OF ITS UTILIZATION

N. S. Neznanov, I. V. Makarova, I. A. Kramerova, K. G. Gazaryan

Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow
Institute of Medical Biotechnology, Ministry of Public Health, Moscow

Summary

The human α_1 -antitrypsin gene has been cloned. A cDNA molecule, containing almost the whole coding sequence is isolated. Nucleotide sequence is determined for the regulatory region of α_1 AT gene, responsible for its expression in the liver. The possibility to use cloned genes for the gene therapy of some diseases is discussed.

1. *Fagerhol M. K., Cox D. W.* The Pi polymorphism: genetic, biochemical and clinical aspects of human α_1 antitrypsin // *Adv. Hum. Genet.*—1981.—**11**, N 1.—P. 1—62.
2. *Complete* sequence of the cDNA 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.
3. α_1 antitrypsin deficiency detection by direct analysis of the mutation in the gene / *V. J. Kidd, R. B. Wallace, K. Itakura, S. L. C. Woo* // *Nature.*—1983.—**304**, N 5923.—P. 230—234.
4. *Woo S. L. C.* A sensitive and rapid method for recombinant phage screening // *Meth. Enzymol.*—1979.—**68**.—P. 389—405.
5. *Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R.* DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1977.—**74**, N 12.—P. 5463—5467.
6. *The isolation and characterization of a linked δ - and β -globin gene from a cloned library of human DNA / R. W. Lawn, E. F. Fritsch, R. C. Parker et al.* // *Cell.*—1978.—**15**, N 4.—P. 1157—1174.
7. *Perlino E., Cortese R., Ciliberto G.* The human α_1 antitrypsin gene is transcribed from the two different promoters in macrophages and hepatocytes // *The EMBO J.*—1987.—**6**, N 9.—P. 2767—2771.
8. *Ciliberto G., Dente L., Cortese R.* Cell-specific expression of a transfected human α_1 antitrypsin gene // *Cell.*—1985.—**41**, N 2.—P. 531—540.
9. *Expression of the α_1 -proteinase inhibitor gene in human monocytes and macrophages / D. H. Perlmutter, F. Cole, P. Kilbridge et al.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1985.—**82**, N 3.—P. 795—799.
10. *Carrell R.* Therapy by instant evolution // *Nature.*—1984.—**312**, N 5989.—P. 14.
11. *Synthesis in yeast of a functional oxidation-resistant mutant of human α_1 antitrypsin / S. Rosenberg, P. J. Barr, R. C. Najarian et al.* // *Ibid.*—N 5989.—P. 77—80.

Ин-т молекуляр. генетики АН СССР, Москва
Ин-т биомед. технологии МЗ СССР, Москва

Получено 10.12.87

УДК 612.349.7.018

ВОЗМОЖНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ КЛОНИРОВАННОГО ГЕНА ЭРИТРОПОЭТИНА ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ ЛИНИИ СНО

**И. А. Крамерова, М. Г. Зеленин,
М. М. Воронцова, С. Л. Колобков, Т. Е. Мопакова**

Введение. В настоящее время идентифицировано множество белковых факторов, принимающих участие в контроле пролиферации и дифференцировки кроветворных клеток — интерлейкины (IL-1, 2, 3 и др.), факторы, стимулирующие колониеобразование гранулоцитов (G-CSF), гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF), эритроидных клеток (EPA) и др. Факторы, стимулирующие образование колоний (IL-3, G-CSF, GM-CSF, EPA и др.), как правило, не специфичны по отношению к ранним предшественникам различных ростков кроветворения. В част-