



УДК 616-056.7:616.153.922:577.118.5

НОВАЯ МУТАЦИЯ 347delGCC В ГЕНЕ РЕЦЕПТОРА ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ ЧЕЛОВЕКА

© 1998 г. М. Ю. Мандельштам[#], В. И. Голубков,
Ю. А. Шур, Б. М. Липовецкий*, В. С. Гайцхоки

Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН,
197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12;

* Институт мозга РАН, Санкт-Петербург

Поступило в редакцию 20.05.98 г. Принято к печати 01.06.98 г.

Описана новая мутация 347delGCC в гене рецептора липопротеинов низкой плотности у пациента с клиническим диагнозом семейной гиперхолестеринемии.

Ключевые слова: мутация; рецептор липопротеинов низкой плотности; семейная гиперхолестеринемия.

Семейная гиперхолестеринемия (СГ) – моногенное заболевание человека с аутосомно-доминантным типом наследования, встречающееся с частотой 1 : 500. СГ вызвана снижением скорости катаболизма липопротеинов низкой плотности (ЛНП) вследствие дисфункции или количественной недостаточности рецептора ЛНП (РЛНП) [1]. К настоящему времени в мире описано более 300 мутаций в гене РЛНП [2], однако лишь 7 (делеция 5 т.п.о. экзонов 3–5 гена РЛНП, deltaG197, I420N, W556X, I771F, C139G, C127W) было найдено к настоящему времени у российских пациентов [3–5]. Пациенты с названными мутациями составляют лишь небольшую долю среди российских пациентов с СГ, поэтому поиск новых мутаций в гене РЛНП в России представляется актуальным.

С целью идентификации новых мутаций в гене РЛНП мы создали коллекцию образцов ДНК от 100 пациентов с клинической картиной СГ, не состоящих в родстве. Для отбора пациентов использовали ранее описанные критерии [3]. С помощью специфических олигонуклеотидных праймеров [4] амплифицировали 5'-концевую и 3'-концевую части экзона 4 гена РЛНП методом ПЦР, а далее амплифицированные фрагменты ДНК подвергли электрофорезу в денатурирующем ПААГ и комбинированному SSCA-гетеродуплексному анализу [6]. Выбор экзона 4 гена РЛНП для первоначального поиска мутаций был определен тем, что именно он является наиболее подверженной мутации областью при СГ [4]. В результате элек-

трофореза в денатурирующем ПААГ продуктов амплификации 5'-концевой части экзона 4 гена РЛНП одного из больных был обнаружен фрагмент с необычной электрофоретической подвижностью. Как показал электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях [7], дополнительная полоса образована фрагментами ДНК с молекулярной массой, равной или близкой молекулярной массе фрагментов, получаемых в ПЦР у других пациентов. Таким образом, дополнительная полоса в денатурирующем ПААГ образована гетеродуплексными фрагментами ДНК.

С помощью рестриктного анализа мы локализовали мутацию в пределах 70 п.о. между интрон-экзонной границей на 5'-конце экзона 4 (сайтом для рестриктазы *Pst*I) и близлежащим сайтом для рестриктазы *Mae*III внутри экзона 4. Картирование мутации базировалось на сохранении гетеродуплексов после проведения ферментативного гидролиза ДНК рестриктазами вне зоны мутации; сохранявшиеся гетеродуплексные фрагменты имели меньшую электрофоретическую подвижность, чем аналогичные гомодуплексные фрагменты. Прямое секвенирование ПЦР-продукта 5'-концевой части экзона 4 гена РЛНП позволило определить характер мутации как трехнуклеотидную делецию. Однако точная идентификация deletированных нуклеотидов при секвенировании мутации в гетерозиготном состоянии оказалась затруднительной. В этой связи с помощью праймеров

(5')TATCAAGCTT ATCCATCCCTGCAGC 4a11

(5')GTATAAGCTT ACTGCCGAGAGATGC 4a12

Сокращения: ЛНП – липопротеины низкой плотности, РЛНП – рецептор ЛНП, СГ – семейная гиперхолестеринемия, SSCA – анализ конформационного полиморфизма одонитевых фрагментов ДНК.

[#] Автор для переписки (тел.: (812) 234-33-56, факс: (812) 234-94-89, e-mail: michail@molgen.iem.ras.spb.ru).

(Сибэнзим, Новосибирск) мы амплифицировали область, содержащую эту мутацию. В оба праймера по 5'-концам были искусственно введены при синтезе сайты для рестриктазы *Hind*III (подчеркнуты). Полученный ПЦР-продукт имел расчетную длину 97 п.о.

С помощью стандартных процедур амплифицированный фрагмент был клонирован в плазмидном векторе pUC9. Бактериальные клоны, содержащие рекомбинантные молекулы, этибирали, используя процедуру α -комплементации [7] и быструю амплификацию методом ПЦР искомого фрагмента ДНК из клонов. Плазмиды, содержащие ДНК мутантного аллеля, давали продукт ПЦР, образующий гетеродуплексы после отжига с продуктом ПЦР ДНК дикого типа; плазмиды с ДНК дикого типа гетеродуплексов в таком эксперименте не образовывали. Секвенирование ДНК рекомбинантных плазмид с мутантным аллелем и аллелем дикого типа проводили по методу Сэнгера с использованием асимметричной ПЦР для получения матрицы для секвенирования [8, 9]. Секвенирование выявило делецию триплета GCC после 346-го нуклеотида кДНК РЛНП (нумерация по [10]) (рис. 1). Согласно принятой номенклатуре [2], эта мутация обозначена как 347delGCC. Мутация delGCC приводит к утрате сайта для рестриктазы *Fnu*4HI. Изошизомер этой рестриктазы *Fsp*4HI (Сибэнзим, Новосибирск) может быть использован для быстрого выявления мутации (рис. 2).

Таким образом, мутация 347delGCC может быть выявлена с помощью как гетеродуплексного, так и рестриктоного анализов ДНК. Используя эти методы, мы осуществили поиск названной мутации среди родственников пробанда и в группе всех исследованных нами больных СГ. Мутация не была выявлена у родственников пробанда, не имевших гиперхолестеринемии, а также и в 90 семьях с СГ. Известно, что короткие трехнуклеотидные делеции приводят обычно к полному блоку транспорта новосинтезированного рецептора на клеточную поверхность и отсутствию рецепторной активности [4]. Действительно, уровень общего холестерина у пациента с мутацией 347delGCC колебался от 7.5 до 11.3 ммоль/л без лечения, т.е. был сильно повышен (в норме уровень общего холестерина составляет обычно не более 5.2 – 5.7 ммоль/л). Таким образом, мы действительно нашли в Санкт-Петербурге новую, не описанную ранее в литературе мутацию 347delGCC, способную вызвать СГ.

Данная работа является частью исследований, поддержанных грантами Российского фонда фундаментальных исследований 97-04-48887, Совета поддержки ведущих научных школ России № 96-15-97742, государственных программ "Геном человека" (договор 10/98), "Приоритет-

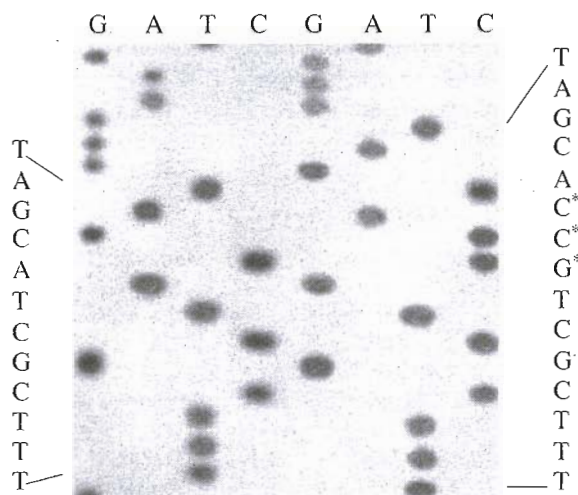


Рис. 1. Радиоавтограф секвенирующего геля. Четыре дорожки слева – мутантный аллель; четыре дорожки справа – нормальный аллель. Видно отсутствие трех нуклеотидов GCC в мутантном аллеле. Звездочкой обозначены нуклеотиды, присутствующие в нормальном аллеле и отсутствующие в мутантном.

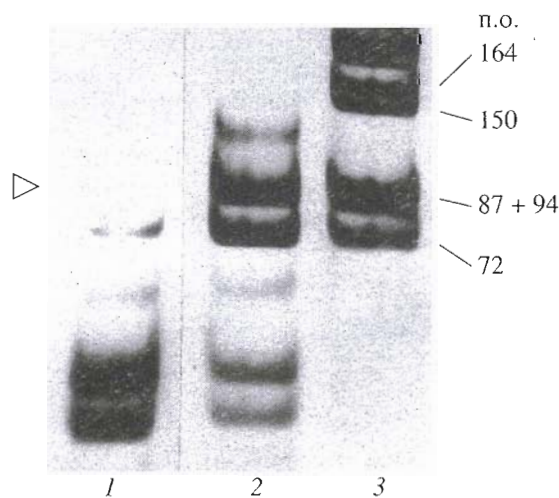


Рис. 2. Идентификация мутации 347delGCC с помощью рестриктоного анализа. На дорожки наносили: амплифицированный с помощью праймеров 4a11 и 4a12 фрагменты экзона 4 гена РЛНП пациента без мутации (1) и с мутацией (2), расщепленные рестриктазой *Fnu*4HI и ДНК фага λ , расщепленную рестриктазой *Pst*I (маркер молекулярных масс) (3). При гидролизе ПЦР-фрагмента рестриктазой *Fnu*4HI в норме образуются фрагменты 22, 34 и 41 п.о. Фрагмент 22 п.о. не виден. Фрагменты 34 и 41 п.о. видны в нижней части геля. У пациента, несущего мутацию 347delGCC в гетерозиготном состоянии, также присутствует полоса 72 п.о. (34 + 41 п.о. без 3 п.о. делеции) и зона гетеродуплексных фрагментов ДНК (указана стрелкой). Минорные зоны обусловлены неполным гидролизом. Окрашивание ДНК серебром. Цифры справа указывают размер маркерных фрагментов.

ные направления генетики” (1-286), “Национальные приоритеты в медицине и здравоохранении” (направление “Атеросклероз”) № 584.

Авторы благодарят В. Курышева за синтез праймеров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goldstein J.L., Brown M.S. // The Metabolic Basis of Inherited Disease, 6th edn. / Eds C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle. New York: MacGraw Hill, 1989. P. 1577–1698.
2. Varret M., Rabes J.P., Collod-Beroud G., Junien C., Boileau C., Beroud C. // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 172–180.
3. Mandelshtam M.Ju., Lipovetskyi B.M., Schwartzman A.L., Gaitskhoki V.S. // Hum. Mutat. 1993. V. 2. P. 256–260.
4. Hobbs H.H., Brown M.S., Goldstein J.L. // Hum. Mutat. 1992. V. 1. P. 445–466.
5. Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 2766–2770.
6. Chakir Kh., Skobeleva N.A., Shevtsov S.P., Konstantinov V.O., Denisenko A.D., Schwartz E.I. // Mol. Gen. Metabol. 1998. V. 63. P. 31–34.
7. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning. A laboratory Manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
8. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5463–5467.
9. Gyllensten U., Erlich H.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 7652–7656.
10. Yamamoto T., Davis C.G., Brown M.S., Schneider W.J., Casey M.L., Goldstein J.L., Russell D.W. // Cell. 1984. V. 39. P. 27–38.

A Novel Mutation 347delGCC in the Human Low Density Lipoprotein Receptor Gene

M. Ju. Mandelshtam[#], V. .I. Golubkov*, Yu. A. Schur*,
B. M. Lipovetsky**, and V. S. Gaitskhoki*

*Institute for Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Pavlova 12, St. Petersburg, 197376 Russia,

**Institute of Human Brain, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

A novel mutation (347delGCC) in the human low density lipoprotein receptor gene was found in a patient with a clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia.

Key words: mutation, low density lipoprotein receptor, familial hypercholesterolemia

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (812) 234-3356; fax: +7 (812) 234-9489; e-mail: michail@molgen.iem.ras.spb.ru.

Сдано в набор 06.07.98 г.

Подписано к печати 07.09.98 г.

Формат бумаги 60 × 88¹/₈

Офсетная печать

Усл. печ. л. 10.0

Усл. кр.-отт. 2.9 тыс.

Уч.-изд. л. 10.6

Бум. л. 5.0

Тираж 280 экз.

Зак. 4379