

Начиная с 1989 г. журнал «Биополимеры и клетка» приступил к публикации материалов по одному из наиболее интересных разделов современной биологии — генной терапии. В основу положены наиболее интересные, специально подготовленные сообщения, прозвучавшие на первом симпозиуме по генной терапии (май 1989 г.), в которых обсуждаются принципиальные возможности генной терапии, круг ее задач, экспериментальные подходы к их решению, роль генной диагностики в выборе правильного варианта лечения болезней, некоторые общие вопросы генной диагностики и примеры конкретных решений. Подготовленные к печати статьи представляют практически все лаборатории, где ведутся работы, связанные с генной терапией и генной диагностикой. Второй номер журнала «Биополимеры и клетка» за 1989 г. включил в себя приоритетные публикации по генной терапии как обзорного, так и экспериментального характера. Этот выпуск журнала является первым источником в нашей стране по всему кругу проблематики генной терапии и пограничным вопросам, разрабатываемых в научных учреждениях Академии наук и Министерства здравоохранения (опубликование не вошедших в первый номер статей будет продолжено в № 2).

К сведению подписчиков — учитывая тираж журнала и актуальность проблемы, есть все основания утверждать, что данный выпуск станет библиографической редкостью.

УДК 577.21

Б. Л. Вайсман, А. П. Дыбан

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДОСТИЖЕНИЙ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ МЕТОДОВ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

На основании анализа собственных исследований и данных литературы в области генной инженерии млекопитающих дается оценка перспектив использования этого направления в интересах развития генной терапии. Рассмотрены современные методы получения трансгенных животных, свойственные им особенности интеграции в геном и экспрессии чужеродных генов, а также существующие отрицательные эффекты на организм внедрения в геном зародышевой чужеродной ДНК. Подчеркиваются широкие возможности генной инженерии животных для создания строгих генетических моделей различных патологических состояний человека, пригодных для разнообразных экспериментов в области генной терапии.

Генная инженерия млекопитающих, базирующаяся на введении в начальный период развития животных в их геном чужеродной генетической информации, за относительно короткий срок (менее 10 лет) превратилась в один из самых продуктивных подходов для решения различных фундаментальных проблем медико-биологических наук [1, 2]. Весьма велики также перспективы использования этого подхода на практике, в частности возможность изменять геном высших животных путем интеграции в него новых последовательностей ДНК делает целе-

сообразным анализ возможного вклада генной инженерии млекопитающих в развитие методов генотерапии. Кроме того, накопленный опыт исследований на целостном организме особенностей функционирования чужеродных генов и их влияния на развитие и жизнедеятельность трансгенных животных также, по-видимому, будет полезно учитывать при планировании работ в области генной терапии.

Следует отметить, что принципиальная возможность коррекции рецессивных гомозиготных мутаций за счет введения клонированных генов в оплодотворенные яйцеклетки успешно продемонстрирована на мышцах — носителях таких наследственных заболеваний, как карликовость (мутация *lit/lit*) [4]; дефекты иммунных реакций [5, 6]; β -талассемия [7]; гипогонадизм [8]; нарушения синтеза основного белка миеллина (трясущиеся мыши, мутация *shiverer*) [9]. Однако может ли этот подход сейчас хотя бы теоретически рассматриваться как пригодный для использования в генотерапии? Ответ на данный вопрос требует анализа особенностей интеграции в геном и экспрессии трансгенов при использовании различных методов получения трансгенных животных.

Сейчас применяют в основном три метода трансгеноза. Причем во всех случаях после манипуляций с зародышами их трансплантируют самкам-реципиентам, а среди рождающихся особей затем отбирают трансгенные.

Метод микроинъекций растворов ДНК в один из пропусклеусов оплодотворенных яйцеклеток является сейчас наиболее распространенным способом получения трансгенных животных. К его несомненным достоинствам относится в первую очередь универсальность по отношению к различным видам животных. С использованием этого метода уже получены трансгенные мыши, крысы, кролики, овцы, коровы [1, 2, 10—12]. Во-вторых, этот метод отличает высокая эффективность и наиболее короткий путь получения «полностью» трансгенных животных: после операций на зиготах среди рождающихся особей от 20 до 60 % животных содержат во всех тканях стабильно интегрированную и передающуюся потомству чужеродную ДНК [13—16]. Допустимые предельные размеры микроинъекцируемой ДНК пока не установлены, во всяком случае они не меньше 50 т. п. н. [17].

Данные о том, что все ткани рождающихся особей, включая половые, содержат микроинъекцируемую ДНК [13, 15, 18], а также наши исследования событий, происходящих с вводимой ДНК, свидетельствуют о том, что, как правило, интеграция чужеродной ДНК после ее микроинъекции в зиготы происходит еще до первого деления дробления. Однако изредка интеграция может происходить позднее. По-видимому, вследствие этого до 10—20 % трансгенных животных могут быть мозаиками [19, 20]. Характер наследования чужеродной ДНК и анализ генома исходных трансгенных животных подтверждают то, что интеграция трансгена происходит в основном в какой-либо один сайт генома [13, 21, 22]. В итоге рождающиеся трансгенные животные оказываются гетерозиготными по трансгену. Инкорпорация микроинъекцируемой ДНК протекает не за счет гомологической рекомбинации, а, видимо, достаточно случайно [17, 19]. Копийность чужеродной ДНК может варьировать у различных особей в пределах от единицы до нескольких сотен копий на геном [22] при преимущественно tandemном расположении трансгенов [21].

Использование рекомбинантных ретровирусов в качестве векторов. При этом инфицирование зародышей осуществляется путем их кокультивирования на стадии 2—8 клеток с клетками — продуцентами ретровируса [19]. Чем позднее произойдет проникновение ретровируса в какую-либо клетку зародыша, тем меньше вероятность ее представительства среди половых клеток [23, 24]. Наиболее целесообразным является использование систем, вырабатывающих дефектные ретровирусы, способные к интеграции в хромосомную ДНК клеток зародышей, но у которых невозможны дальнейшая самостоятельная репликация и выживание животных [25, 26].

В ДНК инфицируемых ретровирусом клеток в отличие от способа микроинъекций интегрирует, как правило, один провирус [19, 25, 27]. Однако возможно проникновение вируса более чем в одну из клеток зародыша. В этом случае места локализации провируса в геноме разных клеток зародыша будут различными. Таким образом, рождающиеся особи будут мозаичными прежде всего по наличию в геноме последовательностей провируса, а, возможно, и по месту их интеграции. Лишь последующее скрещивание с отбором трансгенных особей позволяет получить сублинии животных, содержащие во всех своих тканях чужеродную ДНК [28].

Эффективность этой методики получения трансгенных животных такова: при достаточно высоком титре вируса в среде (порядка $5 \cdot 10^7$ или выше) от 10 до 50 % рождающихся особей содержат в части своих клеток (по данным работы [25] — в среднем 20 % клеток) уникальные последовательности провируса [19]. У примерно 50 % таких «частично» трансгенных животных эти последовательности имеются в половых клетках и передаются потомству. Вероятность последнего события находилась у разных особей, согласно данным [28], в пределах от 1 до 40 %. К достоинствам данного метода трансгеноза следует отнести тот факт, что копия чужеродных генов в геноме трансгенных животных близка к физиологической. Это позволяет рассчитывать на соответствующий уровень экспрессии чужеродных генов. Применение ретровирусов в геномной инженерии млекопитающих, по-видимому, особенно оправданно в случаях работы с такими видами животных, микроинъекции в пронуклеусы зигот у которых технически трудно осуществимы.

Использование трансформированных эмбриональных стволовых клеток для получения трансгенных животных. При этом сама трансформация клеток проводится *in vitro* с применением всего арсенала методов генетической инженерии соматических клеток (включая ретровирусы) [19, 29—31]. Данный метод позволяет осуществлять предварительную селекцию эмбриональных стволовых клеток с отбором клонов, удовлетворяющих требованиям экспериментатора. Сколь ценной является такая возможность, показано в работе [29], где разработан метод селекции эмбриональных стволовых клеток, у которых произошла гомологичная рекомбинация чужеродной ДНК и таким образом создана стратегия получения трансгенных животных с мутацией любого необходимого исследователю гена.

Полученные трансформированные эмбриональные стволовые клетки используют для создания химер [19]. После трансплантации бластоцист рождаются химерные особи, часть клеток которых содержит чужеродную ДНК. Как и в случае применения ретровирусов, дальнейшее скрещивание позволяет отобрать полностью трансгенных животных.

Особенности экспрессии трансгенов в тканях млекопитающих. Закономерности экспрессии трансгенов меньше зависят от способа их введения в зародыши, хотя при использовании ретровирусных векторов есть своя специфика, о которой будет сказано ниже. Естественно, что для функционирования введенных в геном животных генов решающее значение имеют элементы, управляющие работой генов: прежде всего 5'- и 3'-фланкирующие последовательности. При правильной их комбинации в случае использования сильных промоторов 50—90 % трансгенных животных экспрессируют вводимые гены [3, 13, 15, 16, 22, 32]. Адекватно подобранные промоторно-регуляторные последовательности позволяют обеспечить требуемую экспериментатору тканеспецифичность, а при необходимости и стадийспецифичность экспрессии вводимых клонированных генов [15, 22, 32—35], обеспечить возможность внешнего управления работой трансгена с помощью введения определенных индукторов [22].

Уровень экспрессии трансгена у различных сублиний трансгенных животных мог заметно варьировать, по-видимому, вследствие двух причин: «эффекта положения» чужеродного гена в геноме, а также из-за различий в копиях этого гена. Данные ряда авторов [35, 36] и

наши эксперименты с *v-sis*-онкогеном свидетельствуют о наличии положительной связи между числом интегрировавшихся в геном копий гена и его экспрессией. В то же время в ряде работ такой зависимости не обнаружено [13, 22, 37], и этот вопрос нуждается в дальнейшем анализе. Нельзя исключить того, что проявлению эффекта дозы гена мешает эффект их положения.

Так или иначе, размах вариабельности экспрессии для ряда эукариотических промоторов у трансгенных животных находился в пределах от 0,1 до 250 % свойственной этим промоторам нормы [34] и даже 10—1 000 % [38, 39]. По количественному уровню генопродукта, например, по содержанию гормона роста человека при использовании соответствующего гена в сочетании с промотором металлотнионинового гена *I* мыши в наших экспериментах на мышах диапазон вариабельности лежал в пределах от 5 до 1 700 нг/мл [15], в работе [22] верхний предел находился еще выше и составлял 64 000 нг/мл без специальной индукции экспрессии.

В тканях трансгенных животных, как показали, в частности, и наши исследования [15, 16, 18, 40], могут успешно функционировать (в комбинации с вирусными или эукариотическими промоторами) гены любого происхождения: бактериальные, вирусные и эукариотические, а также кДНК-копии этих генов. Причем вследствие иммунологической толерантности у трансгенных животных не образуется антител на чужеродные генопродукты [41].

Экспрессии трансгенов в ряде случаев мешало лишь присутствие во вводимой ДНК последовательностей прокариотической векторной ДНК [32, 42].

В нескольких работах на потомстве трансгенных животных было установлено так называемое явление геномного импринтинга, при котором на экспрессию гена может заметно влиять его происхождение: получен он от трансгенного самца или от такой же самки. Картина метилирования трансгена при этом оказывалась различной [43—45]. Насколько этот феномен является распространенным, еще предстоит исследовать.

Экспрессия трансгенов, введенных в геном животных в составе ретровирусных векторов, обладает своими особенностями. Если интеграция ретровируса в геном зародышей происходит на ранних стадиях развития, то транскрипция с ретровирусных промоторов подавляется, что, вероятно, является следствием метилирования [27, 46]. Заметим, что при инфицировании постимплантационных зародышей подобного явления не наблюдается [46]. В то же время у внутренних промоторов способность функционировать, по-видимому, сохраняется вне зависимости от сроков инфицирования [19, 28].

Рассмотрим далее возможное побочное **отрицательное действие на организм вводимой в геном зародышей чужеродной ДНК**. Здесь прежде всего следует упомянуть явление инсерционного мутагенеза. Вследствие достаточно случайного, по-видимому, характера интеграции вводимых ДНК около 5—20 % случаев трансгеноза сопровождаются нарушением функционирования тех генов, в районы локализации которых вторгается трансген [19, 47]. Чаще всего имеет место рецессивный мутагенез, отчетливо проявляющийся лишь у гомозигот в виде зиготических и эмбриональных леталей [48—50], а также различных дефектов развития [51, 52]. Однако возможно появление и доминантных мутаций, вызывающих доминантные летали [52, 53] и нарушения сперматогенеза [54].

Исследования показали, что мутагенное действие чужеродной ДНК обусловлено, в частности, тем, что хромосомная ДНК в месте интеграции трансгена может подвергаться заметным перестройкам: делециям, дупликациям и межхромосомным транслокациям [50, 53, 54]. Теоретически возможно представить ситуацию, при которой за счет промотора трансгена или вследствие происшедшей перестройки генома произойдет незапланированная активация какого-либо из клеточных генов, что

также может нести ущерб организму, особенно если это окажется какой-либо из онкогенов. Однако степень этой опасности пока еще экспериментально не оценена.

Итак, теперь можно суммировать те основные барьеры, которые делают невозможным сейчас непосредственное применение методов генной инженерии животных в генотерапии ранних зародышей человека (например, для лечения доминантных наследственных заболеваний или в случаях высокой вероятности появления плода, гомозиготного по рецессивному мутантному признаку). Таковыми являются: 1) инсерционный мутагенез; 2) неконтролируемая копияность трансгена (в случае микроинъекций), что может влиять на экспрессию гена; 3) значительность вариабельности экспрессии вследствие случайного характера процесса интеграции в геном; 4) мозаицизм (при использовании ретровирусов, а также в ряде случаев и при микроинъекциях); 5) дефектный ген не устраняется из генома, груз наследственной патологии в популяции из-за возможности инсерционного мутагенеза возрастает; 6) опасность активации клеточных генов.

Требуется, по-видимому, дальнейшее совершенствование методов генной инженерии животных, прежде чем их можно будет использовать в терапии наследственных заболеваний на уровне зародышей. Существенно облегчило бы ситуацию решение проблемы интеграции трансгена путем гомологической рекомбинации. Именно этот путь не только позволил бы вводить «здоровый» ген, но одновременно элиминировать мутантный его вариант, оздоравливая таким образом и генофонд популяции.

Может ли генная инженерия зародышей, кроме констатации имеющейся ситуации, накопления опыта изучения закономерностей функционирования и фенотипических проявлений трансгенов, оказаться существенно полезной для развития генной терапии? Мы полагаем, что наиболее весомым вкладом генной инженерии млекопитающих будет создание адекватных моделей для разработки методов генотерапии (как впрочем и терапии) любой патологии, которая может являться объектом данного способа лечения. Прежде чем продемонстрировать эти возможности генной инженерии животных, полезно рассмотреть тот круг заболеваний, который может быть доступен генотерапии [55]. Будет, по-видимому, правильным допустить, что любые нарушения генома (как наследуемые, так и не передающиеся по наследству), включающие ретровирусные инфекции, соматические мутации, в том числе сопровождающиеся потерей активности или, наоборот, активацией работы жизненно важных генов (в их числе — онкогены), могут являться объектом генной терапии. Эксперименты на трансгенных животных показали, что в ряде случаев даже при утрате определенных тканей или клеток, синтезирующих, например, какой-либо гормон, возможна заместительная генная терапия, при которой требуемый генопродукт будет синтезироваться в других тканях [3, 15, 22, 33].

Широкие возможности генной инженерии животных для моделирования различных патологических состояний человека связаны с достаточно большим разнообразием **методов создания соответствующих генетических моделей (линий животных)**.

Во-первых, как уже отмечалось выше, введение генов позволяет получать трансгенных животных с заметным избытком генопродукта в тканях по сравнению с нормой и на таких моделях разрабатывать способы подавления экспрессии чрезмерно активных генов.

Во-вторых, с помощью введения в геном функционирующих анти-смысловых конструкторов можно избирательно подавлять экспрессию требуемых генов, создавая в тканях дефицит соответствующих генопродуктов [56—58]. Как и в первом случае, у таких животных трансген (при наличии достаточно сильного промотора) будет эффективен уже в гетерозиготном состоянии. Наши первые экспериментальные результаты свидетельствуют о большой перспективности такого подхода (см. ниже).

В-третьих, существование явления инсерционного мутагенеза позволяет отбирать и создавать соответствующие линии животных, имеющих мутации по определенным идентифицируемым генам [2, 19, 47]. С другой стороны, для генов, имеющих доминантные мутации, можно такие мутации создавать у гена *in vitro*, после чего вводить его в геном животных, как это было сделано с про- α -1(I)-коллагеновым геном [59]. И, как уже отмечалось выше, используя эмбриональные стволовые клетки, сейчас можно, в принципе, создавать животных с мутацией любого клонированного гена [29].

И, наконец, в-четвертых, для создания моделей с элиминацией или повреждением определенного типа клеток или тканей в организме можно использовать так называемые токсигены, которые при экспрессии в клетках либо сами вырабатывают токсин, либо их генопродукт (фермент) способен превращать нетоксическое соединение в токсин, что и приводит к самоубийству или повреждению клетки-хозяина [60]. Этот подход уже был успешно осуществлен с геном А-субъединицы дифтерийного токсина. Одной молекулы этого токсина и соответственно одной молекулы РНК-транскрипта на клетку достаточно, по-видимому, для индукции клеточной гибели [60, 61]. Не менее эффективным оказался в качестве токсигена и модифицированный ген А-цепи рибина [62].

Используя такие гены в сочетании с различными тканеспецифическими промоторами, удалось получить животных с недоразвитием поджелудочной железы и элиминацией ацинарных клеток, синтезирующих инсулин [63]; с нарушениями развития хрусталика (микрофтальмия, катаракта) [62, 64]; с повреждениями гипофиза и карликовостью вследствие гибели клеток, продуцирующих гормон роста [65].

Иванс и др. [66] применили другой подход, который позволяет элиминировать требуемые клетки уже у взрослых животных. В качестве токсигена ими был взят ген тимидинкиназы вируса герпеса в сочетании с промотором легкой цепи IgG и энхансером тяжелой цепи IgG. Когда трансгенным животным вводили нетоксический предшественник (производное дезоксиуридина) — ганцикловир (синоним — ацикловир), то вирусная тимидинкиназа была способна (в отличие от клеточной) фосфорилировать это соединение, что в конечном итоге приводило к подавлению пролиферации клеток-мишеней. В итоге трансгенные животные быстро приходили в состояние контролируемого иммунодефицита, обратимо утрачивая более 99 % тимоцитов. Существенный дефицит клеток возникал в селезенке и тимусе [60, 66].

В заключение приведем сводку основных патологических состояний человека, которые уже удалось смоделировать на трансгенных животных, используя указанные выше подходы.

1. Наследственные болезни: синдром Дауна [67]; синдром Леш-Нихана [68, 69], амилоидоз [70].

2. Патология сердечно-сосудистой системы [16, 71].

3. Нарушения липидного обмена, связанные с развитием атеросклероза. Эта модель была получена нами совместно с Отделом биохимии НИИЭМ АМН СССР на кроликах, в геном которых был введен бессмысловый конструктор, созданный А. П. Перевозчиковым на основе гена аполипопротеина А1 человека [72].

4. Различные тканеспецифические злокачественные новообразования, индуцируемые введением в геном трансгенных животных онкогенов *c-myc* [72, 73], *OB40* [74], *ras* [75, 76], *v-sis* [16], *mos* [71], *tat*-гена вируса СПИД [77].

5. Ретровирусные заболевания (СПИД) [78].

6. Заболевания эндокринной системы: диабет [79], зависимость от соматотропина карликовость [15], гигантизм [14, 15, 22].

7. Нарушения развития или повреждение определенных органов или тканей: глаз [62, 64], поджелудочной железы [63], иммунной системы [60, 66], гипофиза [65].

8. Другие заболевания, включая гепатит новорожденных [80], устойчивость к определенным химиотерапевтическим средствам, анемия новорожденных и др. [81].

Из этого краткого перечня видно, сколь широкие возможности для моделирования заболеваний человека уже реализованы в экспериментах на трансгенных животных. Анализ этих моделей позволяет существенно углубить понимание молекулярных механизмов возникновения и развития данных патологических состояний. Следует заметить, что ряд моделей по пунктам 2, 3, 4 и 6 был впервые создан в Отделе эмбриологии НИИЭМ АМН СССР.

Несомненно, что использование трансгенных животных для разработки методов генной терапии (и терапии вообще) позволит добиться дальнейшего прогресса в лечении всех важнейших заболеваний человека.

POSSIBILITIES OF USING THE ADVANCES OF MAMMALIAN GENE ENGINEERING FOR ELABORATION OF GENE THERAPY METHODS

B. L. Vaisman, A. P. Dyban

Institute of Experimental Medicine,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

Summary

Evaluation of the prospects to use gene engineering for development of gene therapy is presented on the basis of the authors' research and data from the literature dealing with gene engineering of mammals. Contemporary methods to obtain transgenic animals are regarded with respect to the peculiarities of integration into their genome and expression of foreign genes as well as to the existing negative effects of foreign DNA introduction into the embryonic genome. Wide possibilities opened by animal gene engineering to elaborate accurate genetic models of different pathological human states which may be used for various experiments in the area of gene therapy are emphasized.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дыбан А. П., Городецкий С. И. Интродукция в геном млекопитающих чужеродных генов. Пути и перспективы // Молекуляр. и клеточ. аспекты биотехнологии.— Л.: Наука, 1986.— С. 82—97.
2. Jaenisch R. Transgenic animals // Science.— 1988.— 240, N 4858.— P. 1468—1474.
3. Возможность получения животных — продуцентов биологически активных препаратов с помощью метода микроинъекций клонированных генов в яйцеклетки / Б. Л. Вайсман, Т. В. Капелинская, С. И. Городецкий, А. П. Дыбан // Антибиотики и химиотерапия.— 1988.— 33, № 2.— С. 154—158.
4. Hammer R. E., Palmiter R. D., Brinster R. L. Partial correction of a mouse hereditary disorder by introducing a new gene into the germ line // Nature.— 1984.— 311, N 5981.— P. 65—67.
5. Correcting an immune-response deficiency by creating E^k gene transgenic mice / M. le Meur, P. Gerlinger, C. Benoist, D. Mathis // Ibid.— 1985.— 316, N 6023.— P. 38—42.
6. Functional expression of a microinjected E^d gene in C57BL/6 transgenic mice / K. Yamamura, H. Kikutani, V. Folsom et al. // Ibid.— P. 67—69.
7. Constantini F., Chada K., Magram J. Correction of murine β -thalassemia by gene transfer into the germ line // Science.— 1986.— 233, N 4769.— P. 1192—1194.
8. The hypogonadal mouse: reproductive functions restored by gene therapy / A. J. Mason, S. L. Pitts, K. Nikolics et al. // Ibid.— 234, N 4782.— P. 1372—
9. Expression of a myelin basic protein gene in transgenic shiverer mice: correction of the dysmyelinating phenotype / G. Readhead, B. Popko, N. Takahashi et al. // Cell.— 1987.— 48, N 4.— P. 703—712.
10. Marx J. L. Gene-Watchers' feast served up in Toronto // Science.— 1988.— 242, N 4875.— P. 32—33.
11. Получение трансгенных кроликов и мышей, содержащих ген гормона роста быка / К. Г. Газарян, Л. Е. Андреева, И. А. Серова и др. // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.— 1988.— № 10.— С. 23—26.
12. Получение трансгенных кроликов, содержащих и экспрессирующих ген соматотропина человека / Г. Н. Еликолов, В. И. Захарченко, М. А. Грашук и др. // Докл. АН СССР.— 1988.— 299, № 5.— С. 1246—1249.

13. Expression of a microinjected immunoglobulin gene in the spleen of transgenic mice / R. L. Brinster, K. A. Ritchie, R. E. Hammer et al. // *Nature*.—1983.—**306**.— P. 332—336.
14. Особенности фенотипической экспрессии у трансгенных мышей гена гормона роста человека и гена тимидинкиназы вируса герпеса / Б. Л. Вайсман, С. П. Городецкий, П. Б. Архангельская и др. // *Онтогенез*.—1984.—**15**, № 4.— С. 429.
15. Стимуляция и торможение роста мышей, несущих ген гормона роста человека / С. П. Городецкий, А. П. Дыбан, Б. Л. Вайсман и др. // *Бюл. экперим. биологии и медицины*.—1986.—**102**, № 9.— С. 339—342.
16. Действие *с-sis* онкогена на трансгенных мышей / Б. Л. Вайсман, С. Л. Колобков, А. В. Сорокин и др. // *Докл. АН СССР*.—1987.—**294**, № 5.— С. 1225—1228.
17. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs / R. L. Brinster, H. Y. Chen, M. E. Trumbauer et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1985.—**82**, N 13.— P. 4438—4442.
18. Трансформация генома мышей с помощью микроинъекций гена тимидинкиназы вируса герпеса в оплодотворенные яйцеклетки / Б. Л. Вайсман, Г. Ф. Голынский, А. С. Каледин и др. // *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология*.—1986.— № 3.— С. 28—34.
19. Hogan B., Constantini F., Lacy E. Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor, 1986.— 331 p.
20. Wilkie T. M., Brinster R. L., Palmiter R. D. Germline and somatic mosaicism in transgenic mice // *Devel. Biol.*—1986.—**118**, N 1.— P. 9—18.
21. A foreign β -globin gene in transgenic mice integration at abnormal chromosomal positions and expression in inappropriate tissues / E. Lacy, S. Roberts, E. P. Evans et al. // *Cell*.—1983.—**34**, N 2.— P. 343—358.
22. Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice / R. D. Palmiter, G. Norstedt, R. E. Gelinis et al. // *Science*.—1983.—**222**, N 4625.— P. 809—814.
23. Chromosomal position and activation of retroviral genomes inserted into the germ line of mice / R. Jaenisch, D. Jahner, P. Nobis et al. // *Cell*.—1981.—**24**.— P. 519—529.
24. Introduction of a selectable gene into different animal tissue by a retrovirus recombinant vector / C. Stuhlmann, R. Cone, C. Mulligan, R. Jaenisch // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1984.—**81**.— P. 7151—7155.
25. Rabenstein J. L., Nicolas J.-F., Jacob F. Introduction of genes into preimplantation mouse embryos by use a defective recombinant retrovirus // *Ibid.*—1986.—**83**, N 2.— P. 366—368.
26. Томлина Н. В., Кавсан В. М. Перенос генов в клетки млекопитающих с помощью ретровирусных векторов // *Биополимеры и клетка*.—1989.—**5**, № 2.— С. 26—36.
27. Insertion of the bacterial *gpt* gene into the germ line of mice by retroviral infection / D. Jahner, K. Haase, R. Mulligan, R. Jaenisch // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1985.—**82**, N 20.— P. 6927—6931.
28. Expression of retroviral vectors in transgenic mice obtained by embryo infection / C. L. Stewart, S. Scutze, M. Vanek, E. F. Wagner // *EMBO J.*—1987.—**6**, N 2.— P. 383—388.
29. Mansour S., Thomas K. R., Capocchi M. R. Disruption of the protooncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes // *Nature*.—1988.—**336**, N 6197.— P. 348—352.
30. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector / E. Robertson, A. Bradly, M. Kuehn, M. Evans // *Ibid.*—1986.—**323**, N 6087.— P. 445—448.
31. Zimmer A., Gruss P. Productoin of chimaeric mice containing embryonic stem cells carrying a homocobox Hox 1.1 allele mutated by homologous recombination // *Ibid.*—1989.—**338**, N 6211.— P. 150—153.
32. Erythroid-specific expression of human β -globin genes in transgenic mice / T. M. Townes, J. B. Lingrel, H. Y. Chen et al. // *EMBO J.*—1985.—**4**, N 7.— P. 1715—1723.
33. Specific expression of an elastase-human growth hormone fusion gene in pancreatic acinar cells of transgenic mice / D. M. Ornitz, R. D. Palmiter, R. E. Hammer et al. // *Nature*.—1985.—**313**, N 6003.— P. 600—609.
34. Developmental regulation of α -fetoprotein genes in transgenic mice / R. Krumlauf, R. E. Hammer, S. M. Tilgman, R. L. Brinster // *Mol. and Cell. Biol.*—1985.—**5**, N 7.— P. 1639—1648.
35. The structure of the human *CD2* gene and its expression in transgenic mice / G. Lang, D. Wotton, M. J. Owen et al. // *EMBO J.*—1988.—**7**, N 6.— P. 1675—1682.
36. Tissue-specific and cell surface expression of human major histocompatibility complex class heavy (HLA-B7) and light (β_2 -microglobulin) chain genes in transgenic mice / J. W. Chamberlain, J. A. Nolan, P. L. Conrad et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1988.—**85**, N 20.— P. 7690—7694.
37. Davis B. P., McDonald R. J. Limited transcription of rat elastase I transgene repeats in transgenic mice // *Genes and Devel.*—1988.—**2**, N 1.— P. 13—22.
38. Shani M. Tissue-specific expression of rat myosin light-chain 2 gene in transgenic mice // *Nature*.—1985.—**314**, N 6008.— P. 283—286.
39. Expression of human HPRT in the central nervous system of transgenic mice / J. T. Stout, H. Y. Chen, J. Brennard et al. // *Ibid.*—**317**, N 6034.— P. 250—252.
40. Трансформация мышей прокариотическим геном дигидрофолатредуктазы / А. В. Титомаров, О. Н. Апреликова, Б. Л. Вайсман, Н. В. Томлина // *Цитология*.—1985.—**27**, № 12.— С. 1374—1379.

41. Expression of a microinjected porcine class I major histocompatibility complex gene in transgenic mice / W. I. Frels, J. A. Bluestone, R. J. Hodes et al. // *Science*.— 1985. — 228, N 4699.— P. 577—580.
42. Introduction of mouse C_e genes into *Cos-7* cells and fertilized mouse eggs / K. Yamamura, T. Miki, N. Suzuki et al. // *J. Biochem.*— 1985.— 97, N 1.— P. 333—339.
43. Degree of methylation of transgenes is dependent on gamete origin / C. Sapienza, A. C. Peterson, J. Possant, R. Balling // *Nature*.— 1987.— 328, N 6127.— P. 251—254.
44. Swain J. L., Stewart T. A., Leder P. Parental legacy determines methylation and expression of an autosomal transgene: a molecular mechanism for parental imprinting // *Cell*.— 1987.— 50, N 5.— P. 719—727.
45. Genomic imprinting determines methylation of parental alleles in transgenic mice / W. Reik, A. Collick, M. L. Norris et al. // *Nature*.— 1987.— 328, N 6127.— P. 248—251.
46. Jaenisch R. Retroviruses and embryogenesis // *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*— 1982.— 363, N 11.— P. 1267—1271.
47. Gridley T., Soriano P., Jaenisch R. Insertional mutagenesis in mice // *Trends Genet.*— 1987.— 3, N 6.— P. 162—166.
48. Prenatal lethality in mice homozygous for human growth hormone gene sequences integrated in the germ line / E. F. Wagner, L. Covarrubias, T. A. Stewart, B. Mintz // *Cell*.— 1983.— 35, N 3.— P. 647—655.
49. Löhler J., Timpl R., Jaenisch R. Embryonic lethal mutation in mouse collagen I gene cause rupture of blood vessels and is associated with erythropoietic and mesenchymal cell death // *Ibid.*— 1984.— 38, N 2.— P. 597—607.
50. Cellular DNA rearrangements and early developmental arrest caused by DNA insertion in transgenic mouse embryos / L. Covarrubias, Y. Nishida, M. Terao et al. // *Mol. and Cell. Biol.*— 1987.— 7, N 6.— P. 2243—2247.
51. An inherited limb deformity created by insertional mutagenesis in a transgenic mouse / R. P. Woychik, T. A. Stewart, L. G. Davis et al. // *Nature*.— 1985.— 318, N 6041.— P. 36—40.
52. Tissue-specific expression in transgenic mice of a fused gene containing RSV terminal sequences / P. A. Overbeek, S.-P. Lai, K. R. van Quill, H. Westphal // *Science*.— 1986.— 231, N 1745.— P. 1574—1577.
53. Mahon K. A., Overbeek P. A., Westphal H. Prenatal lethality in a transgenic mouse is the result of a chromosomal translocation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 1988.— 85, N 4.— P. 1165—1168.
54. Wilkie T. M., Palmiter R. D. Analysis of the integrant in Myk-103 transgenic mice in which males fail to transmit the integrant // *Mol. and Cell. Biol.*— 1987.— 7, N 5.— P. 1646—1655.
55. Кордюм В. А. Задачи и проблемы генной терапии // *Биополимеры и клетка*.— 1989.— 5, № 2.— С. 5—16.
56. Bevilacqua A., Erickson R. P., Hienber V. Antisense RNA inhibits gene expression in mouse preimplantation embryos—lack of double-stranded RNA «melting» activity // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 1988.— 85, N 3.— P. 831—835.
57. Expression of injected HPRT mini-gene DNA in mouse embryos and its inhibition by antisense DNA / A. Ao, M. Monk, R. Lovell-Badge, D. W. Melton // *Development*.— 1988.— 104, N 3.— P. 465—471.
58. Daugherty B. L., Hotta Kunimoto, Kumar C. Antisense RNA: effect of ribosome binding sites, target location, size and concentration on the translation of specific in RNA molecules // *Gene analysis techniques*.— 1989.— 6, N 1.— P. 1—16.
59. Perinatal lethal osteogenesis imperfecta in transgenic mice bearing an engineered mutant pro- α_1 [I]-collagen gene / A. Stacey, I. Bateman, T. Choi et al. // *Nature*.— 1988.— 332, N 6160.— P. 131—136.
60. Evans G. A. Dissection mouse development with toxicogenics // *Genes and Devel.*— 1989.— 3, N 3.— P. 259—264.
61. Beddington R. S. P. Toxicogenics: strategic cell death in the embryo // *Trends Genet.*— 1988.— 4, N 1.— P. 1—2.
62. Lens specific expression of recombinant ricin induces developmental defects in the eyes of transgenic mice / C. P. Landel, J. Zhao, D. Bok, G. A. Evans // *Genes and Devel.*— 1988.— 2, N 9.— P. 1168—1178.
63. Cell lineage ablation in transgenic mice by cell-specific expression of a toxin gene / R. D. Palmiter, R. R. Behringer, C. J. Quaife et al. // *Cell*.— 1987.— 50, N 3.— P. 435—443.
64. Genetic ablation: targeted expression of a toxin gene causes microphthalmia in transgenic mice / M. L. Breitman, S. Clapoff, J. Rossant et al. // *Science*.— 1987.— 238, N 4833.— P. 1563—1565.
65. Dwarf mice produced by genetic ablation of growth hormone-expressing cells / R. R. Behringer, L. S. Matheus, R. D. Palmiter et al. // *Genes and Devel.*— 1988.— 2, N 4.— P. 453—461.
66. Targeting of an inducible toxic phenotype in animal cells / E. Borelli, R. Heyman, M. Hsi, R. M. Evans // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 1988.— 85, N 20.— P. 7572—7576.
67. Down's syndrome: abnormal neuromuscular junction in tongue of transgenic mice with elevated levels of human Cu/Zn-superoxide dismutase / K. B. Avraham, M. Schickler, D. Sapoznikov, Y. Groner // *Cell*.— 1988.— 54, N 6.— P. 823—829.

68. *HPRT-deficient* (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells / M. Hooper, K. Hardly, A. Handyside et al. // *Nature*.— 1987.— 326, N 6110.— P. 292—295.
69. *A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice* / M. R. Kuehn, A. Bradley, E. J. Robertson, M. J. Evans // *Ibid.*— P. 295—298.
70. *Generation of transgenic mice producing a human transthyretin variant: a possible mouse model for familial amyloidotic polyneuropathy* / H. Sasaki, T. Shigenobu, M. Nakazato et al. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*— 1986.— 139.— P. 794—798.
71. *Получение трансгенных мышей, содержащих гены из семейства mos* / Б. М. Вайсман, Е. Р. Забаровский, М. К. Нурбеков и др. // Структура и функции клеточного ядра: Тез. докл. 9-го Всесоюз. симпози. (Черноголовка, 25—27 мая 1987).— Черногловка, 1987.— С. 103.
72. *Stewart T. A., Pattengale P. K., Leder Ph. Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MTV/myc fusion genes* // *Cell*.— 1984.— 38, N 3.— P. 627—637.
73. *Consequences of widespread deregulation of the c-myc gene in transgenic mice: multiple neoplasms and normal development* / A. Leder, P. K. Pattengale, A. Kuo et al. // *Ibid.*— 1986.— 45, N 4.— P. 485—495.
74. *Transgenic mice harboring SV 40 T-antigen genes develop characteristic brain tumors* / R. L. Brinster, H. Y. Chen, A. Messing et al. // *Ibid.*— 1984.— 37, N 2.— P. 367—379.
75. *Pancreatic neoplasia induced by ras expression in acinar cells of transgenic mice* / C. J. Quatife, C. A. Pinkert, D. M. Ornitz et al. // *Ibid.*— 1987.— 48, N 6.— P. 1023—1034.
76. *Groner B., Schonberger C.-A., Andres A. C. Targeted expression of the ras and myc oncogenes in transgenic mice* // *Trends Genet.*— 1987.— 3, N 11.— P. 306—308.
77. *The HIV tat gene induces dermal lesions resembling Kaposi's sarcoma in transgenic mice* / J. Vogel, S. H. Hinrichs, R. K. Reynolds et al. // *Nature*.— 1988.— 335, N 6191.— P. 606—611.
78. *Development of disease and virus recovery in transgenic mice containing HIV proviral DNA* / J. M. Leonard, J. W. Ambramszuk, D. S. Pezen et al. // *Science*.— 1988.— 242, N 4886.— P. 1665—1670.
79. *Diabetes in transgenic mice resulting from over-expression of class I histocompatibility molecules in pancreatic β -cells* / J. Allison, I. L. Campbell, G. Morahan et al. // *Nature*.— 1988.— 333, N 6173.— P. 529—533.
80. *Neonatal hepatitis induced by α_1 -antitrypsin: a transgenic mouse model* / M. J. Dyaico, S. G. N. Grant, K. Felts et al. // *Science*.— 1988.— 242, N 4882.— P. 1409—1412.
81. *Cuthbertson R. A., Klinthworth G. K. Transgenic mice—a gold mine for furthering knowledge in pathobiology* // *Lab. Invest.*— 1988.— 58, N 5.— P. 484—502.

НИИ эксперим. медицины АМН СССР, Ленинград

Получено 13.06.89

УДК 577.1

В. А. Кордюм

ВОЗМОЖНОСТИ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ МАССОВЫХ ПАТОЛОГИЙ

Анализируются возможности генной терапии для лечения основных массовых патологий человека — атеросклероза, злокачественных опухолей, инфекционных болезней и диабета. В своей основе генная терапия делится на два направления: 1) исправление генного дефекта и 2) генная компенсация функции. Первое основано на прецизионном замещении дефектного гена или его фрагмента и требует обязательного знания деталей повреждения. Оно чаще всего подразумевается при упоминании о генной терапии но относится почти исключительно к классическим наследственным болезням, у которых причиной болезни является дефект конкретного структурного гена. Второе направление предусматривает введение гена, призванного компенсировать ослабленную (или в общей форме измененную) функцию под специальной регуляцией. В этом случае необязательно знание конкретного генного дефекта, вызвавшего патологию.

Поскольку в основе массовых патологий чаще всего лежат дефекты вызванные неизвестными нарушениями регуляции экспрессии неповрежденного структурного гена, их можно парировать по принципу генной компенсации функции. Приводится общая схема генной терапии основных массовых патологий и конкретные варианты ее поясняющие. Анализируется состояние работ по генной терапии основных массовых патологий.

Интенсивные работы в области генной терапии позволяют сегодня ставить вопрос о реальном круге задач, который не ограничивается выбрасными в качестве натуральных (т. е. проводимых на человеке), но тем