

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ ДЮШЕННА

*Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) — X-сцепленное рецессивное заболевание, связанное с прогрессирующим поражением мышц. Встречается с частотой 1 : 3500 детей мужского пола. В настоящем обзоре представлены современные данные о структуре и локализации гена МДД, спектре мутаций и характеристика его белкового продукта — дистрофина. Обсуждается методология ДНК-диагностики и подходы к генотерапии МДД.*

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) — наиболее распространенное и наиболее тяжелое заболевание из группы наследственных нейромышечных патологий, характеризующееся прогрессирующим течением и встречающееся с частотой 1 : 3000 — 1 : 3500 у новорожденных мальчиков [1]. Впервые клинические особенности заболевания были описаны французским врачом Duchenne de Boulogne в 1860 и В. Говером в 1880 гг. X-сцепленный характер наследования мышечной дистрофии этого типа был установлен при изучении популяций мормонов в штате Юта (США) Ф. Стифенсом и Ф. Тайлером в 1951 г., а позже подтвержден Д. Волтоном в 1954 [2, 3].

Первые признаки заболевания, в частности, гипертрофию мышечной ткани икроножных мышц можно наблюдать уже с рождения. Чаще всего они обнаруживаются после 3—5 лет. У больных появляется характерная переваливающаяся походка, ослабевают двигательные функции конечностей, исчезают многие рефлексы нервной системы. При тяжелом характере заболевания снижаются функции мышц, участвующих в процессе дыхания, что осложняет течение легочных инфекций, затрудняет дыхание. Зачастую (о чем свидетельствуют встречающиеся у 60—90 % пациентов аномальные показатели электрокардиографии) имеет место клиническая кардиомиопатия [4, 5]. Приблизительно у 40 % мальчиков, больных МДД, наблюдается ярко выраженная умственная отсталость, причем важно отметить, что при этом нарушение интеллекта не прогрессирует, а в головном мозге не обнаруживаются патологические изменения [6].

В особую клиническую форму выделяется еще одно заболевание, сходное с МДД, — мышечная дистрофия Беккера (МДБ), встречающаяся приблизительно в 10 раз реже первой. Клинические симптомы сходны, но начинают проявляться в более позднем возрасте. Умственная отсталость встречается гораздо реже. Кроме того, если практически все пациенты с МДД умирают в возрасте 12—20 лет, то большинство таковых с МДБ сохраняет до старости даже способность самостоятельно передвигаться [7].

В 50—70-е гг. было проведено множество исследований, в которых предпринимались попытки выявить на биохимическом уровне патологию у больных МДД. Оказалось, что у 60—70 % больных наблюдается аномально высокая активность фермента, участвующего в метаболических процессах мышц, — креатинфосфокиназы, превышающая нормальную активность в 100—1000 раз [8]. Тем не менее неоднозначность результатов, полученных при исследовании большого количества боль-

ных МДД, не позволяла утверждать, что именно нарушение активности креатинфосфокиназы является первичным биохимическим дефектом [9].

В начале 80-х гг. появились первые работы по описанию женщин с типичным фенотипом, соответствующим МДД. Цитогенетический анализ кариотипа этих женщин показал наличие транслокаций района Хр21 на другие хромосомы человека. Так, Гринштейн с соавт. установили наличие реципрокной транслокации Хр21-11 [10]. Позже были описаны случаи транслокаций Хр21-21, Хр21-3, Хр21-1, Хр21-4 [11, 12]. Для объяснения этих фактов была выдвинута гипотеза об инактивации нормальной Х-хромосомы и развитии МДД-фенотипа в связи с тем, что Х-хромосома с утраченным в результате транслокации участком Хр21 (где, очевидно, мог локализоваться ген, ответственный за развитие МДД) оказывалась в гемизиготном состоянии [13].

В тех же 80-х годах в связи с бурным развитием методов генетической инженерии стало возможным создание геномных библиотек отдельных хромосом человека [14]. Такие библиотеки были получены и для Х-хромосомы [15, 16]. Сразу же из них были выделены уникальные последовательности, обнаруживающие так называемый полиморфизм длины рестриционных фрагментов (ПДРФ) [17]. Наличие или отсутствие уникального сайта узнавания определенной эндонуклеазой рестрикции в таких последовательностях наследовалось как менделирующий признак, и поэтому целым рядом специалистов было высказано предположение о том, что такие последовательности будут тем новым поколением маркеров, ПДРФ-маркеров на уровне генома, которые при условии тесной ассоциации с мутантными фенотипами и в случае их точной хромосомной локализации явятся отправной точкой для картирования генов, ответственных за развитие тяжелых наследственных патологий человека.

В 1985 г. была опубликована работа Дэвис с соавт., в которой представлены данные о выявлении двух ПДРФ-маркерных последовательностей из библиотеки Х-хромосомы человека, сегрегирующих с МДД [18]. Одна из них была анонимной и имела номер 754, другая — кДНК-последовательностью гена орнитинкарбамаилтрансферазы. Генетическое расстояние между этими последовательностями и МДД-локусом было определено приблизительно в 10 сМ (2 кроссинговера в 26 мейозах), а порядок расположения локусов — как МДД-754-ОКТ. После гибридизации *in situ* эти маркерные последовательности были локализованы в районе Хр21 короткого плеча Х-хромосомы человека. Позже были найдены и другие ПДРФ-маркеры, ассоциированные с МДД [19].

Вортон с соавт., изучая транслокацию Хр21 у женщин с МДД-фенотипом, установили, что транслокационный сайт находится в блоке генов, кодирующих рибосомные рРНК [20]. Зонды на основе генов рРНК были использованы для идентификации фрагментов генома, расположенных рядом с генами рРНК, среди которых предполагалось выявить и ген, ответственный за развитие МДД. Так, зонд на основе 28S рРНК обнаруживал ПДРФ, неравновесно сцепленный с МДД. В результате этих исследований из библиотеки Х-хромосомы был выделен клон, получивший название Х1.1, тесно сцепленный с предполагаемым МДД-геном и локализованный в DXS206-локусе района Хр21 Х-хромосомы человека [21].

Наиболее важной для последующей тонкой хромосомной локализации гена МДД была работа Франке с соавт., описавших пациента с четырьмя наследственными заболеваниями: МДД, хроническим лимфогранулематозом, пигментным ретинитом и синдромом Мак-Леода [22]. Цитогенетический анализ хромосом этого пациента показал наличие протяженной делеции района Хр21 Х-хромосомы.

Для выделения МДД-специфических последовательностей Канкель с соавт. предложили метод так называемой «вычитательной гибридизации» с использованием ДНК пациента с четырьмя наследственными заболеваниями и ДНК, выделенной из культуры соматических клеток человека с кариотипом 49, XXXXY (избыток Х-хромосом) [23]. Идся

состояла в том, чтобы путем последовательной реассоциации гомологичных последовательностей исследуемых образцов ДНК выявить нерассоцирующие, среди которых должны были присутствовать и последовательности, делетированные у мальчика с четырьмя наследственными патологиями, обследованного Франке с соавт. В результате проведенных исследований такие последовательности действительно были выделены и клонированы по *BamHI*-сайтам в плазмиде *pBR322*. Авторы предполагали, что полученная ими библиотека с высокой вероятностью содержит фрагменты генома из района Хр21 X-хромосомы человека.

Последующий анализ состоял в гибридизации ДНК полученных клонов, используемых в качестве зондов, с ДНК клеточных линий, содержащих X-хромосомы с делециями различной локализации и протяженности. Один клон, названный *pERT87* (*phenol ethanol reassociation technique*), не гибридизовался с ДНК клеточной линии, содержащей делецию района Хр21. Этот зонд не гибридизовался и с ДНК пяти из 56 пациентов, т. е. последовательность в геноме этих пяти больных МДД, комплементарная последовательности *pERT87*, очевидно, также была делетирована [24]. На этом основании авторами был сделан вывод о том, что последовательность *pERT87* входит в состав МДД-локуса. Она и послужило исходной точкой для тонкого физического картирования локуса МДД с использованием техники «прогулки по хромосоме» [25]. Каждый последовательно клонированный фрагмент тестировали на принадлежность к последовательностям, делетированным у разных МДД-больных, а также на ПДРФ, тесно сцепленный с заболеванием у этих больных.

Прямые данные о размерах гена МДД были получены после построения крупномасштабной рестрикционной карты МДД-локуса с применением техники электрофореза в переменном электрическом поле, впервые описанной Шварцем и Кантором в 1984 г. [26]. Для такого анализа образцы ДНК больных МДД и нормальных индивидов гидролизуют рестриктазами, в сайты узнавания которых входят динуклеотиды *SrG*; эти сайты метилируются и встречаются в геноме млекопитающих с низкой частотой [27]. Большие трудности с построением подобной рестрикционной карты для МДД-локуса свидетельствовали о том, что данный ген существенно метилирован. В результате разделения посредством электрофореза в переменном электрическом поле крупных фрагментов генома больных и нормальных индивидов с последующей гибридизацией с ДНК-зондами было установлено, что внутри ДНК-фрагмента размером 8 млн пар нуклеотидов (п. н.) имеются последовательности, относящиеся к локусам, ответственным за развитие МДД, адrenaльной гипоплазии и недостаточности глицеролкиназы [28]. Дальнейшее картирование генома МДД-пациентов с помощью электрофореза в переменном электрическом поле показало, что 54 % делеций было выявлено в субфрагменте размером 1,5 млн п. н. [29]. Наконец, после идентификации тем же методом ДНК-фрагментов, содержащих сайты транслокации X-хромосомы у женщины с МДД-фенотипом, и локализации их на физической карте Хр21-региона X-хромосомы размер МДД-локуса был расширен приблизительно до 2,5 млн п. н. [30].

Для клонирования специфических последовательностей генного локуса МДД, включающих делеционные точки разрыва, транслокационные сайты и т. д., были использованы геномные библиотеки на основе бактериофаговых и космидных векторов. Однако вследствие маленького размера вставок в этих библиотеках было выделено менее 1/4 последовательностей гигантского МДД-локуса. Благодаря появившейся в последнее время технологии клонирования больших фрагментов в искусственных хромосомах дрожжей (*YAC*, *yeast artificial chromosome*) стало возможным проклонировать этот гигантский фрагмент генома [31]. В 1992 г. были опубликованы работы о получении контига 36 перекрывающихся *YAC*-клонов, полностью «покрывающих» МДД-ген [32, 33], что было доказано различными методами: идентификацией с помощью

полимеразной цепной реакции всех известных на сегодняшний день экзонов гена в YAC-клонах, определением делеционных точек разрыва и их локализацией в полученных клонах и др. В настоящее время многие исследователи полагают, что вскоре посредством рекомбинации в дрожжах между искусственными хромосомами, содержащими перекрывающиеся фрагменты МДД-гена, будет сконструирована искусственная хромосома, включающая полный геномный локус МДД. До этого подобная работа была проделана для гена трансмембранного регуляторного белка муковисцидоза, мутации в котором приводят к развитию муковисцидоза [34].

Таким образом, можно надеяться, что благодаря полному клонированию гена МДД станет возможным определение всей нуклеотидной последовательности этого гигантского локуса, а также выяснение природы практически всех возможных нарушений, приводящих к развитию МДД.

Первым шагом в получении полной кДНК гена МДД было использование уникальных последовательностей локусов DXS164 и DXS206 Xp21-региона X-хромосомы для идентификации транскрибирующихся последовательностей исследуемого локуса. Предполагая, что ген, ответственный за развитие МДД, кодирует белковый продукт, выполняющий важные регуляторные функции, и имеет эволюционную консервативность, Монако с соавт. использовали несколько клонированных последовательностей DXS164-локуса для выявления гомологии между человеком и другими млекопитающими (цыплята, лемуры, крысы, мышь, бык) [35]. Одна из этих последовательностей, названная *pERT87-25*, была использована в качестве зонда при изучении РНК из скелетных мышц плода. С ее помощью при гибридизации обнаружен транскрипт размером 16 тыс. п. н. Подобный транскрипт был выделен и у мышей, а соответствующий ему геномный локус был картирован на мышинной X-хромосоме. Практически одновременно Бургес с соавт. также описали последовательности из кДНК-библиотеки из мышц взрослого человека (их геномные аналоги были локализованы в DXS206-локусе), гибридизующиеся с РНК-транскриптом размером 16 тыс. п. н. из мышц взрослого человека [36]. Таким образом, было показано, что эти фракции мРНК являются продуктами транскрипции МДД-гена.

Вскоре Кениг с соавт. представили результаты полного клонирования кДНК МДД-гена в виде восьми перекрывающихся фрагментов [37]. Размеры МДД-транскрипта были уточнены до 14,5 тыс. п. н. Было установлено, что в данном транскрипте имеется лишь одна протяженная открытая рамка считывания. Уточнен также размер самого гена и показано, что геномные последовательности, комплементарные восьми перекрывающимся МДД-кДНК-фрагментам, распределены более чем по 2,3 млн п. н. Xp21-региона X-хромосомы человека. Клоны кДНК МДД-гена, полученные в нескольких лабораториях из библиотек эмбриональных мышц и мышц взрослого человека, были полностью секвенированы, определены локализация иницирующего кодона, а также положение консервативных GT- и AG-сайтов, по которым идет разрезание при сплайсинге [38]. Таким образом, стало возможным установление границ экзонов и оказалось, что ген, ответственный за развитие МДД, состоит по меньшей мере из 75 экзонов, каждый из которых имеет размер приблизительно от 100 до 550 п. н., величина интронов при этом составляет в среднем 35 тыс. п. н. Наиболее протяженным оказался один из интронов, достигающий в длину 105 тыс. п. н.

В дальнейшем последовательности клонированной кДНК были использованы для исследования мутаций МДД-пациентов. Приблизительно у 70 % больных МДД были выявлены делеции различной природы и протяженности [39]. Применение кДНК-зондов значительно расширило, ускорило и упростило процедуру определения МДД-мутаций.

Хоффманом с соавт. в серии исследований было оценено содержание МДД-транскрипта в различных тканях человека [40]. Экспрессия МДД-гена была установлена в скелетных мышцах взрослого человека,

скелетных мышцах, сердечной мышце, мозге и легких плода. Содержание мРНК в этих тканях было оценено в 0,01—0,001 % от суммарной мРНК. Более низкий уровень экспрессии наблюдался в гладких мышцах взрослого человека, печени, почках, яичниках. Оронзи-Скотт с соавт. была исследована экспрессия МДД-гена в мышцах здорового человека и больных МДД [41]. Было установлено, что в мышцах больных имеет место экспрессия мРНК измененного размера, связанная с делециями или дупликациями различных частей гена.

Экспрессию гена МДД изучали и в культуре мышечных клеток [42]. Системы культур клеток являются неоценимыми при анализе процессов развития в таких тканях, как нервная или мышечная, которые подвергаются конечной дифференциации. Морфологическое созревание мышц в культуре сопровождается развитием специфических биохимических изменений. В результате серии работ нескольких исследовательских групп было показано, что экспрессия мышечноспецифических генов контролируется на многочисленных уровнях, включая как транскрипцию, так и трансляцию [43, 44]. Модулировать эту экспрессию можно с помощью взаимодействий с немускульными клетками, в частности, иннервацией мышечной культуры кокультурой нейронов спинного мозга. При анализе РНК, выделенной из различных культур, было установлено, что экспрессия МДД-гена тканеспецифична и имела место только в клетках мышечной линии. Например, не было обнаружено экспрессии МДД-гена в культурах клеток спинного мозга нейробластомы: глиомы гибридных клеток, фибробластах кожи или мышц, лимфоцитах и т. д. [45]. Экспрессия МДД-гена, очевидно, специфична и в отношении стадии развития мышечной культуры. Транскрипт не присутствует в клетках миобластов, определить его оказалось возможным, лишь начиная со стадии формирования миотрубочек [42]. Появление МДД-транскрипта в нормальных мышцах только после образования миотрубочек согласуется с гипотезой о том, что экспрессия гена становится важной лишь с началом конечной дифференцировки по аналогии с экспрессией других стадийспецифических генов, таких как гены ММ-изоформы креатинкиназы, тяжелой цепи миозина мышц взрослого человека, ацетилхолинового рецептора [43, 44]. Точная стадия дифференциации, на которой происходит и наиболее значима экспрессия МДД-гена, неизвестна. Кроме того, не было обнаружено никаких первичных мышечных дефектов в составе миобластов и миотрубочек, наблюдаемых в культурах, полученных от больных МДД, однако описаны миофибрилярные поражения в культуре миотрубочек после иннервации в течение 2—4 последних месяцев [46]. Помимо этого было замечено, что МДД-миобласты пролиферируют более медленно вследствие истощения их пролиферирующей способности.

Исследование возможной тканеспецифической экспрессии МДД-гена позволило установить, что может иметь место как альтернативный сплайсинг мРНК гена МДД, так и альтернативная инициация транскрипции этого гена в мышцах и мозге. Последняя была связана с обнаружением двух типов промоторов: мышечноспецифического и мозгспецифического. Используя гибридизацию специфических 5'-концу гена кДНК-зондов с препаратами мРНК из мышц и мозга с последующим расщеплением негибридирующихся одноцепочечных участков РНК РНКазой А, Ньюдел с соавт. установили, что первый экзон мРНК отличается в исследуемых образцах [47]. Более детальный анализ с помощью специфической амплификации посредством полимеразной цепной реакции на кДНК-матрицах последовательностей, «покрывающих» полную кДНК гена МДД, был осуществлен Финером с соавт. [48]. Было обнаружено наличие стоп-кодона недалеко от иницирующего кодона, из чего следовало, что РНК-полимераза при транскрипции МДД-мРНК в мозге как бы «проскакивала» участок между стоп-кодоном и последующим иницирующим кодоном. Позже было показано, что мозгспецифический промотор МДД-гена лежит проксимальнее мышечноспецифического на 100 тыс. п. н. [49]. Этими же авторами был установлен факт

альтернативного сплайсинга 3'-конца МДД-мРНК. При специфической амплификации с помощью полимеразной цепной реакции кДНК-последовательностей, соответствующих 3'-концу МДД-транскрипта, наряду с продуктами ПЦР ожидаемого размера было отмечено появление удлиненных и укороченных форм. Проведенный анализ показал, что вариабельный район включает 2 тыс. п. н. кодирующей последовательности. Различные изоформы МДД-мРНК варьировали от ткани к ткани, хотя было замечено, что одни формы, более характерные для скелетных мышц, присутствовали и в препаратах мРНК из сердечной мышцы, в то время как другие чаще выявлялись в РНК из гладких мышц и/или мозга.

Было также показано существование белкового продукта, получившего название *Dp71*, с молекулярной массой 70 800, который кодируется дистальной частью МДД-гена. Он экспрессируется во многих типах клеток и тканей. 5'-нетранслируемый регион *Dp71* транскрибируется с единственного экзона. Промотор для транскрипции этого мажорного продукта МДД-гена не имеет ТАТА-бокса и содержит GC-богатый участок, а также несколько потенциальных сайтов связывания *Sp1*. Он расположен более чем на 2000 тыс. п. н. за 3'-концом мышечного и мозгового типов промоторов гена дистрофина и начинается за 150 тыс. п. н. до 3'-конца этого гена. Показано, что у большинства больных МДД экспрессия *Dp71* не нарушена [50].

Первые работы по идентификации белкового продукта гена, ответственного за развитие МДД, основывались на исследовании кДНК МДД и изучении гомологии с мышцами в этом локусе, которая оказалась равной по крайней мере 90 % по ДНК- и аминокислотным последовательностям [51]. Хоффман с соавт. выделили поликлональные антитела против гибридных (fusion) белков, полученных геноинженерным способом и кодируемых двумя определенными участками мышечной кДНК, гомологичной кДНК МДД человека [52]. С помощью этих антител в нормальных человеческих и мышечных скелетных и сердечных мышцах при иммуоблоттинге был идентифицирован белок с относительной молекулярной массой около 400 000. Еще до этих работ при анализе мРНК гена МДД было показано, что в ней находится лишь одна протяженная открытая рамка считывания, простирающаяся на 11 тыс. п. н. Установленная по последовательности мРНК аминокислотная последовательность предполагает существование белка массой 427 000 [53]. Таким образом, наблюдалось совпадение предсказанного и экспериментально установленного размера белкового продукта исследуемого гена. Кроме того, было предсказано, что этот белок состоит из четырех прилегающих доменов.

Аминокислотная последовательность названного дистрофином продукта гена МДД была проанализирована на гомологию с другими уже известными белками человека [54]. Оказалось, что 200 аминокислот NH-конца имеют сходство с высококонсервативным актинфиламентообразующим доменом в цитоскелетных мышцах цыплят и  $\alpha$ -актининном *Dictyostelium*. Подобная гомология может означать взаимодействие дистрофина с актиновыми филаментами в миофибриллах. Второй домен состоит из 26 повторов размером от 88 до 126 аминокислотных остатков, организованных в тандемы. Эти повторы также оказались сходными с таковыми, находящимися в цитоскелетных белках спектрина и  $\alpha$ -актининие. Такие повторы предполагают  $\alpha$ -спиральную структуру в спирально-спиральном взаимодействии, дающем 25 триплетных спиральных сегментов. Эти взаимодействия делают вероятной стержнеподобную структуру дистрофина длиной 125 нм. Третий цистеинобогатый домен имеет существенное сходство с полными карбокситерминальными доменами  $\alpha$ -актинина, найдено 24 % гомологии по 142 аминокислотным остаткам. Наконец, 420 аминокислотных остатков COOH-конца не обнаруживают сходства с другими опубликованными последовательностями.

Количество дистрофина было оценено приблизительно в 0,001—0,002 % от общей массы белков скелетных мышц. Это хорошо коррели-

рует с количеством дистрофиновой мРНК в препаратах мРНК из мышц [55].

Большие сложности в выделении дистрофина, связанные с его низким содержанием в скелетных мышцах и большим размером, не позволяли исследовать и описать его функции и особенности при использовании традиционных биохимических методов. Поэтому для анализа белкового продукта гена МДД были применены в основном косвенные методы, прежде всего иммунологические.

Первые исследования по распределению дистрофина в тканях были проведены на нормальных мышечных тканях. Результаты иммуноблоттинга, в частности, показали, что дистрофин представлен в скелетных, сердечной и гладких мышцах мышц и очень малое количество данного белка содержалось в мозге [56]. С другой стороны, он отсутствовал в мышцах *mdx*-мышей, представляющих собой мышечную модель МДД [57]. Более детальный анализ тканевого распределения дистрофина у человека выявил наличие дистрофина в скелетных, сердечной и гладких мышцах [58]. Хотя некоторое его количество было обнаружено посредством иммуноблоттинга в нескольких немускульных тканях, это, как предполагают многие авторы, может быть связано с проникновением дистрофина из стенок гладких мышц кровеносных сосудов в эти ткани.

Исключением является мозг, где присутствие дистрофина в меньшем количестве может быть объяснено особенностями глиальных клеток или нейронов, что было продемонстрировано при изучении культур ткани.

Сравнение результатов иммуноблоттинга скелетных и гладких мышц позволило предположить, что существуют различные изоформы дистрофина. Белок из скелетных мышц при электрофоретическом разделении мигрирует в виде двух полос, одна из которых соответствует наблюдаемой в препаратах из гладких мышц, а вторая имеет несколько большую молекулярную массу. Это хорошо согласуется с данными об альтернативном сплайсинге дистрофина в гладких мышцах.

Точные функции дистрофина в настоящее время неизвестны. Однако многие исследователи полагают, что этот белок играет важную роль в формировании цитоскелета клетки [59]. В пользу этого предположения свидетельствует гомология отдельных доменов дистрофина с цитоскелетными белками  $\alpha$ -актининном и спектрином. Кроме того, результаты электронной микроскопии при окраске золотом ультратонких срезов мышц продемонстрировали, что основное количество дистрофина распределено на поверхности плазматической мембраны, обращенной к цитоплазме в мышечных фибриллах [60]. Обнаружение при мечении мембран миофибрилл золотом регулярно повторяющихся структур дало возможность исследователям предположить, что дистрофиновые молекулы образуют сетку в плазматической мембране. Полагают, что дистрофин играет важную роль в обеспечении механической прочности сарколеммы посредством якорного закрепления цитоскелета на плазматической мембране. Следствием этого может быть тот факт, что при отсутствии дистрофина мышечные волокна у больных МДД подвергаются большому физическому стрессу ввиду сильной чувствительности к дефициту дистрофина, в результате чего можно ожидать разрыва плазматической мембраны и наблюдаемых при этом последующих мышечных некрозов [61].

Обследование пациентов с МДД и МДБ показало полное отсутствие дистрофина у лиц с тяжелыми формами заболевания, что может быть связано с наличием мутаций, приводящих к образованию стоп-кодона в последовательности мРНК. Дистрофин измененного размера (возможно, вследствие делеции или дупликаций в мРНК) наблюдался у пациентов с более мягкими формами миодистрофии [62]. В настоящее время изучение дистрофина находит применение, наряду с анализом мутаций на ДНК- и РНК-уровне, и в диагностике данного заболевания. Кроме того, точное выяснение функций дистрофина могло бы пролить свет не только на природу патогенеза при МДД и подходы к терапии

заболевания, но и на процессы нормального развития и конечной дифференцировки мышечной ткани.

Благодаря работам по картированию гена, ответственного за развитие МДД, и по клонированию его кДНК, стало возможным определить и охарактеризовать различные виды мутаций, приводящих к манифестации заболевания. Анализ большого количества пациентов в различных странах мира (США, Канада, страны Европы, Япония, Китай, Латинская Америка) показал, что преобладающим типом нарушений гена являются делеции различной протяженности. Первое исследование такого рода было проведено в лаборатории Канкеля, когда при гибридной скрининге 1346 МДД-пациентов зондом *pERT87* (первая проклонированная последовательность гена дистрофина) в 6,5 % случаев было обнаружено отсутствие соответствующих гибридных полос, что свидетельствовало о наличии делеций в локусе DXS164 изучаемого гена [24]. Позже, когда для ДНК-анализа пациентов были использованы зонды на основе последовательностей второго описанного локуса гена МДД DXS206, процент выявленных у этих же пациентов делеций возрос до 17 [63]. Последующее использование иных геномных ДНК-зондов (*X1.1*, *J-Bir* и др.) позволило обнаруживать наличие делеций у 50 % пациентов [64]. Когда в качестве зондов для выявления делеций были использованы клонированные последовательности кДНК гена дистрофина, число это возросло до 75 % [65]. Оказалось, что делеции гена дистрофина очень гетерогенны по размеру и по локализации. В настоящее время описано около 300 различных типов делеций, простирающихся в длину от 5—6 до 1000 тыс. п. н. [66]. Процент инtragenных делеций и их размер не кажется таким уж высоким по отношению к подобному локусу генома человека. Приведенные выше результаты сравнимы с таковыми, полученными для других локусов X-хромосомы. Так, например, для гена VII фактора свертывания крови размером 186 тыс. п. н. показано наличие 9 % делеций от общего количества мутаций, до 10 % нуклеотидных последовательностей может быть делетировано в гене орнитинкарбамаиллазы размером 30 тыс. п. н., для локуса гуанинфосфорибозилтрансферазы размером 44 тыс. п. н.— те же 10 % [67, 68]. У пациентов с X-сцепленным рецессивным ихтиозом обнаружено непропорционально высокое количество делеций — 95 % (от всех типов мутаций) в 146 тыс. п. н.-локусе гена стероидсульфатазы, что является, вероятно, следствием локализации гена около X—Y-парного региона дистального конца X-хромосомы, в котором возможен aberrантный X—Y-обмен в мейозе мужчин [69]. Однако сравнение относительного геномного размера с процентом делеционных мутаций обычно предполагает случайное появление делеций вдоль геномной последовательности.

Форрест с соавт. на основании собственных данных и данных, полученных в других лабораториях, описали регион, наиболее богатый делециями, примыкающий к центральной части гена, где концентрируется около 70 % от общего числа этого типа мутаций [70]. Примерно в то же время Кениг с соавт. описали другой район в 5'-области гена дистрофина, также богатый делециями, где, по их данным, концентрировалось около 20 % от всех обнаруженных на тот момент делеций [71]. Оба этих региона охарактеризованы как районы «горячих точек» делеций, поскольку здесь концентрируются точки разрыва абсолютного большинства делеций. Очень информативным для многих больных МДД оказался ДНК-анализ с использованием геномного зонда *P20* (DXS208), комплементарного одной из последовательностей гигантского интрона гена дистрофина размером 105 тыс. п. н. Оказалось, что в некоторых группах до 40 % проанализированных пациентов имели начальные точки делеций в этом интроне, расположенные в направлении 3'-конца гена [72].

Парадоксальным является тот факт, что делеции некоторых экзонов гена дистрофина могут иметь место и у фенотипически здоровых мужчин. Вигиллоу с соавт. описали здорового 36-летнего мужчину с

делецией 45—53-го экзона гена дистрофина [73]. Также интересным представляется то обстоятельство, что делеции могут затрагивать только интронные области гена. Кевин с соавт., изучая структуру гена дистрофина в двух неродственных семьях с МДД, у двух здоровых мужчин из разных семей при использовании зонда *Xycdna* выявили однотипные делеции в 5-концевой области гена дистрофина [74]. Эти делеции были расположены внутри протяженного интрона и не захватывали экзонных участков. У больных из этих семей также обнаружены внутригенные делеции, которые, помимо интронных, захватывали и экзонные области. Вероятно, не проявляющиеся, так называемые «молчащие», делеции могут быть причастны к образованию летальных делеций. Очевидно, что особенно важно учитывать возможность существования подобных «молчащих» делеций при пренатальной диагностике заболевания.

Как известно, приблизительно треть миодистрофий Дюшенна представляет собой мутации *de novo*. Различными авторами получены очень противоречивые данные о частоте делеций при спорадических и семейных случаях МДД. Так, данные, приведенные в работе Пассос-Бьено с соавт., свидетельствуют о том, что из 35 больных, у которых были обнаружены различные делеции *Cf23a*-, *Cf56a*-, *Cf115*-зондами, 73 % были из семей со спорадическим типом заболевания и 27 % — из семей с наследственной формой [75]. В работе других авторов было показано, что делеции в спорадических и семейных случаях встречались с одинаковой частотой [76]. Окончательно вопрос о частоте мутаций *de novo* может быть решен только на основании статистического анализа обширной группы семей с МДД на протяжении нескольких поколений.

Нужно отметить, что до недавнего времени процедура определения делеций являлась довольно продолжительной и трудоемкой. Блот-гибридизация с уникальными последовательностями занимала много времени, и часто требовалось не менее 30—40 гибридизаций с различными зондами для выявления мутации в гене, ответственном за развитие МДД. Значительно расширились возможности тестирования этих мутаций, когда были разработаны методы гибридизации с препаратами гидролизованной цетогермы рестриктазами ДНК, разделенной посредством электрофореза на переменном электрическом поле [77]. При этом в определенных выборках частота выявленных делеций возросла на 20—30 %. Большие перспективы для анализа экзонных делеций появились перед исследователями, когда был описан метод специфической амплификации ДНК *in vitro* с помощью полимеразной цепной реакции [78]. Поскольку границы экзонов и интронов были точно установлены при секвенировании кДНК гена дистрофина, стало возможным подобрать олигонуклеотидные праймеры, фиксирующие границы экзонов, и разработать системы мультисеквенсированной полимеразной цепной реакции, при которой сразу несколько экзонов анализируются на наличие делеций посредством одновременной амплификации их последовательностей [79]. Этот метод значительно ускоряет и упрощает процедуру определения МДД-делеций, имеющих место на геномном уровне.

Важнейшим аспектом в исследованиях наследственных заболеваний является клиническая гетерогенность последних, т. е. как те или иные нарушения генотипа реализуются в виде тех или иных фенотипов. Очень актуальна данная проблема и для МДД-МДБ, поскольку наряду с многообразием различных мутаций гена существует и многообразие клинических типов заболевания; среди МДД и МДБ выделяют легкие, тяжелые и промежуточные формы. Поэтому уже в первых работах по определению мутаций в гене дистрофина были предприняты попытки соотнести тот или иной тип делеций с определенным фенотипом [80]. Было установлено, что размер и локализация делеций не влияют на манифестацию заболевания. Моноко с соавт. проводили анализ точек разрыва части интронных делеций в проксимальной области МДД-локуса при отборе больных МДД и МДБ [81]. Ими было показано, что делеции у МДД-больных приводят к сдвигу рамки считывания с немедленным образованием стоп-кодонов в конечных точках делеций в послед-

вательности мРНК. Предсказанная терминация трансляции этих мРНК, по предположению, приводит к образованию дистрофина с существенными нарушениями структуры. С другой стороны, в случае пациентов с МДБ исследуемые делеции не нарушают, как правило, открытой рамки считывания, при этом образуется белковый продукт, по-видимому, хоть и измененного размера, но частично функционально активный [82]. Подтверждает подобное предположение и то, что описаны пациенты с протяженными делециями в гене дистрофина, затрагивающими до одной трети гена, обладающие, тем не менее, клиническим фенотипом средней тяжести [83].

Несмотря на то, что для большинства обследованных пациентов описанная выше корреляция имеет место, существуют случаи несовпадения с предложенной гипотезой о делециях «в рамке» и «со сдвигом рамки считывания». Для объяснения наблюдаемых отклонений Эмсри одним из первых выдвинул гипотезу о том, что средовые и генетические факторы, отличные от делеций экзонов, могут влиять на развитие МДД [1]. Более детальное объяснение этих явлений было получено, когда стало возможным проанализировать препараты РНК пациентов с мышечной дистрофией с использованием амплификации, полученной в результате обратной транскрипции кДНК с помощью полимеразной цепной реакции [84]. Олигонуклеотидные праймеры для полимеразной цепной реакции были подобраны таким образом, чтобы полная кДНК была представлена в виде 12 перекрывающихся фрагментов, содержащих все экзоны гена дистрофина. Робертс с соавт., исследовав препараты РНК 26 пациентов с различными формами МДД/МДБ, установили, что отклонения от гипотезы о мутациях, сохраняющих и нарушающих открытую рамку считывания, могут быть связаны с альтернативным сплайсингом некоторых экзонов гена дистрофина. Так, например, делеция 44-го экзона в геномной последовательности очень часто может быть связана с исчезновением в последовательности мРНК 45-го экзона, при этом делеция 44-го экзона не нарушала открытой рамки считывания, в то время как такое нарушение наблюдалось при отсутствии 44-го и 45-го экзонов. Интересным представляется тот факт, что у 50 % изученных пациентов было выявлено отсутствие 9-го экзона гена дистрофина в последовательности мРНК. Как показали исследования, при этом не нарушается открытая рамка считывания, и поскольку авторы не располагали данными с подобным анализе здоровых индивидуумов, то вполне вероятно, что такой альтернативный сплайсинг может иметь место и для нормального гена. Использование предложенного подхода — специфической амплификации мРНК тканеспецифических генов в суммарных препаратах кДНК уже сегодня является очень информативным для анализа мутаций во многих генах: фактора VIII свертывания крови,  $\beta$ -глобина, фенилаланингидроксилазы и др. [85, 86].

В настоящее время исследование мутаций в гене дистрофина проводится во многих лабораториях мира. Это связано с сильной распространенностью данного заболевания, многообразием клинических проявлений, а также с высокой частотой спонтанных мутаций, отмеченной для МДД. Сейчас описаны уже около 300 различных делеций в гене дистрофина, а также выявлены и другие типы мутаций. Нами были получены результаты по распределению делеций в гене дистрофина у больных МДД в Украине. Процент делеций в исследованных экзонах (28,6 %) оказался ниже, чем у больных из других регионов мира [124]. Так, например, Малышевой с соавт. получены данные, свидетельствующие о выявлении делеций у 50 % обследованных МДД-пациентов из России. Евграфов с соавт. выявили те же мутации у 40 % проанализированных больных из разных регионов бывшего Советского Союза [125, 126]. Аналогичные данные были получены и в других лабораториях мира: от 45 до 60 % для Англии, Франции и других стран [127, 128]. Вероятной причиной такого отклонения могут быть популяционные или этнические особенности в характере мутаций, преобладающих в данном регионе.

Несмотря на то, что делеции различной протяженности являются преобладающим типом мутаций, приводящих к развитию МДД, имеется небольшой процент и других нарушений гена дистрофина, выявляемых у пациентов с этим видом заболеваний. Так, например, несколькими авторами были обнаружены частичные дубликации гена дистрофина. Гу с соавт., изучая 72 неродственных индивидуума с МДД, не обнаружили делеций, однако у 14 % из них выявили дубликации гена с помощью точного количественного анализа интенсивности полос при гибридизации с полным набором кДНК-зондов [92]. Кроме того, как результат дубликаций у 6 из 10 пациентов было обнаружено появление новых рестрикционных фрагментов при гибридизации с кДНК-зондами. Позже этими же авторами была предпринята попытка выявить происхождение дубликаций с помощью ПДРФ-анализа семей [93]. Семейный анализ показал, что дубликации во всех случаях возникли в зародышевых клетках дедов пробандов. Как предполагалось ранее, вероятным механизмом появления дубликаций является неравный сестринский хроматидный обмен между хроматидами одной X-хромосомы. Авторы предложили гипотезу образования дубликаций в гене дистрофина у мужчин. Возможно, внутри некоторых интронов гена дистрофина расположены диспергированные повторяющиеся элементы ДНК, например *Alu*-повторы. Известно, что такие повторы могут вызывать неравный кроссинговер. Для проверки этой гипотезы необходимо клонировать и секвенировать границы дубликаций у больных МДД.

Наконец, Беттекен и Мюллер обнаружили инсерцию размером 220 тыс. п. н. в гене МДД в семье с атипичным течением заболевания [94]. Эта инсерция была выявлена при гибридизации *Sfi*I-рестрицированных фрагментов ДНК пациента с зондом *J-Bir* из-за появления одного фрагмента аномальной длины, в то время как смежные фрагменты имели нормальный размер.

За последние годы стали накапливаться данные о возможной роли транспозонных элементов в возникновении мутаций в геноме человека, приводящих к развитию наследственных заболеваний. Подобное предположение было высказано и для объяснения некоторых атипичных случаев МДД. Затцем с соавт. при изучении нескольких семей [95]. Известно, что около 75 % конечных точек всех охарактеризованных делеций в гене дистрофина располагаются в двух регионах, классифицированных как «горячие точки» мутаций. Первый находится около 7-го экзона и второй — около 44-го экзона [96]. По мнению многих исследователей, молекулярной основой нестабильности генома в таких районах в числе других причин может быть и особенность первичной структуры. Безусловно, данные по секвенированию ДНК могли бы пролить свет на мутационные механизмы в таких «горячих точках». Пизутти с соавт. в 1992 г. опубликовали работу о секвенировании последовательностей ДНК размером около 50 тыс. п. н. в районе 44-го экзона гена дистрофина [97]. Оказалось, что в состав этого региона входит транспозоноподобный элемент, который был по гомологии нуклеотидных последовательностей отнесен к семейству ретротранспозонов человека TNE-1. Этот элемент, названный TNE-43D, — первая транспозонная последовательность, вовлеченная в мутационные события, являющиеся причиной генетического заболевания человека.

Среди важнейших аспектов в изучении генома человека можно выделить анализ индивидуальной изменчивости нуклеотидной последовательности ДНК. Такие исследования в настоящее время органично дополняют широко развернувшиеся во всем мире работы по тотальному секвенированию генома человека. Очевидно, изучение полиморфизма ДНК генома человека и особенно его некодирующих областей в популяциях представляет большой интерес для ответа на вопрос о том, какая доля генетической изменчивости между популяциями определяется действием отбора, а какая — случайным дрейфом. Важное место здесь принадлежит изучению полиморфизма последовательностей такого гигантского гена, как ген дистрофина. К настоящему времени описано

большое количество маркеров полиморфизма ДНК этого гена разной природы [98, 99]. К их числу относятся многочисленные внутригенные и фланкирующие (ПДРФ-маркеры), полиморфные варианты различных коротких tandemных повторов в нетранслируемых последовательностях гена дистрофина и др. Особенно значимым представляется тот факт, что благодаря успехам в картировании и изучении гена дистрофина известна локализация этих последовательностей и, таким образом, по данным популяционных исследований возможно будет оценить, какие из функционально различных последовательностей попадают под действие отбора, а какие представляют собой так называемые «нейтральные» вариации.

Кроме того, анализ полиморфизма последовательностей гена дистрофина до сих пор остается актуальным для исследования семей с высоким риском МДД. В настоящее время разработаны эффективные системы диагностики этого заболевания, основанные на сцеплении определенных вариантов полиморфных маркеров с мутантными фенотипами. Важной характеристикой таких диагностических систем является уровень гетерозиготности по ним в популяции. Необходимо это потому, что при X-сцепленных заболеваниях мать пробанда должна иметь так называемый «гетерозиготный» ПДРФ-генотип, т. е. ее X-хромосомы должны быть маркированы разными полиморфными вариантами изучаемой последовательности. В этом случае легко проследить передачу той или иной X-хромосомы больному ребенку и определить, таким образом, какая из них несет МДД-мутацию.

В историческом плане первыми маркерами гена дистрофина были маркеры ПДРФ *pERT*-локуса, которые и в настоящее время широко используются для семейного ДНК-анализа сцепления, а также в популяционных исследованиях. Это обусловлено, кроме всего прочего, еще и тем, что подобный анализ проводится специфической амплификацией *in vitro* посредством полимеразной цепной реакции [100]. Также находит применение ПДРФ-анализ с помощью блот-гибридизации и с использованием в качестве зондов последовательностей *J-Bir*, *J1.1.*, *p754*, *P20* и др.

Во многих странах мира в настоящее время уже получены данные по распределению полиморфных вариантов этих последовательностей в различных популяциях [101, 102]. Много информативных ПДРФ было обнаружено при использовании в качестве зондов клонированных последовательностей кДНК гена дистрофина [103, 104]. Очень эффективно в применении ПДРФ-маркеров при диагностике МДД сочетание анализа внутригенных и фланкирующих ген дистрофина последовательностей, поскольку для многих из них высока вероятность внутригенного кроссинговера, обусловленного, прежде всего, гигантским размером гена [105]. В результате такого кроссинговера МДД-мутация и маркирующая ее полиморфная последовательность могут оказаться на различных X-хромосомах и вследствие этого привести к ошибкам в диагностике, в том числе и, что наиболее тяжело, в пренатальной.

В последнее время описан другой класс полиморфных маркеров гена дистрофина, представляющих собой tandemные повторы коротких последовательностей разной длины. Так, группой американских авторов недавно были описаны динуклеотидные СА-повторы, обладающие высокой степенью полиморфизма и перспективные для анализа сцепления [106]. Эти повторы могут встречаться по соседству с кодирующими регионами генов, в интронах внутри генов или внутри нетранслирующихся районов. Такие повторы обнаружены в 3'-нетранслируемом регионе гена дистрофина. Интересно то, что некоторые из них, в частности, МР1Р- и МР1Q-тандемные повторы в 3'-нетранслируемом регионе гена дистрофина могут быть использованы для анализа кроссинговера в семьях [107].

Важной вехой в изучении МДД явилось создание моделей заболевания на животных. Первой такой моделью стали так называемые *mdx*-мышцы, впервые описанные Булфилдом с соавт. [108]. Несмотря на раз-

личающиеся у человека и *mdx*-мышей клинические проявления заболевания, некоторые симптомы оказались довольно схожими, в частности, был выявлен аномально высокий уровень активности в крови креатинфосфокиназы, что является в настоящий момент одним из основных биохимических тестов на МДД. Геномные и кДНК-зонды человека были использованы для детекции и картирования мышинового гомолога человеческого МДД-гена. Эти работы завершились картированием мышинового гена МДД в том же регионе мышиной X-хромосомы, что и ранее идентифицированный локус *mdx*-мутаций, а отсутствие рекомбинации между этими локусами позволило установить, что речь идет об одном и том же участке генома [109]. Молекулярно-биологический и биохимический анализы подтвердили описанные выше данные. Было показано, что у нормальных мышей дистрофин экспрессируется в поперечно-полосатых мышцах и мозге, тогда как у *mdx*-мышей в этих тканях дистрофина обнаружено не было. Это отсутствие идет вразрез с наблюдением экспрессии транскрипта размером 14 тыс. п. н. у *mdx*-мышей в пределах от 16 до 21 % по сравнению с нормальными мышами [110]. Следовательно, *mdx*-мутации могут представлять собой точечные мутации или маленькие делеции в результате преждевременной терминации трансляции, что позже было подтверждено экспериментально [111].

Несмотря на то, что мышинная модель МДД по многим признакам является сходной с человеком, тем не менее значительные клинические различия (отсутствие обширных некрозов, сохранение большей части нормальной мышечной массы, отсутствие обширной пролиферации соседних с мышечными тканями, и прежде всего соединительной) и генетические признаки (наличие частичной экспрессии гена и др.) не позволяют считать эту модель адекватным аналогом МДД.

Купер с соавт. в результате проведенных исследований представили потенциальную модель МДД у собак [112]. X-сцепленная мышечная дистрофия у собак проявляется в виде сходных с МДД клинических симптомов. На молекулярном уровне показано, что имеется гомолог МДД-локуса у собак, который экспрессируется с образованием 14 тыс. п. н.-транскрипта. Антитела к дистрофину человека идентифицируют у собак белок с молекулярной массой около 400 000 при иммуноблоттинге суммарных белков мышц. Кроме того, дистрофин и МДД-подобные транскрипты не обнаружены у собак с МДД-подобной дистрофией, хотя другие мышечные белки и РНК-маркеры у них представлены. Эти данные дали возможность предположить, что X-сцепленная дистрофия собак является более адекватной моделью МДД.

Тем не менее, очевидно, что обе эти модели важны для понимания того, как первичный биохимический дефект дефицита дистрофина может приводить к изменениям клинического фенотипа, и могут быть использованы в разработке стратегии терапии заболевания.

Успехи в развитии методов молекулярной биологии и генной инженерии явились той предпосылкой, благодаря которой стало возможным поднять вопрос о генной терапии наследственных заболеваний человека. В случае МДД довольно долго применение генной терапии заболевания вообще не рассматривалось, поскольку огромная величина гена, большой размер его мРНК не позволяли осуществлять геноинженерные манипуляции в имеющихся на тот момент системах клонирования.

Некоторые исследователи предлагали использовать геноинженерные конструкции, несущие не полноразмерную, а усеченную молекулу кДНК дистрофина. Поводом к этому послужили работы, в которых были описаны пациенты с МДД, имевшие очень мягкий клинический фенотип, но при этом у них были выявлены гигантские делеции гена [83]. Так, в одной из таких семей имелись два брата, оба больные, которые дожили до преклонного возраста; результаты исследований показали типичные дистрофические поражения мышц, а также наличие делеции 30 экзонов гена дистрофина (с 17-го по 48-й). Результаты иммуноблоттинга суммарных мышечных белков продемонстрировали наличие у этих пациентов дистрофина с молекулярной массой 200 000. Это свидетельст-

ует о том, что, очевидно, конформация практически вдвое уменьшенно-го полипептида, между тем, обеспечивает практически нормальное взаимодействие с другими компонентами цитоскелета мышц.

В последние годы благодаря развитию работ по генной терапии наследственных заболеваний, а также разработке новых систем клонирования появились и новые подходы к генной терапии МДД. В настоящий момент эти исследования развиваются в двух направлениях: введение в организм векторов, несущих полную кДНК дистрофина, и инъекция реципиентам нормальных миобластов, способных продуцировать дистрофин обычного размера.

Первоначально стратегия переноса дистрофина в мышцы МДД-пациентов посредством трансплантации миобластов была опробована в экспериментах на грызунах [113]. Эти опыты показали, что инъекционные миобласты способны проникать в тонкую базальную пластинку мышечных волокон реципиента и случайным образом сливаться с ними, становясь неотъемлемой частью зрелых мышечных волокон реципиента, в качестве которых выступали нормальные и дистрофические животные. Подобные эксперименты были выполнены и на пациентах с МДД. Показано, что инъекция миобластов приводила к продуцированию нормального дистрофина по крайней мере в течение месяца после инъекции, что было подтверждено данными анализа мышечных биопсий, взятых вблизи места введения.

Вторым путем генной терапии стало введение в организм модельных животных, в частности *mdx*-мышей, геноинженерных векторов, несущих полную или усеченную кДНК гена дистрофина. В первых экспериментах в качестве векторов были использованы плазмиды на основе *pUC18* [114]. Аксади с соавт. было показано, что после введения таких экспрессирующих плазмид *mdx*-мышам в сарколемме и цитоплазме их мышечных клеток был обнаружен дистрофин человека приблизительно в 1% миофибрилл. В настоящее время для облегчения переноса векторной ДНК используются аденовирус — трансферрин — векторная ДНК-комплексы, как это было показано Пайпером с соавт. на *mdx*-мышях и С2С12-линии мышечных клеток [115]. Кроме этого, другими авторами полноразмерная и усеченная кДНК-дистрофина были клонированы в ретровирусные векторы, и рекомбинантные ретровирусы были инъекционированы *mdx*-мышам. Экспрессия дистрофина человека была выявлена в 10% миофибрилл мышей и определялась в течение 9 месяцев после инъекции [116].

Приведенный далеко не полный обзор данных о природе гена дистрофина и его белкового продукта, использовании анализа мутаций названного гена для пренатальной диагностики и выявления гетерозиготного носительства МДД и о подходах к генной терапии данного заболевания свидетельствует о существенных успехах, достигнутых за последнее десятилетие в поисках путей эффективной профилактики и лечения МДД.

Работа финансировалась по проекту 1.01.01/055-92 Госкомитета Украины по вопросам науки и технологий.

В. І. Гришко, Л. А. Лівшиць

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ М'ЯЗОВОЇ ДИСТРОФІЇ ДЮШЕННА

### Резюме

М'язова дистрофія Дюшенна (МДД) — X-зчеплене рецесивне захворювання, пов'язане з прогресуючим ураженням м'язів. Зустрічається з частотою 1:3500 дітей чоловічої статі. У представленому огляді наведено сучасні відомості про структуру і локалізацію гена МДД, спектр мутацій, а також характеристика його білкового продукту — дистрофіна. Обговорюється методологія ДНК-діагностики і підходи до генотерапії МДД.

## MOLECULAR AND GENETIC ASPECTS OF DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY

## Summary

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the X-linked recessive disorder resulting in progressive degeneration of the muscle. It affects about 1 in 3500 male children. Present review represents the modern data about DMD gene structure and localization the spectrum of mutations of DMD gene and characteristics of its protein product — dystrophine. The methodology of DNA diagnostic and approaches to the therapy of DMD are discussed.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Emery A. E. H. Muscular Duchenne dystrophy. Oxford monographs on medical genetics.— Oxford: Univ. press, 1987.— Vol. 15.— 338 p.
2. Stephens F. E., Tyler F. H. Studies in disorders of muscle. The inheritance of childhood progressive muscular dystrophy in 33 kindreds // Amer. J. Hum. Genet.— 1951.— 3.— P. 111—131.
3. Wolton J. N., Natrass F. J. On the classification natural history and treatment of the myopathies // Brain.— 1954.— 77.— P. 169—177.
4. Dubowitz W. Screening for Duchenne muscular dystrophy // Arch. Dis. Child.— 1976.— 51.— P. 249—251.
5. Brooke M. H., Fenichel G. M., Griggs R. C. et al. Clinical investigation in Duchenne dystrophy // Muscle and Nerve.— 1983.— 6.— P. 91—102.
6. Emery A. E. H., Clack E. R., Simons S. et al. Detection of carriers of benign X-linked muscular dystrophy // Brit. Med. J.— 1967.— 4.— P. 522—523.
7. Fenichel G. M. On the pathogenesis of Duchenne and Becker muscular dystrophy // Develop. Med. Child. Neurol.— 1975.— 17.— P. 527—537.
8. Drummond L. M. Creatine phosphokinase levels in the newborn and their use in screening for Duchenne muscular dystrophy // Arch. Dis. Child.— 1979.— 54.— P. 362—366.
9. Moser H., Emery A. E. H. The manifesting carrier in Duchenne muscular dystrophy // Clin. Genet.— 1980.— 5.— P. 271—284.
10. Greenstein R. M., Readon M. P., Chan T. S. An X-autosome translocation in a girl with DMD: evidence for DMD gene localization // Radiat. Res.— 1977.— 14.— P. 457.
11. Saito F., Tonomura A., Kimura S. et al. High resolution banding study of an X/4 translocation in a female with Duchenne muscular dystrophy // Hum. Genet.— 1985.— 71.— P. 370—371.
12. Emanuel B. S., Zackai E. H., Tucker S. Further evidence for Xp21 location of Duchenne muscular dystrophy locus: X-9 translocation in a female with DMD (Abstract) // Amer. J. Hum. Genet.— 1981.— 33.— P. 103.
13. Verellen C., Markovic V., De Meyer R. et al. Expression of an X-linked muscular dystrophy in a female due to non-random inactivation of the normal X chromosome // Hum. Genet.— 1986.— 67.— P. 115—119.
14. Botstein D., White R. L., Skolnik M., Davis R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism // Amer. J. Hum. Genet.— 1980.— 32.— P. 314—331.
15. Drayna D., White R. The genetic linkage map of the human X chromosome // Science.— 1985.— 230.— P. 753—768.
16. Muller O. J., Drayna D., Goodfellow R. Report of the committee on the genetic construction of the X and Y chromosomes // Human Gene Mapping Conference VII.— 1985.— P. 176—204.
17. Donis-Keller H., Green P., Helms C. et al. The genetic linkage map of the human genome // Cell.— 1987.— 51.— P. 319—337.
18. Davies K. E., Speer A., Herrmann F. et al. Human X chromosome markers and Duchenne muscular dystrophy // Nucl. Acids Res.— 1983.— 13, N 10.— P. 3419—3426.
19. Dorkins H., Junien C., Mandel J. L. et al. Segregation analysis of a marker localized Xp21.2-Xp21.3 in Duchenne and Becker muscular dystrophy families // Hum. Genet.— 1985.— 71.— P. 103—107.
20. Worton R. G., Duff C., Sylvester J. E. et al. Duchenne muscular dystrophy involving translocation of the *dmd* gene next to ribosomal RNA genes // Science.— 1984.— 224.— P. 1447—1449.
21. Ray P. N., Belfall B., Duff C. et al. Cloning of the breakpoint of an X-21 translocation associated with DMD // Nature.— 1985.— 318.— P. 672—675.
22. Francke U., Ochs H. D., de Martinyille B. et al. Minor Xp21 chromosome deletion in a male associated with expression of Duchenne muscular dystrophy, chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa and McLeod syndrome // Amer. J. Hum. Genet.— 1985.— 37.— P. 250—267.
23. Kunkel L. M., Monaco A. P., Middlesworth W. et al. Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with X chromosome deletion // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1985.— 82.— P. 4778—4782.

24. *Kunkel K. M.* Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy // *Nature*.—1986.—322.—P. 73—77.
25. *Monaco A. P., Bertelson C. J., Colletti-Feener C. et al.* Localization and cloning of deletion breakpoint in Xp21 involved in muscular dystrophy // *Hum Genet*.—1987.—75.—P. 221—227.
26. *Schwarz D. C., Cantor C. R.* Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel // *Cell*.—1984.—34.—P. 76—80.
27. *Brown W. R. A., Bird A. P.* Long-range restriction site mapping of mammalian genomic DNA // *Nature*.—1986.—322.—P. 477—481.
28. *Burmeister M., Lehrach H.* Long-range restriction map around the Duchenne muscular dystrophy gene // *Ibid.*—324.—P. 582—585.
29. *Den Dunnen J. T., Bakker E., Klein Bretelen E. G. et al.* Direct detection of more than 50 % of the Duchenne muscular dystrophy mutations by field inversion gels // *Ibid.*—1987.—329.—P. 640—642.
30. *Meitinger T., Boyd Y., Anand R. et al.* Mapping of Xp21 translocation breakpoints in and around the DMD by pulsed field gel electrophoresis // *Genomics*.—1988.—3.—P. 315—322.
31. *Burke D. T., Carle G. F., Olson M. V.* Cloning of large DNA segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors // *Science*.—1987.—236.—P. 806—812.
32. *Monaco A., Walker A. P., Millwood J. et al.* A yeast artificial chromosome contig containing the complete Duchenne muscular dystrophy gene // *Genomics*.—1992.—12, N 3.—P. 465—474.
33. *Coffey A. J., Roberts R. G., Green E. D. et al.* Construction of a 2.6-Mb contig in yeast artificial chromosomes spanning the human dystrophin gene using an STS based approach // *Ibid.*—P. 474—485.
34. *Anand R., Ogilvie D. J., Butler R. et al.* A yeast artificial chromosome contig encompassing the cystic fibrosis locus // *Ibid.*—1991.—9.—P. 124—130.
35. *Monaco A. P., Neve R. L., Colletti-Feener C. et al.* Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene // *Nature*.—1986.—323.—P. 646—650.
36. *Burghes A. H. M., Logan C., Xiuyuan Hu et al.* A cDNA clone from the Duchenne/Becker muscular dystrophy gene // *Ibid.*—1987.—328.—P. 434—436.
37. *Koenig M., Hoffman E. P., Bertelson C. J. et al.* Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals // *Cell*.—1987.—50.—P. 509—517.
38. *Koenig M., Bertelson C. J., Monaco A. P. et al.* Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy cDNA and an analysis of the entire DMD locus // *Amer. J. Hum. Genet.*—1987.—41.—P. A222.
39. *Hart K. A., Hodgson S., Walker A. et al.* DNA deletion in mild and severe Duchenne/Becker muscular dystrophy // *Hum. Genet.*—1987.—75.—P. 281—285.
40. *Hoffman E. P., Monaco A. P., Feener C. C. et al.* Conservation of the Duchenne muscular dystrophy gene in mice and humans // *Science*.—1987.—238.—P. 347—350.
41. *Oronzi-Skott M., Sylvester I. E., Heiman-Patterson T. et al.* Duchenne muscular dystrophy gene expression in normal and diseased human muscle // *Ibid.*—1988.—239.—P. 1418—1420.
42. *Leu A. A., Treenet S. C., L. M. Kunkel et al.* Expression of the Duchenne muscular dystrophy gene in cultured muscle cells // *J. Biol. Chem.*—1987.—262, N 39.—P. 15817—15820.
43. *Endo T., Nadal-Ginard B.* Study of expression some muscle-specific genes in culture of cells // *Exp. Neur.*—1972.—36.—P. 136—159.
44. *Jasin R., Walsh P. S., London D. S. et al.* Expression of different forms of creatin kinase in cultured muscle cells // *J. Neur. Sci.*—1983.—58.—P. 315—334.
45. *Dickson G., Pizzey I. A., Elson V. E. et al.* Distinct dystrophin mRNA species are expressed in embryonic and adult skeletal muscle // *FEBS Lett.*—1989.—247.—P. 47—52.
46. *Chelly J., Kaptan J. C., Maire P. et al.* Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues // *Nature*.—1988.—333.—P. 858—860.
47. *Nudet V., Zuk D., Paz E. et al.* Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain // *Ibid.*—1989.—337, N 6202.—P. 76—79.
48. *Feener C. A., Koenig M., Kunkel L. M.* Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus // *Ibid.*—1989.—238, G215.—P. 509—512.
49. *Boyce F. M., Beggs A. H., Feener C. A. et al.* Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1991.—88.—P. 1276—1280.
50. *Ledcrfein D., Yaffe D., Nudet U.* A housekeeping type promoter, located in the 3' region of the Duchenne muscular dystrophy gene, controls the expression of Dp71, a major product of the gene // *Hum. Mol. Gen.*—1993.—2.—P. 1883—1888.
51. *Koenig M., Monaco A. P., Kunkel L. M.* The complete sequence of dystrophin, predicts a rod-shaped cytoskeletal protein // *Cell*.—1988.—53.—P. 219—228.
52. *Hoffman E. P., Fischbeck K. H., Brown R. H. et al.* Dystrophin characterization in muscle biopsies from Duchenne and Becker muscular dystrophy // *N. Engl. J. Med.*—1988.—318.—P. 1363—1368.

53. Rosenthal A., Speer A., Billwitz H. et al. Nucleotide and corresponding amino acid sequence of human adult and fetal cDNA coding for portions of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene // *Biomed. and biochim. acta.*—1987.—47.—P. K13—K15.
54. Hoffman E. P., Brown R. H., Kunkel L. M. Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus // *Cell.*—1987.—51.—P. 919—928.
55. Hoffman E. P., Knudson C. M., Campbell K. P. et al. Subcellular fractionation of dystrophin to the triads of skeletal muscle // *Nature.*—1987.—330.—P. 754—758.
56. Hoffman E. P., Hudecki M. S., Rosenberg P. A. et al. Cell and fiber-type distribution of dystrophin // *Neuron.*—1988.—1.—P. 411—420.
57. Chamberlain J. S., Pearlman J. A., Muzny D. M. et al. Expression of the murine Duchenne muscular dystrophy gene in muscle and brain // *Science.*—1988.—239.—P. 1416—1418.
58. Miranda A. F., Bonilla E., Martucci G. et al. An immunocytochemical study of dystrophin in muscle cultures from patients with Duchenne muscular dystrophy and unaffected controls // *Amer. J. Pathol.*—1988.—132.—P. 410—416.
59. Campbell K. P., Kahl S. D. Association of dystrophin and an integral membrane protein // *Nature.*—1989.—338.—P. 259—262.
60. Bonilla E., Samitt C. E., Miranda A. F. et al. Duchenne muscular dystrophy: Deficiency of dystrophin at the muscle cell surface // *Cell.*—1988.—54.—P. 447—452.
61. Hoffman E. P., Kunkel L. M. Dystrophin abnormalities in Duchenne and Becker muscular dystrophies // *Neuron.*—1989.—2.—P. 1019—1029.
62. Hoffman E. P., Kunkel L. M., Angelini C. et al. Improved diagnosis of Becker muscular dystrophy via dystrophin testing // *Neurology.*—1989.—45.—P. 560—565.
63. Galuzzi G., Di Rienzo A., Colombo B. et al. Detection of DNA deletions in DMD by DNA probes // «*Biotech. RIA'88. mol. probes: technol. med. appl.*»: Proc. Int. symp. (Florence, 1988, Absir. Book).—New York, 1988.—P. 61.
64. Love D. R., Forrest S. M., Smith T. J. et al. Molecular analysis of Duchenne/Becker muscular dystrophy // *Brit. Med. Bull.*—1989.—45, N 3.—P. 659—680.
65. Kevin H. A., Abbs S., Wapenaar M. et al. Molecular deletions in the Duchenne-Becker muscular dystrophy gene // *Clin. Genet.*—1989.—35, N 4.—P. 251—260.
66. Forrest S. M., Cross G. S., Flint T. et al. Further studies of gene deletions that cause Duchenne and Becker muscular dystrophies // *Genomics.*—1988.—2.—P. 109—114.
67. Gitschier J. Maternal duplication associated with gene deletion in sporadic hemophilia // *Amer. J. Hum. Genet.*—1988.—43.—P. 274—279.
68. Wilson J. M., Stout J. T., Palella T. D. et al. A molecular survey of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency in man // *J. Clin. Invest.*—1986.—77.—P. 188—195.
69. Davies K. E., Briand P., Jonănescu V. et al. Gene for OTC: characterization and linkage to Duchenne muscular dystrophy // *Nucl. Acids Res.*—1985.—13.—P. 155—165.
70. Forrest S. M., Cross G. S., Speer A. et al. Preferential deletion of exons in Duchenne and Becker muscular dystrophies // *Nature.*—1987.—329.—P. 638—640.
71. Koenig M., Beggs A. H., Moyer M. et al. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type deletion // *Amer. J. Hum. Genet.*—1989.—45.—P. 498—506.
72. Vitiello L., Giro E., Mostacciuolo M. L. et al. Deletions in the distal half of the DMD-BMD locus revealed by the intragenic probe P20 (DXS269) // *Atti Ass. genet. ita.*—1989.—35.—P. 387—388.
73. Vitiello L., Nicoletti L., Schiavon F. et al. Deletion screening by cDNA in a series of 81 patients affected by Duchenne or Becker muscular dystrophy // *Ibid.*—1990.—36.—P. 391—392.
74. Kevin H. F., Abbs S., Dobrov M. Pathogenic and non-pathogenic deletions in two families with Duchenne muscular dystrophy // *Amer. J. Med. Genet.*—1989.—33, N 1.—P. 145—152.
75. Passos-Bueno M. R., Rapaport D., Love D. et al. Screening of deletions in the dystrophin gene with the cDNA probes Cf23a, Cf56a, Cf115 // *J. Med. Genet.*—1990.—27, N 3.—P. 145—150.
76. Lundtöf M., Kiuru A., Kaariainen H. et al. Gene deletions in X-linked muscular dystrophy // *Amer. J. Hum. Genet.*—1989.—44, N 4.—P. 496—503.
77. Den Dunnen J. T., Crootscholten P. M., Bakker E. et al. Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications // *Ibid.*—45.—P. 835—847.
78. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // *Science.*—1988.—239.—P. 487—491.
79. Chamberlain J. C., Gibbs R. A., Ranier J. E. et al. Multiplex PCR for diagnosis of Duchenne muscular dystrophy // PCR protocols and applications — a laboratory manual / Eds M. Innis, D. Gelfand, J. Sninski, T. White.—New York: Acad. press, 1989.—P. 272—281.
80. Darras B. T., Blattner P., Harper J. R. et al. Intragenic deletions in 21 Duchenne muscular dystrophy/Becker muscular dystrophy families studied with the dystrophin cDNA: location of breakpoints on *HindIII* and *BglII* exon-containing fragment maps,

- meiotic and mitotic origin of mutations // Amer. J. Hum. Genet.—1988.—43.— P. 620—629.
81. Monaco A. P., Bertelson C. J., Liechti-Gallati S. et al. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus // Genomics.—1988.—2.— P. 90—95.
  82. Baumbach L. L., Chamberlain J. S., Ward P. A. et al. Molecular and clinical correlations of deletions leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies // Neurology.—1989.—39.— P. 465—474.
  83. England S. B., Nickolson L. V. B., Johnson M. A. et al. Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 4% of dystrophin // Nature.—1990.—342, N 6254.— P. 180—182.
  84. Roberts R. G., Barby T. F. M., Manners E. et al. Direct detection of dystrophin gene rearrangements by analysis of dystrophin mRNA in peripheral blood lymphocytes // Amer. J. Hum. Genet.—1991.—49.— P. 298—310.
  85. Berg L. P., Wieland K., Millar D. S. et al. Detection of a novel point mutation causing haemophilia A by PCR/direct sequencing of ectopically-transcribed factor VIII mRNA // Hum. Genet.—85.— P. 655—658.
  86. Baserga S. J., Benz E. J. Nonsense mutations in the human beta-globin gene affect mRNA metabolism // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1988.—85.— P. 2056—2060.
  87. Гришко В. И., Малярчук С. Г., Лившиц Л. А. Распределение некоторых делеций в гене дистрофина у больных мышечной дистрофией Дюшенна в Украине // Цитология и генетика.—1993.—27, № 2.— С. 68—71.
  88. Малышева О. В., Горбунова В. Н., Красильников В. В., Баранов В. С. ПДРФ-анализ и скрининг делеций в семьях больных миодистрофией Дюшенна // Биополимеры и клетка.—1991.—7, № 2.— С. 98—102.
  89. Евграфов О. В. Картирование и изучение тонкой структуры некоторых генов человека и разработка на этой основе ДНК-диагностики наследственных заболеваний: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— М., 1992.—35 с.
  90. Covone A. E., Caroli F., Romeo G. Screening Duchenne and Becker dystrophy patients for deletions in 30 exons of the dystrophin gene by three-multiplex PCR // Amer. J. Hum. Genet.—1992.—51.— P. 675—676.
  91. Abbs S., Yau S. C., Clark S. et al. A convenient multiplex PCR dystrophin gene deletions: a comparative analysis with cDNA hybridisation shows mistypings by both methods // J. Med. Genet.—1991.—28.— P. 304—311.
  92. Hu X., Burghes A. H. M., Ray P. N. et al. Partial gene duplication in Duchenne and Becker muscular dystrophy // Ibid.—1988.—25.— P. 369—376.
  93. Van Ommen C. J. B., Bertelson B., Ginjaar H. B. et al. Long range genomic map of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: Isolation and use of J66 (DXS268), a distal intragenic marker // Genomics.—1987.—1.— P. 329—336.
  94. Bettecken T., Muller C. R. Identification of a 220-kb insertion into the Duchenne gene in a family with an atypical course of muscular dystrophy // Ibid.—1989.—4.— P. 592—596.
  95. Malhorta S. B., Hart K. A., Klamut H. J. et al. Frame shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophies // Science.—1988.—242.— P. 755—759.
  96. Zatz M., Passos-Bueno M. R., Rapaport D. et al. Familial occurrence of Duchenne dystrophy through paternal lines in four families // Amer. J. Med. Genet.—1991.—38.— P. 80—84.
  97. Pizzuti A., Piretti M., Fenwick R. G. et al. A transposon-like element in the deletion-probe region of the dystrophin gene // Genomics.—1992.—13.— P. 594—600.
  98. Prior T. W., Friedman K. J., Silverman L. M. RFLP for *HindIII* at the Duchenne muscular dystrophy gene // Nucl. Acids Res.—1989.—17.— P. 2167—2168.
  99. Bakker E., Bonten E. J., De Lange L. F. et al. DNA probe analysis for carrier detection and prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy: a standard diagnostic procedure // J. Med. Genet.—1986.—23, N 6.— P. 573—580.
  100. Defesche J. C., de Visser M., Bakker E. et al. DNA restriction fragment length polymorphisms in differential diagnosis of genetic diseases // Hum. Genet.—1989.—82, N 1.— P. 55—58.
  101. Kelly E. D., Graham C. A., Hill A. J. et al. Carrier estimations in Duchenne muscular dystrophy families in Northern Ireland using RFLP analysis // J. Med. Genet.—1990.—27, N 2.— P. 101—104.
  102. Wilcok I. E., Affara N. A., Yates J. R. et al. Linkage studies of X linked muscular dystrophy in the west of Scotland using four short arm X chromosome DNA polymorphisms // Ibid.—1984.—21, N 4.— P. 298.
  103. Wagner M., Reiss J., Hentemann M. et al. *MspI* RFLP for Duchenne muscular dystrophy cDNA subclone // Nucl. Acids Res.—1989.—17, N 8.— P. 3328.
  104. Laing N. G., Akkari P. A., Chandler D. C. et al. Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene cDNA 8 *PstI* and *TaqI* polymorphisms involve exon 51 of the *HindIII* map // Ibid.—1990.—18, N 1.— P. 4284.
  105. Fischbeck K. H., Kunkel L. M., Bertelson C. et al. Recombination with pEDT87 (DXS164) in families with X-linked muscular dystrophy // Amer. J. Med. Genet.—1986.—25, N 4.— P. 709—710.
  106. Oudet C., Heiling R., Mandel J. L. An informative polymorphism detectable by polymerase chain reaction at the 3' end of the dystrophin gene // Hum. Genet.—1990.—84, N 3.— P. 283—285.

107. Roberts R. G., Montandon A. J., Bobrow M. et al. Detection of novel genetic markers by mismatch analysis // Nucl. Acids Res.—1989.—17, N 15.— P. 5961—5971.
108. Bulfield G., Siller W. G., Weight P. A. L. X-chromosome linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1984.—81.— P. 1189—1192.
109. Cavanna J. S., Coulton G., Morgan J. E. et al. Molecular and genetic mapping of the mouse *mdx* locus // Genomics.—1988.—3.— P. 337—441.
110. Hoffman E. P., Monaco A. P., Feener C. C. et al. Conservation of the Duchenne muscular dystrophy gene in mice and humans // Science.—1987.—238, N 4825.— P. 1238—1241.
111. Sicinski P., Geng Y., Ryder-Cook A. S. et al. The molecular basis of muscular dystrophy in the *mdx* mouse: a point mutation // Ibid.—1989.—244, N 4912.— P. 1578—1580.
112. Cooper B. J., Winand N. J., Stedman H. et al. The homologue of the Duchenne of locus in defective in X-linked muscular dystrophy of dogs // Nature.—1988.—334.— P. 154—156.
113. Gussoni E., Pavlath G. K., Lanctot A. M. et al. Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation // Ibid.—1992.—356.— P. 435—438.
114. Ascadi G., Dickson G., Love D. R. et al. Human dystrophin expression in *mdx* mice after intramuscular injection of DNA constructs // Ibid.—1991.—352.— P. 815—818.
115. Piper T., Cotten M., Birnstiel M. L. et al. Dystrophin gene transfer using Adenovirus-Transferrin-DNA complexes // Abstr. of XVII Int. Congr. of Genet.—Birmingham: Oxford Univ. press, 1993.— P. 203.
116. Dunckley M. G., Wells D. J., Walsh F. S. et al. Retroviral transfer of dystrophin minigene into *mdx* muscle *in vivo* // Ibid.

Ин-т молекуляр. биології и генетики НАН України, Київ

Получено 23.02.95