

- pero, S. Specker, D. Matteucci et al. // Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.—1988.—188, N 3.—P. 353—363.
84. *Antitumor* activity of regional lymph node lymphocytes in patients with lung cancer / H. Yaita, K. Yasumoto, A. Nagashima et al. // J. Surg. Oncol.—1988.—38, N 3.—P. 165—172.
 85. *Hartwig M.* Restauration des Immunstatus durch Interleukin-2 // Alternforsch.—1988.—43, N 3.—S. 133—136.
 86. *Interleukin-2* and aging: decreased interleukin-2 production in healthy older people does not correlate with reduced helper cell numbers or antibody response to influenza vaccine and is not corrected *in vitro* by thymosin α_1 / W. B. Ershler, A. L. Moore, K. Roessner, G. E. Ranges // Immunopharmacology.—1985.—10, N 1.—P. 11—17.
 87. *Изучение* экспрессии экзогенного гена инсулина человека, находящегося под контролем регуляторной зоны *hsp70* гена дрозофилы в фибробластах человека / Л. Н. Неборачко, Л. Л. Лукаш, И. С. Варзанова, В. А. Кордюм // Биополимеры и клетка.—1990.—6, № 1.—С. 88—91.
 88. *Shennan K. I., Docherty K.* Expression of normal and mutant human pre-pro-insulins in *Xenopus* oocytes // Biochimie.—1988.—70, N 1.—P. 99—107.
 89. *Исследование* возможности экспрессии экзогенного гена инсулина человека в культивируемых фибробластах млекопитающих / Л. Н. Неборачко, Л. Л. Лукаш, Б. М. Трояновский и др. // Биополимеры и клетка.—1989.—5, № 2.—С. 58—61.
 90. *Экспрессия* гена инсулина в культивируемых клетках млекопитающих / Л. Л. Лукаш, Л. Н. Неборачко, Е. М. Сухорада и др. // Там же.—1990.—6, № 1.—С. 82—87.
 91. *Introns* increase transcriptional efficiency in transgenic mice / R. L. Brinster, J. M. Allen, R. R. Behringer et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1988.—85, N 3.—P. 834—840.
 92. *Tissue-specific* expression of transfected human insulin genes in pluripotent clonal rat insulinoma lines induced during passage *in vivo* / O. D. Madsen, C. Andersen, B. Michelsen et al. // Ibid.—N 18.—P. 6652—6656.
 93. *Enzo Biochem.* (New York, NY) working on method of gene therapy to inhibit growth of viruses // Appl. Genet. News.—1987.—8, N 1.—P. 8—9.
 94. *Corcoran E.* Gene therapy in gestation. Three companies hope to turn it into medical reality // Sci. Amer.—1988.—259, N 5.—P. 98—98B.
 95. *Two* US companies move into gene therapy // Drug License Opport.—1988.—10, N 3.—P. 104.

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

Получено 16.05.89

УДК 616-092.612.6.05:575.113.1:577.21

В. С. Гайцхоки

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЧЕЛОВЕКА И ПРОБЛЕМЫ ИХ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

В работе рассмотрены современные представления о первичных механизмах, лежащих в основе недостаточности белков — генных продуктов при ряде моногенных наследственных заболеваний. Проведен анализ молекулярных основ генетической и фенотипической гетерогенности моногенных болезней, которая может быть обусловлена разнообразными внутри- или внесгенными мутациями, вызывающими полные либо частичные блоки экспрессии генов на различных уровнях этого сложного и многоступенчатого процесса (нарушения информационной специфичности кодирующих последовательностей гена, недостаточность транскрипции, блоки созревания мРНК, трансляционная недостаточность мРНК, генетически детерминированные блоки созревания и внутриклеточного перемещения белков). Проблема генной терапии наследственных болезней обсуждается в связи с их генетической и фенотипической гетерогенностью.

В основе быстрого накопления информации о молекулярной природе генных дефектов, приводящих к фенотипическим проявлениям наследственной патологии, лежит развитие арсенала методических подходов, дающих возможность сравнительного структурного и функционального анализа нуклеотидных последовательностей нормальных и мутантных генов и аномалий их экспрессии в модельных (клеточных и бесклеточных) системах. В литературе имеется ряд обзоров, в которых описана общая стратегия исследования мутантных генов как после их клонирования в бактериальных векторах, так и непосредственно в составе геномной ДНК, а также — ДНК-зондовой диагностики наследственных болезней [1—5]. В задачи нашего сообщения входит, в основном, рассмотрение молекулярных основ, обусловленных недостаточностью экспрессии генов, их гетерогенности на уровнях генных мутаций

и патологического фенотипа, общих принципов их генной коррекции.

Фенотипически гетерогенность этой группы заболеваний (в пределах каждой нозологической формы) проявляется как количественная недостаточность генных продуктов (мРНК и белков), ассоциированная с нарушениями нормальной первичной структуры этих биополимеров или не сопровождающаяся их структурными аномалиями. Условно можно выделить две группы наследственных дефицитов зрелых и функционально активных генных продуктов: 1) при полном блоке генной экспрессии речь идет о полном отсутствии белка-продукта, т. е. о «нулевой» форме наследственной патологии; 2) при частичном блоке экспрессии гена имеет место выраженный в различной степени количественный дефицит белкового продукта, имеющего, как правило, неизмененную первичную структуру — это «плюс»-форма наследственной патологии экспрессии генов. Условность этого деления связана прежде всего с ограниченной чувствительностью существующих методов детекции индивидуальных белков. При этом могут возникать трудности в дискриминации между истинными «нулевыми» формами дефицита белка и теми вариантами «плюс»-форм его недостаточности, при которых частичный блок генной экспрессии выражен в достаточно резкой степени и уровень экспрессии патологического гена составляет 1—2 % контроля или еще меньше.

В большинстве случаев в основе наследственной недостаточности экспрессии генов лежат их структурные изменения, следствием которых являются нарушения кодирующей специфичности (крупные делеции-инсерции, инверсии генов, короткие делеции-вставки со сдвигом рамки считывания при трансляции и преждевременной терминацией) или мутационные изменения структуры экспрессионных сигналов. Роль таких сигналов выполняют, как правило, относительно короткие нуклеотидные тракты, имеющие консервативную нуклеотидную последовательность. Эти блоки нуклеотидов необходимы для адекватной экспрессии генов на различных этапах этого многостадийного процесса (транскрипция, созревание мРНК из первичного транскрипта, ее транспорт в цитоплазму, трансляция мРНК, посттрансляционное созревание первичного полипептидного продукта трансляции, его внутриклеточный транспорт, секреция, интеграция в мембранные системы клетки и т. д.). Наконец, существуют наследственные блоки экспрессии генов, при которых полностью сохранена нормальная нуклеотидная последовательность этих генов и их достаточно протяженных фланкирующих участков геномной ДНК [6].

Рассмотрим основные типы наследуемых изменений структуры геномной ДНК, вызывающих патологический фенотип количественной недостаточности генной экспрессии.

Нарушения информационной специфичности кодирующих последовательностей ДНК. Одной из наиболее очевидных причин «нулевых» форм наследственных дефицитов белков являются крупномасштабные делеции, которые обычно выявляются при рестрикционном анализе неклонированной геномной ДНК с ее блот-гибридизацией по Саузерну с соответствующими ДНК-зондами. Эти делеции имеют, как правило, протяженность от нескольких сотен до нескольких тысяч нуклеотидных пар (т. н. п.) и захватывают протяженные сегменты генов, включающие отдельные экзоны или их группы, полноразмерные гены или даже кластеры сцепленных генов. Так, α -талассемия чаще всего имеет в своей основе крупные делеции, которые вовлекают либо один из двух сцепленных α -глобиновых генов, либо оба этих гена [7]. В некоторых семьях с β -талассемией также найдены делеции разной длины: от частичных делеций гена β -глобина до крупномасштабных делеций (до 10 т. п. н.), элиминирующих весь кластер генов для β -подобных глобиновых цепей [8]. В семьях с гемофилией А (дефицит фактора VIII свертывания крови) выявлены делеции, захватывающие полноразмерный ген этого белка в составе сегмента X-хромосомы длиной 80 т. п. н. [9], а также частичная делеция гена фактора VIII, имеющая длину

13 т. п. н. и удаляющая группу экзонов 15—18 [10]. Высокая частота делеционных вариантов наследственных болезней, их выраженная структурная гетерогенность характерны для протяженных генов, содержащих повторяющиеся последовательности ДНК в интронах, фланкирующих сегментах и иногда — в экзонах. В качестве примеров можно привести делеции генов дистрофина при мышечной дистрофии Дюшена — Беккера [11], генов факторов свертывания крови при гемофилиях [12, 13] и большой спектр делеционных нарушений структуры гена рецептора липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) при семейной гиперхолестеринемии [14].

Необходимо отметить, что при частичных делециях в протяженных генах, кодирующих мультидоменные белки, может наблюдаться aberrантная экспрессия гена с синтезом укороченных мРНК и, если в мРНК не нарушена фаза считывания, — укороченных белков, утративших соответствующие домены и неполноценных в функциональном отношении. В качестве примера можно привести ряд частичных делеций (протяженность от 1 до 7 т. п. н.) в гене рецептора ЛПНП в семьях с доминантной семейной гиперхолестеринемией [14]. Фенотипическим следствием таких делеций является синтез аномального рецептора с нарушениями какой-то из его функций (интеграция в клеточную мембрану, связывание липопротеидного лиганда, интернализация комплекса рецептор — лиганд и т. д.). В основе этих разнообразных делеций лежит общий механизм рекомбинации между *Alu*-повторами, несколько копий которых содержатся в интронах гена рецептора и в экзоне, кодирующем 3'-нетранслируемую зону его мРНК [14, 15]. Сходный механизм неравного кроссинговера между множественными копиями внутриинтронных повторов вызывает делеции, элиминирующие ряд экзонов в коллагеновых генах при летальной форме незавершенного остеогенеза [16]. Образующиеся при этих делециях укороченные цепи проколлагена секретируются фибробластами с низкой скоростью, аккумуляруются внутри клеток и деградируют.

Наряду с делециями протяженные inserции также могут вызывать полную инактивацию генов. Так, наличие очень длинной вставки в гене аполипопротеина А1 является причиной полной функциональной инактивации этого гена и отсутствия его белкового продукта в кровотоке больных. Описана также inserция длиной 14 т. п. н. в гене рецептора ЛПНП при семейной гиперхолестеринемии с количественной недостаточностью рецептора [17]. В ее основе лежит дупликация сегмента геномного гена, содержащего группу внутренних экзонов (экзоны 2—8), которая, в свою очередь, обусловлена рекомбинацией между внутриинтронными *Alu*-повторами. Иной механизм, по-видимому, объясняет inserционную инактивацию гена фактора VIII свертывания крови в одной из семей с гемофилией А. Внутри этого гена обнаружена вставка двух tandemных, но противоположно ориентированных копий нуклеотидной последовательности, гомологичной геномному *L1*-повтору [18]. Эта вставка фланкирована короткими А-богатыми дублицированными последовательностями, что является характерным структурным признаком интегрированных в геном мобильных элементов типа транспозонов или ретропозонов, экстракопии которых образуются и распространяются по геному путем образования и обратной транскрипции РНК-интермедиатов.

К группе наследственных аномалий с нарушениями информационной специфичности кодирующих последовательностей мутантных генов следует отнести также nonsens-мутации, превращающие смысловые кодоны в терминаторы, и небольшие (несколько нуклеотидных пар) делеции или вставки, ведущие к сдвигу фазы считывания и, как правило, к ранней терминации. На уровне белка-продукта фенотип таких мутаций проявляется чаще всего как полный блок экспрессии гена. Примером мутаций такого рода могут служить nonsens-мутации в кодонах 15, 17, 39, 121 при β -талассемиях. Интересно отметить, что функциональная инактивация β -глобиновой мРНК при этих мутациях, вы-

званная наличием преждевременного терминатора в фазе трансляции, коррелирует также с существенным снижением ее стационарной концентрации в эритроидных клетках больных [19, 20], связанным с какими-то вторичными нарушениями процессинга мРНК или ее стабильности. Фенотип, сходный с проявлениями нонсенс-мутаций, наблюдается также при коротких делециях (1—4 п. н.) в β -глобиновом гене, сопровождающихся сдвигом фазы считывания и преждевременной терминацией [21]. При детальном структурном анализе независимых «нуль»-аллелей α_1 -антитрипсина также обнаружены короткие (1—2 п. н.) делеции со сдвигом рамки в кодирующей последовательности и нонсенс-мутация в кодоне 217 гена, кодирующего этот белок [22]. При сходных структурных изменениях в мутантных геномных генах, кодирующих мультидоменные белки, аномальный фенотип проявляется в наличии укороченных полипептидов с «фенотипическими делециями» СООН-концевых доменов и в утрате определенных дискретных функций, специфичных для этих доменов. Такого рода мутации (нонсенс и вставка длиной 4 н. п.) обнаружены в экзоне 17 гена рецептора ЛППП, кодирующем СООН-концевой цитоплазматический домен этого белка [14], в двух семьях больных с доминантной семейной гиперхолестеринемией. Биохимический анализ мутантных фибробластов этих больных выявил синтез укороченного с СООН-конца белка-рецептора, который сохраняет способность к интеграции в плазматическую мембрану и к связыванию липопротеинов-лигандов, но не образует мембранных кластеров после связывания лигандов и не интернализируется внутрь клеток.

Блоки транскрипции. Наследуемая недостаточность транскрипции индивидуальных генов носит, как правило, характер частичного блока с пониженным выходом генных продуктов (как мРНК, так и белков). К этой группе наследственных аномалий можно отнести прежде всего промоторные мутации, обусловленные первичными изменениями структуры прототипных промоторных элементов, ответственных за адекватную инициацию транскрипции и ее эффективность. Так, в литературе описано несколько форм β -талассемии с мутационными изменениями проксимального промоторного элемента — блока Хогнесса — Гольдберга, имеющего структуру САТАААА и локализованного в 5'-фланкирующей зоне гена β -глобина (позиция —30 п. н. выше стартовой точки транскрипции). При китайской форме β -талассемии обнаружена точечная нуклеотидная замена А→G в положении —29, в результате которой блок САТАААА превратился в САТАГА [23]. В опытах с введением такого мутантного гена в клетки *HeLa* скорость его транскрипции была в 3—5 раз ниже, чем для β -глобинового гена дикого типа, а в эритроидных клетках костного мозга больных стационарная концентрация β -глобиновой мРНК была снижена в 10 раз. Сходная по локализации и по фенотипическим проявлениям промоторная мутация (А→С в положении —28) с превращением нормального блока Хогнесса в САТАСАА выявлена в β -глобиновом гене при курдской форме β -талассемии [24]. Еще одна промоторная мутация того же типа лежит в основе формы β -талассемии, наиболее часто встречающейся в популяции американских негров. Это точечная транзиция А→G в положении —29 5'-фланкирующей зоны β -глобинового гена с образованием аномального промоторного элемента САТGААА и снижением его транскрипционной активности до 25 % по сравнению с контролем как в эритроидных клетках больных, так и в трансфицированных клетках *HeLa* [19]. К группе промоторных мутаций с частичными блоками транскрипции можно отнести также и точечную транзицию С→Т в позиции —88 5'-фланкирующей зоны глобинового гена в негритянской семье с умеренно выраженной β -талассемией [25]. Эта мутация нарушает нормальную структуру дистального элемента промотора, который необходим для обеспечения высокого уровня конститутивной экспрессии β -глобинового гена. В результате описанной мутации нормальный промоторный блок АСАССС превратился в АСАТСС, что сопровождается

5-кратным снижением уровня транскрипции гена. Общим свойством описанных промоторных мутаций является снижение частоты инициации транскрипции без нарушений ее точности и без каких-либо изменений скоростей элонгации цепей РНК и ее процессинга.

Описанные мутации локализуются в хорошо охарактеризованных промоторных блоках, находящихся в непосредственной близости от 5'-конца транскрипционной единицы β -глобинового гена. Существует другая группа менее изученных блоков транскрипции, при которых структура этих промоторных элементов остается нормальной, а природа первичного генетического дефекта требует дальнейшего изучения. Так, при анализе первичной структуры β -глобинового гена от больных β -талассемией албанского происхождения не обнаружено каких-либо изменений в нуклеотидных последовательностях гена и его 5'- и 3'-фланкирующих зон (соответственно 1,6; 2,2 и 0,55 т. п. н.). Можно предположить, что в этом случае мутация локализована в cis-действующих регуляторных последовательностях β -глобинового гена, существенно (более чем на 2,2 т. п. н.) удаленных от его 5'-конца, или в каком-то другом гене, который кодирует транс-действующие транскрипционные факторы, необходимые для эффективной экспрессии гена β -глобина. Не исключены и другие варианты первичного дефекта при этой форме β -талассемии.

Другой пример неидентифицированного первичного дефекта, обуславливающего частичный блок транскрипции, — это селективная недостаточность экспрессии гена церулоплазмينا в гепатоцитах больных с гепатоленулярной дегенерацией (болезнь Вильсона). Нашими исследованиями показано, что дефицит этого белка, являющийся ведущим биохимическим проявлением патологического фенотипа болезни Вильсона, имеет в своей основе существенное снижение стационарной концентрации мРНК церулоплазмينا в паренхиматозных клетках печени [26]. В последующих работах, подтвердивших эти результаты, было продемонстрировано также дифференциальное снижение скорости транскрипции гена церулоплазмينا в изолированных ядрах печени гомозиготных больных с этим заболеванием [27]. К сожалению, в литературе нет данных о структуре нормального гена церулоплазмينا и его регуляторных последовательностей, что затрудняет однозначную интерпретацию указанных данных. В то же время ген церулоплазмينا человека картирован на хромосоме 3 [28, 29], а локус болезни Вильсона, пока еще не идентифицированный функционально, сцеплен с полиморфными маркерами (ДНК и белками), картированными на хромосоме 13, по данным семейного анализа больших родословных [30, 31]. Несомненно, эта ситуация требует дальнейшего изучения и функциональной идентификации локуса болезни Вильсона, однако представляется логичным предположение о том, что этот локус кодирует транс-действующий фактор, осуществляющий позитивный контроль транскрипции гена церулоплазмينا.

Интересный вариант транскрипционного блока описан в работе, где изучали механизмы недостаточности одного из основных белков миелина у мышей инбредной линии *shh^{mta}*, характеризующейся нарушениями миелинизации черной системы в онтогенезе. Было показано, что экспрессия гена, кодирующего этот белок, нарушена на транскрипционном уровне [32]. При дальнейшем анализе структуры геномных генов, кодирующих молекулярные формы миелиновых белков, оказалось, что один из этих генов претерпел tandemную дупликацию, а в одной из копий дублированного гена найдена инверсия группы внутренних экзонов (экзоны 3—7) с изменением их транскрипционной ориентации. В составе РНК клеток нервной системы мышей этой линии найдена соответствующая антисмысловая РНК — транскрипт инвертированного сегмента гена, которая, как предполагается, угнетает транскрипцию неперестроенной копии гена.

Блоки созревания мРНК. В отличие от транскрипционных дефектов, охарактеризованных выше, блоки процессинга мРНК имеют след-

ствием не только количественную недостаточность экспрессии гена, но и формирование аномальных мРНК, не обладающих функциональной активностью. При этом нормальный путь формирования зрелых мРНК может быть нарушен частично или полностью в зависимости от природы и внутригенной локализации первичных мутационных изменений.

Одна из форм частичного дефицита белка — генного продукта связана с мутациями, затрагивающими структуру консервативного олигонуклеотидного блока ААТААА вблизи 3'-конца зрелой мРНК. Этот гексануклеотид играет роль сигнала для нуклеаз, участвующих в процессинге 3'-концов мРНК с удалением избыточных последовательностей пре-мРНК и последующим полиаденилированием зрелых мРНК по их 3'-концам, экспонированным в результате эндонуклеолитической атаки. Точечная мутация этого сигнала (ААТААА→ААТААГ) впервые обнаружена в одном из α -глобиновых генов у итальянского больного α -талассемией [34]. Функциональный анализ клонированного мутантного гена обнаружил частичный, но резко выраженный блок 3'-концевого процессинга пре-мРНК с аккумулярованием в эритроидных клетках аномально длинных транскриптов α -глобинового гена и резким (до 5% контроля) снижением содержания зрелой мРНК. Сходная по своим проявлениям мутация β -глобинового гена выявлена в семье американских негров с фенотипом β^+ -талассемии [35]. Картирование 3'-концов транскриптов мутантного гена в клетках костного мозга больных и в клетках *HeLa*, трансфицированных этим геном в составе экспрессионного вектора, обнаружило аномально длинную мРНК с избыточной 3'-концевой последовательностью длиной 900 п. н. При секвенировании клонированного мутантного гена β -глобина найдена единственная точечная мутация Т→С, превращающая сигнал полиаденилирования ААТААА в ААСААА. Образование удлиненных транскриптов при этой мутации объясняется использованием альтернативного сигнала полиаденилирования, локализованного на 900 п. н. ниже последовательности, кодирующей «правильный» 3'-конец мРНК.

Наследственно детерминированные нарушения сплайсинга мРНК могут быть разделены на мутационные изменения границ экзонов и интронов (полные блоки образования зрелых мРНК, т. е. «нулевые» формы наследственных дефицитов белков) и мутации внутри экзонов или интронов, при которых образуются сигналы альтернативного сплайсинга (количественная недостаточность образования зрелой мРНК с частичным и выраженным в разной степени дефицитом белкового продукта гена). Известно, что точность сплайсинга, лежащая в основе образования непрерывной кодирующей последовательности мРНК из дискретных экзонных сегментов первичного транскрипта, обеспечивается строгой специфичностью коротких консервативных последовательностей на границах экзонов и интронов, причем почти абсолютно инвариантными компонентами этих сигналов сплайсинга являются динуклеотиды GT и AG соответственно на 5'- и 3'-концах интронов [36]. При мутациях, локализованных в пределах консервативных сигналов сплайсинга (точечных нуклеотидных заменах или коротких делециях), имеет место «нулевой» фенотип наследственного заболевания, обусловленный полным блоком нормального созревания мРНК. Так, известны варианты β^0 -талассемии, обусловленные точечными нуклеотидными заменами G→A в положении 1 второго интрона β -глобинового гена (нарушение структуры канонического сигнала сплайсинга GT→AT) и A→G в предпоследней позиции того же интрона (превращение канонического динуклеотида AG в GG) [37]. Сходный фенотип β^0 -талассемии наблюдался при делециях 5 п. н. на 3'-конце или 25 п. н. на 3'-конце 1-го интрона β -глобинового гена [38]. Мутации пограничных последовательностей с полным блоком созревания мРНК найдены также в гене фактора IX свертывания крови при гемофилии B [39] и в гене фенилаланингидроксилазы при фенилкетонурии, в котором блок

созревания мРНК обусловлен точечной заменой G→A в самом начале интрона 12 [40].

В опытах по трансфекции клеточных культур клонированными мутантными генами показано, что при полной инактивации нормальных путей созревания мРНК включаются альтернативные (скрытые) сигналы сплайсинга, локализованные внутри интронов или внутри экзонов и не функционирующие в нормальных генах. При этом в качестве конечных («тупиковых») продуктов сплайсинга образуются аномальные мРНК. При использовании внутриинтронных сигналов сплайсингов эти мРНК содержат вставочные последовательности, а при использовании сигналов внутри экзонов — частичные экзонные делеции. Возможен также аномальный сплайсинг с элиминацией одного или группы экзонов [7, 41].

Частичные блоки формирования зрелых мРНК могут быть следствием точечных мутаций или коротких делеций, локализованных либо в экзонах, либо внутри интронов и ведущих к формированию дополнительных участков сплайсинга в первичном транскрипте. Поскольку эти мутации не затрагивают канонических сигналов сплайсинга на экзонно-интронных границах, то при них нет полного блока созревания нормальных мРНК, а имеет место картина альтернативного сплайсинга. Часть транскриптов мутантных генов подвергается нормальному сплайсингу с образованием функционально активной мРНК с неизменными нуклеотидными последовательностями. Другая часть РНК сплайсируется с использованием альтернативных сигналов, причем образуется аномальная мРНК, несущая частичные делеции, если эти сигналы локализованы в экзонах, или вставки интронных последовательностей при внутриинтронной локализации сигнала альтернативного сплайсинга. Ряд таких мутаций с образованием неадекватных сигналов сплайсинга обнаружен при анализе структуры и экспрессии β-глобиновых генов у различных больных с β-талассемией.

Если мутации с образованием альтернативных сигналов сплайсинга локализованы вблизи границ экзонов и интронов (например, около 5'-концов интронов), то эффективность сплайсинга по соответствующему экзону резко снижается и фенотип мутации (почти полное отсутствие нормальной мРНК и ее белкового продукта) приближается к «нулевому». К этой группе мутаций относится β-талассемия, обусловленная изменениями структуры 5'-конца первого интрона β-глобинового гена — точечными заменами G→C, G→A и G→T в позиции 5 этого интрона и T→C в позиции 6 [19, 42]. Сходный (почти «нулевой») фенотип имеет делеция 7 п. н. в позициях 5—11 одного из интронов гена сывороточного альбумина у мутантной линии крыс с анальбуминемией [43]. Другой вариант мутаций этого класса связан с образованием сигналов альтернативного сплайсинга внутри экзонов. Как правило, это точечные мутации, не изменяющие специфичности кодонов. К таким мутациям относится замена T→A в кодоне 24 β-глобинового гена с превращением глицинового кодона GGT в синонимичный кодон GGA. Однако в результате этой мутации, локализованной в экзоне 1 на расстоянии 16 п. н. от его 3'-конца, образуется альтернативный участок сплайсинга с вовлечением динуклеотида GT из кодона 25 [44]. По этому альтернативному пути протекает сплайсинг 75 % молекул премРНК и образуется аномальная мРНК с делецией 16 нуклеотидов и сдвигом фазы считывания.

При внутриинтронных мутациях, локализованных в 3'-концевых сегментах интронов β-глобинового гена и имеющих фенотип β-талассемии, образуется также альтернативный участок сплайсинга, имитирующий структуру 3'-конца интрона. Такого рода мутации обнаружены в обоих интронах β-глобинового гена [19], причем их следствием является образование аномальных мРНК со вставками 3'-участков соответствующих интронов. Точечная замена G→A найдена при анализе мутантных глобиновых генов в разных этнических группах — у азербайджанцев [45] и у жителей Кипра [19], что, по-видимому,

указывает на независимое происхождение данной мутации в этих популяциях.

Количественные соотношения между нормальным и аномальными путями сплайсинга мРНК β -глобина при разных мутациях этой группы могут довольно широко варьировать. Так, при двух мутациях, близких по своей локализации (положения 110 и 116 малого интрона) и по механизму действия (формирование альтернативных акценторных сигналов сплайсинга), наблюдаются существенные различия в степени выраженности дефицита нормальной мРНК β -глобина. При первой из этих мутаций около 20 % транскриптов способствуют образованию нормальной мРНК, а при второй — она почти не обнаруживается [46]. Молекулярные основы таких резко выраженных количественных различий пока не выяснены.

Блоки трансляции. Полное функциональное выключение гена может быть причиной мутационных изменений инициаторного ATG-кодона, определяющего NH_2 -концевой метпептид и являющегося единственным инициаторным кодоном у эукариот. Следствием таких мутаций является абсолютный блок трансляции мРНК без каких-либо нарушений ядерных стадий экспрессии гена. В качестве примера можно привести α -талассемию сардинского происхождения, при которой клонирование и секвенирование гена α_2 -глобина выявили единственную точечную мутацию, превращающую инициаторный кодон ATG в триплет ACG [47]. Эта мутация, первоначально выявленная при клонировании α -глобинового гена, была далее обнаружена у ряда сардинских больных α -талассемией рестрикционным картированием геномной ДНК, так как описанная точечная замена в инициаторном кодоне сопровождается исчезновением участка узнавания для рестриктазы *NcoI*.

Строго говоря, к трансляционным блокам можно отнести и описанные выше нонсенс-мутации, делеции со сдвигом рамки считывания, а также мутации, нарушающие структуру кодонов-терминаторов [19].

Если мутации инициаторного ATG-кодона вызывают полный блок трансляции мРНК, то частичная недостаточность ее трансляционной эффективности может быть следствием мутационных изменений нуклеотидного окружения инициаторного ATG-кодона. Известно, что инициаторные ATG-кодоны отличаются от неинициаторных ATG-триплетов следующими маркерными особенностями: 1) в большинстве мРНК они являются первыми триплетами ATG, считая от 5'-концов мРНК [48]; 2) они входят в состав короткой консервативной последовательности, играющей роль сигнала инициации и имеющей прототипную структуру $\text{C}_5\text{A}_6\text{CCATGC}$ (инициаторный кодон выделен). Существенными элементами этого сигнала можно считать наличие пурина (A→G) в позиции —3, считая от начала ATG-кодона, и наличие остатков C в положениях —1, —2, —4 и —5.

При секвенировании единственного α -глобинового гена от больного с алжирской формой α -талассемии (второй ген α -глобина отсутствует в результате делеции протяженностью 3,7 т. п. н.) была обнаружена делеция двух остатков C в положениях —2 и —3 по отношению к инициаторному кодону, в результате которой существенно изменилась структура его нуклеотидного окружения [49]. Далее был проведен функциональный анализ фенотипических последствий этой мутации [50]. По матрице мутантной α -глобиновой мРНК была синтезирована полноразмерная кДНК, которую клонировали в векторе *pSP64* и транскрибировали *SP6*-полимеразой, а синтетическую мРНК транслировали в бесклеточном лизате ретикулоцитов кролика. При этом эффективность трансляции мутантной мРНК оказалась сниженной на 40 % по сравнению с нормальной мРНК α -глобина. Сходные результаты были получены в опытах, где в клетки *COS* вводили гибридные конструкции, содержащие 5'-нестранслируемую последовательность мутантной α -глобиновой мРНК и кодирующую последовательность нормального гена β -глобина человека. В этих экспериментах показано, что двухнуклеотидная делеция вблизи инициаторного кодона не влия-

ет на ядерные стадии экспрессии гена (транскрипцию, сплайсинг, полиаденилирование).

Посттрансляционные блоки. Дефекты посттрансляционного созревания, внутриклеточного транспорта и секреции белков представляют собой еще недостаточно изученную группу моногенных наследственных болезней, по всей вероятности, гетерогенную в молекулярно-генетическом отношении и проявляющуюся в фенотипе как частичная недостаточность функционально полноценного белкового продукта.

Наиболее детально изученная мутация этой группы — это количественная недостаточность α_1 -антитрипсина, сцепленная с мутантным *Z*-аллелем гена этого белка. Дашная мутация представляет собой точечную нуклеотидную замену в кодоне 342 для зрелой полипептидной цепи с аминокислотным замещением Glu→Lys в этой позиции [51]. Паренхиматозные клетки печени гомозиготных носителей *Z*-мутации содержат мРНК α_1 -антитрипсина и не отличаются от нормальных гепатоцитов по скорости синтеза этого белка [52], но его транспорт частично блокирован, по-видимому, на стадии перехода из эндоплазматического ретикулума в комплекс Гольджи. Вследствие этого содержание α_1 -антитрипсина в кровотоке больных снижено до 10—20 % контрольной величины [51]. Молекулярные механизмы блока транспорта и секреции белка при этой мутации пока не выяснены, но именно *Z*-мутация является причиной такого блока, поскольку он воспроизведен на трансгенных мышах, несущих *Z*-аллель гена α_1 -антитрипсина человека [53].

Другой пример наследственной патологии этой группы — проинсулинемия, при которой нарушено созревание инсулина, а в крови больных циркулирует незрелый предшественник инсулина — проинсулин, содержащий в составе единой полипептидной цепи А- и В-цепи инсулина и разделяющий их С-пептид, удаляющийся в ходе внутриклеточного созревания инсулина в островках поджелудочной железы [54]. В одной из семей с проинсулинемией идентифицирована точечная мутация в инсулиновом гене, при которой остаток Arg на границе С-пептида и А-цепи, являющийся необходимым компонентом сигнала для протеазы процессинга, превращается в His. Другая форма диабета с резистентностью к инсулину обусловлена недостаточностью специфического рецептора инсулина на поверхности клеток и имеет в своей основе точечную мутацию G→T с заменой Arg→Ser в участке протеолитического расщепления биосинтетического предшественника с созреванием активного рецептора [55]. Мутация на границе последовательности зрелого белка и про-области, отщепляемой при его протеолитической активации, имеет следствием функциональный блок превращения протромбина Барселона в активный тромбин [56], а мутационные изменения про-области фактора IX свертывания крови выражаются как блоки посттрансляционной модификации и количественная недостаточность при гемофилии В [57].

Паряду с внутригенными мутациями, нарушающими структуру биосинтетических предшественников или зрелых белков и блокирующими их посттрансляционное созревание, некоторые варианты наследственного дефицита белков могут быть обусловлены трансдействующими мутациями. При этом дефицит белка и накопление его предшественников и интермедиантов созревания не ассоциированы с какими-либо изменениями в структуре соответствующего гена, а молекулярная природа мутации остается неясной. Так, резко выраженная недостаточность в кровотоке аполипопротеина А-1 с накоплением в крови его предшественника, эндемичная для популяции острова Тенжир, не связана с изменениями нуклеотидных последовательностей гена, кодирующего этот белок [58]. Более того, нормальная экспрессия гена аполипопротеина А-1 (синтез, процессинг и секреция зрелого белка) продемонстрирована после трансфекции гетерологичных клеток экспрессионными конструкциями, содержащими клонированный ген аполипопротеина А-1 от больного.

Мутации с изменениями структуры зрелых белков. Внутриэкзонные мутации, ведущие к изменениям информационной специфичности кодонов, как правило, не влияют на количественные параметры экспрессии генов, но имеют следствием изменения аминокислотных последовательностей кодируемых белков с разнообразными фенотипическими проявлениями (изменения каталитической активности ферментов, их кинетических и регуляторных характеристик, метаболической стабильности и др. свойств). Мутантные белки, содержащие точечные замены аминокислот, изучаются довольно давно с помощью традиционных методов аналитической белковой химии, включая определение аминокислотных последовательностей. Достаточно упомянуть идентификацию большого количества мутаций в глобиновых генах при секвенировании мутантных глобиновых цепей от больных с различными формами гемоглобинопатий. Прямым секвенированием мутантных белков идентифицированы также патологические Z- и S-аллели гена α_1 -антитрипсина, ассоциированные с его недостаточностью [51], и некоторые другие моногенные мутации.

Следует однако отметить, что внедрение методологии рекомбинантных ДНК в медицинскую генетику (в частности, клонирование и секвенирование кДНК и анализ выведенных аминокислотных последовательностей кодируемых белков, а также изучение полиморфизма нуклеотидных последовательностей геномных генов) привело к существенному прогрессу и в этой области. Так, выявлено большое количество нейтральных (не ведущих к патологическому фенотипу) полиморфных вариантов сывороточного альбумина [59] и ряда других белков и показано, что нуклеотидные замены в геномных кодирующих последовательностях встречаются существенно чаще, чем замещения аминокислот в белках. Обнаружено большое количество точечных мутаций с патологическим фенотипом, что является дополнительным свидетельством генетической гетерогенности наследственных болезней [60]. Наконец, определение сцепления патологических мутантных аллелей с аллельными комбинациями гаплотипов полиморфных (внутригенных или фланкирующих) маркеров применяется для диагностики наследственных болезней [1—3], для изучения происхождения моногенных мутаций и их разнообразия. Так, показано, что Z-аллель гена α_1 -антитрипсина постоянно сцеплен с одним гаплотипом сцепленных маркеров, т. е. данная мутация имела однократное происхождение в большой популяции людей белой расы [61]. С другой стороны, серповидноклеточная анемия в различных популяциях жителей Африки и Юго-Восточной Азии обусловлена многократным возникновением одной и той же точечной мутации в шестом кодоне β -глобинового гена, которая, по данным сравнительного популяционного исследования, сцеплена с различными гаплотипами полиморфных внутригенных маркеров [62].

Приведенный материал показывает, что моногенные наследственные болезни характеризуются выраженной гетерогенностью, и даже мутации в пределах одного гена могут различаться по своей природе, по внутригенной локализации, по механизмам и степени выраженности блоков экспрессии гена — фенотипических следствий первичного мутационного дефекта. При описании основных типов экспрессионных блоков была достаточно полно продемонстрирована гетерогенность талассемических мутаций, среди которых найдены практически все возможные варианты первичных генных дефектов. Для подтверждения того, что генетическая гетерогенность мутационных изменений является общей закономерностью, приведем некоторые дополнительные примеры, полученные при молекулярно-генетическом анализе других наследственных болезней.

Семейная гиперхолестеринемия имеет в своей основе наряду с разнообразными делециями гена рецептора ЛПНП точечные нонсенс- и миссенс-мутации с гетерогенными фенотипическими проявлениями [14]. Кроме того, характерные для этого заболевания биохимические

признаки могут быть обусловлены мутациями рецептор-связывающего домена в аполипопротеине В — основном белковом компоненте ЛПНП.

У больных фенилкетонурией описано не менее трех различных мутаций в гене фенилаланин-гидроксилазы, сцепленных с определенными гаплотипами внутригенных полиморфных участков [40]. Одна из них — это точечная замена на 5'-конце интрона 12 с полным блоком сплайсинга мРНК (см. выше), а две другие — точечные мутации в экзонах 9 (Leu₃₁₁→Pro) и 12 (Arg₄₀₈→Trp). Обе эти мутации являются причиной синтеза полностью неактивного фермента.

Большое количество разнообразных мутаций в гене аденозиндезаминазы обнаружено при изучении его структуры и экспрессии в культурируемых клеточных линиях от больных с комбинированным иммунодефицитом, обусловленным недостаточностью этого фермента [63]. Большинство из них — это миссенс-мутации в кодирующей последовательности, нарушающие каталитическую активность фермента или снижающие его стабильность. Кроме того, описаны протяженные делеции гена аденозиндезаминазы и мутации сигналов сплайсинга с полным блоком образования функционально активной мРНК.

Молекулярно-генетический анализ мутаций в гене α -цепи β -гексозаминидазы А был проведен на больных с болезнью Тей-Сакса (дефицит этого фермента) в двух популяциях (канадцы французского происхождения и еврей-ашкенази), в которых данное заболевание встречается с повышенной частотой. В первой из них обнаружена протяженная (4 т. п. н.) делеция, захватывающая промоторную зону и 5'-концевой экзон этого гена [64], а во второй — точечная мутация канонического сигнала сплайсинга (GT→CT) на 5'-конце интрона 12 с полным блоком адекватного сплайсинга. Такая мутация обнаружена лишь в 30 % изученных мутантных генов, т. е. генетическая гетерогенность заболевания очевидна и в пределах одной этнической группы с высокой частотой встречаемости [65].

Генетическая гетерогенность гемофилии В (дефицит фактора IX) становится явной уже при изучении степени выраженности количественной недостаточности фактора IX (от умеренного снижения концентрации в крови до полного отсутствия с иммунной реакцией на введение белка больным). При молекулярно-генетическом изучении гена фактора IX в разных семьях носителей гемофилии В обнаружены протяженные делеции, вовлекающие отдельные экзоны или их группы, внутригенная инсерция длиной 6 т. п. н., мутация канонического динуклеотида — сигнала сплайсинга в начале интрона 6, нонсенс-мутация и миссенс-мутации с заменами аминокислот в цепи зрелого фактора IX с его функциональной недостаточностью и в пропептидной зоне с блоком его процессинга [12, 13, 39, 57, 66].

При гемофилии А (дефицит фактора VIII свертывания крови) найдены делеции и инсерции в гене, кодирующем этот белок, а также — точечные миссенс- и нонсенс-мутации [9, 10, 12, 18, 67].

Дальнейшее изучение молекулярной гетерогенности наследственных дефектов с одинаковыми или сходными фенотипическими проявлениями представляет интерес для понимания природы экспрессионных и регуляторных сигналов, для выяснения структуры детерминант, определяющих дискретные функции мультидоменных и мультифункциональных белков, и для конструирования аллельспецифических диагностических ДНК-зондов.

Естественно, точное выяснение молекулярной природы генных мутаций совершенно необходимо при планировании их генной коррекции. Прежде всего, введение гена, кодирующего недостающий белок, совершенно неэффективно при транс-действующих мутациях, механизмы проявления которых пока совершенно не выяснены. Исправление точечных мутаций с установленной локализацией, скорее всего, в перспективе может быть достигнуто сайт-направленным мутагенезом, а не введениями нормальных аналогов мутантных генов. При этом восстанавливается функция гена, остающегося в своем естественном

хромосомном окружении. Кроме того, использование для генной терапии полноразмерных генов, многие из которых имеют очень большие размеры (например, гены дистрофина, фактора VIII, фенилаланингидроксилазы и др.), по всей вероятности, должно встретить серьезные технические трудности в связи с отсутствием достаточно емких векторов. В этом отношении более перспективны кДНК-конструкции, обеспеченные промоторными и другими экспрессионными сигналами и регуляторными последовательностями. Однако еще более перспективно применение для генной коррекции модульных структур, содержащих отдельные экзоны, их группы или дискретные кодирующие или сигнальные участки генов. Такой подход мог бы найти применение наряду с кДНК-конструкциями для коррекции делеционных, инсерционных и других изменений структуры генов при одном обстоятельстве — обеспечении гомологичной рекомбинации с заменой соответствующей геномной последовательности на введенную извне. Пока гомологичная рекомбинация продемонстрирована на клеточных культурах как весьма редкое событие, требующее селекции соответствующих рекомбинантов из большого числа трансформированных клеток [68, 69]. В связи с указанными обстоятельствами на сегодняшний день выглядит весьма проблематичной идея радикальной коррекции генных дефектов путем микроинъекции нормальных генов в зиготу. Основные препятствия при этом — частичная эффективность интеграции трансгенов в геном зиготы, опасность инсерционного мутагенеза при случайном встраивании трансгена и неадекватный уровень его экспрессии при этом. В то же время в экспериментах на трансгенных мышах продемонстрировано исправление как генных дефектов [70—72], так и фенотипов наследственных болезней [73]. Наиболее реалистичный подход к генной терапии наследственных болезней — это коррекция патологических фенотипов на уровне соматических клеток, которая осуществляется в экспериментах двух типов: 1) прямое введение экспрессируемых конструкций в организм и 2) получение первичных клеточных культур организма-реципиента с их трансформацией *in vitro* и введением трансформированного клеточного клона обратно реципиенту. Довольно большое количество экспериментов первого типа показывает, что экспрессия трансгена носит временный характер и попытки коррекции генных болезней таким способом, по-видимому, потребуют многократных введений экспрессируемых конструкций [74]. Следует отметить некоторые интересные попытки создания способов специфической доставки экзогенной ДНК в определенные органы для обеспечения ее тканеспецифической экспрессии [75]. Второй подход, связанный с трансформацией первичных клеточных культур организма-реципиента, по-видимому, более интересен для генной терапии, хотя оптимальные способы интродукции трансформированных клеток в организм и создания селективных преимуществ для их размножения пока еще не отработаны. Перспективные клетки-мишени для такого рода исследований — это плюрипотентные стволовые клетки костного мозга [76], фибробласты [77] и гепатоциты [78]. На клеточном уровне в экспериментах такого типа продемонстрирована коррекция наследственных дефектов, обуславливающих недостаточность аденозиндезаминазы (комбинированный иммунодефицит [79] и недостаточность глюкоцереброзидазы (болезнь Гоше) [80]). В последнее время появились работы на кроликах с генетической моделью семейной гиперхолестеринемии (линия Ватанабе с частичной делецией гена рецептора ЛПНП), в которых достигнута высокоэффективная коррекция этого дефекта в первичных культурах фибробластов [81] и гепатоцитов [82], трансформированных кДНК рецептора человека в ретровирусном векторе. Однако, скорее всего, генетические манипуляции на соматических клетках, имеющие цель коррекции наследственного дефицита на уровне организма, не приведут к стабильному изменению генотипа соматических клеток-мишеней, если не будут созданы методы эффективного вытеснения мутантных клеток в организме соответствующими трансформированными клонами.

MOLECULAR HETEROGENEITY OF HUMAN HEREDITARY DISEASES
AND PROBLEMS OF THEIR GENE THERAPY

V. S. Gaitshhoki

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

Summary

The paper represents a review of up-to-date considerations concerning the primary mechanisms responsible for the deficiency of protein gene products in human hereditary diseases. The molecular bases of the genetic and phenotypic heterogeneity of hereditary diseases are analyzed. This heterogeneity could be due to various intra- and extragenic mutations causing either complete or partial blocks at various levels of gene expression (disturbances in the coding specificity of genes, insufficiency in transcription, mRNA processing, its translation, blocks of protein processing and its intracellular traffic). The problems of gene therapy of hereditary diseases are discussed in relation to their heterogeneity.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Francomano C. A., Kazazian H. H. DNA analysis in genetic disorders // *Ann. Rev. Med.*—1986.— 37.— P. 377—395.
2. Gusella J. F. DNA polymorphism and human diseases // *Ann. Rev. Biochem.*—1986.— 55.— P. 831—854.
3. Cooper D. N., Schmidtke J. Diagnosis of genetic diseases using recombinant DNA // *Hum. Genet.*—1986.— 73, N 1.— P. 1—11.
4. Гайццоки В. С. Молекулярные основы наследственных заболеваний человека, обусловленных недостаточностью экспрессии генов // *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология*—1988.— № 7.— С. 3—14.
5. Antonarakis S. E. Diagnosis of genetic disorders at the DNA level // *New Engl. J. Med.*—1989.— 320, N 3.— P. 153—163.
6. The silent carrier allele: β -thalassemia without a mutation in the β -globin gene or its flanking regions / G. L. Semenza, K. DelGrosso, M. Foncz et al. // *Cell*—1984.— 39, N 1.— P. 123—126.
7. α -globin gene deletions causes α -thalassemia syndromes in two German families / J. Horst, E.-U. Griese, E. Kleihauer, E. Kohne // *Hum. Genet.*—1984.— 68, N 3.— P. 260—263.
8. $\gamma\delta\beta$ -thalassemias 1 and 2 are the result of a 100 kbp deletion in the human β -globin cluster / R. Taramelli, D. Kioussis, E. Vanin et al. // *Nucl. Acids Res.*—1986.— 14, N 17.— P. 7017—7029.
9. Hemophilia A: detection of molecular defects and carriers by DNA analysis / S. E. Antonarakis, P. Waber, S. Kittu et al. // *New Engl. J. Med.*—1985.— 313, N 14.— P. 842—848.
10. Characterization of a partial deletion of the factor VIII gene in hemophilias with inhibitor / B. Bardoni, M. Sampietro, M. Romano et al. // *Hum. Genet.*—1988.— 79, N 1.— P. 86—88.
11. Preferential loss of exons in Duchenne and Becker muscular dystrophies / S. M. Forrest, G. S. Cross, A. Speer et al. // *Nature*—1987.— 329, N 6140.— P. 638—640.
12. Lawn R. M. The molecular genetics of hemophilia: blood clotting factors VIII and IX // *Cell*—1985.— 42, N 2.— P. 405—406.
13. Gene deletion in an Italian haemophilia B subject / F. Bernardi, L. RelSenno, R. Barbieri et al. // *J. Med. Genet.*—1985.— 22, N 4.— P. 305—307.
14. Brown M. S., Goldstein J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis // *Science*—1986.— 232, N 4746.— P. 34—47.
15. The human LDL receptor: a cysteine rich protein with multiple *Alu* sequences in its mRNA / T. Yamamoto, C. G. Davis, M. S. Brown et al. // *Cell*—1984.— 39, N 1.— P. 27—36.
16. Intron-mediated recombination may cause a deletion in an $\alpha 1$ type I collagen / G. S. Barsh, C. L. Roush, J. Bonadio et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*—1985.— 82, N 9.— P. 2870—2874.
17. Duplication of seven exons in LDL receptor gene caused by *Alu-Alu* recombination in a subject with familial hypercholesterolemia / M. A. Lehrman, J. L. Goldstein, D. W. Russell, M. S. Brown // *Cell*—1987.— 48, N 5.— P. 827—835.
18. Haemophilia A resulting from *de novo* insertion of *L1* sequences represents a novel mechanism for mutation in man / H. H. Kazazian, H. Wong, K. Wong et al. // *Nature*—1988.— 332, N 6160.— P. 164—166.
19. Antonarakis S. E., Kazazian H. H., Orkin S. H. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene cluster // *Hum. Genet.*—1985.— 69, N 1.— P. 1—14.

20. β -thalassemia in American Blacks: novel mutations in the «TATA» box and an acceptor splice site / S. E. Antonarakis, S. H. Orkin, T. Cheng et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1984.— 81, N 4.— P. 1154—1158.
21. Cheng T., Orkin S. H., Antonarakis S. E. β -thalassemia in Chinese: use of *in vivo* RNA analysis and oligonucleotide hybridization in systematic characterization of molecular defects // Ibid.— N 9.— P. 2821—2825.
22. α_1 -antitrypsin Null Granite Falls' a nonexpressing α_1 -antitrypsin gene associated with a frameshift to stop mutation in a coding exon / T. Nukiwa, H. Takahashi, M. Brantly et al. // J. Biol. Chem.— 1987.— 262, N 25.— P. 11999—12004.
23. ATA box transcription mutation in β -thalassemia / S. H. Orkin, J. P. Sexton, T. Cheng et al. // Nucl. Acids Res.— 1983.— 11, N 14.— P. 4727—4734.
24. Functional analysis of a β -globin gene containing a TATA box mutation from a kurdish Jew with β -thalassemia / S. Surrey, K. DelGrosso, P. Malladi et al. // J. Biol. Chem.— 1985.— 260, N 11.— P. 6507—6510.
25. Orkin S. H., Antonarakis S. E., Kazazian H. H. Base substitution in position-88 in a β -thalassemic globin gene. Further evidence for the role of distal promoter element ACACCC // Ibid.— 1984.— 259, N 14.— P. 8679—8681.
26. Молекулярная структура гена церулоплазмнина человека и его экспрессия при мутации Вильсона - Коновалова / А. Л. Шварцман, В. Г. Вахарловский, В. С. Гайдухоки, С. А. Нейфах // Докл. АН СССР.— 1981.— 257, № 3.— С. 717—720.
27. Czaja M. J., Weiner F. R., Schwarzenberg S. J. Molecular studies of ceruloplasmin deficiency in Wilson's disease // J. Clin. Invest.— 1987.— 80, N 10.— P. 1200—1204.
28. Characterization, mapping and expression of the human ceruloplasmin gene / F. Yang, S. L. Naylor, J. B. Lum et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1986.— 83, N 10.— P. 3257—3261.
29. Chromosomal localization of ceruloplasmin and transferring genes in laboratory rats, mice and in man by *in situ* hybridization with specific DNA probes / V. S. Baranov, A. L. Schwartzman, V. N. Gorbunova et al. // Chromosoma.— 1987.— 96, N 1.— P. 60—66.
30. Assignment of the gene of Wilson disease to chromosome 13: linkage to the esterase D locus / M. Frydman, B. Bonne-Tamir, L. A. Farrer et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 82, N 4.— P. 1819—1821.
31. Mapping the Wilson disease locus to a cluster of linked polymorphic markers on chromosome 13 / A. Bowcock, L. A. Farber, L. L. Cavalli-Sforza et al. // Amer. J. Hum. Genet.— 1987.— 41, N 1.— P. 27—35.
32. Okano H., Ikenaka K., Mikoshiba L. Recombination within the upstream gene of duplicated myelin basic protein genes of myelin deficient *shi^{mbd}* mouse results in the production of antisense RNA // EMBO J.— 1988.— 7, N 11.— P. 3407—3412.
33. Nussinov R. Sequence signals which may be required for efficient formation of mRNA 3'-termini // Nucl. Acids Res.— 1986.— 14, N 8.— P. 3557—3571.
34. α -thalassemia caused by a polyadenylation signal mutation / D. R. Higgs, S. E. Y. Goodbourn, J. Lamb et al. // Nature.— 1983.— 306, N 5941.— P. 398—400.
35. Orkin S. H., Cheng T.-C., Antonarakis S. E. Thalassemia due to a mutation in the cleavage-polyadenylation signal of the human β -globin gene // EMBO J.— 1985.— 4, N 2.— P. 453—456.
36. Breathnach R., Chambon P. Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins // Ann. Rev. Biochem.— 1981.— 50.— P. 349—383.
37. β -thalassemia resulting from a single nucleotide substitution in an acceptor site / G. F. Atweh, N. P. Anagnou, J. Shearin et al. // Nucl. Acids Res.— 1985.— 13, N 3.— P. 777—790.
38. Inactivation of an acceptor RNA site by a short deletion in β -thalassemia / S. H. Orkin, J. P. Sexton, S. C. Goff, H. H. Kazazian // J. Biol. Chem.— 1983.— 258, N 12.— P. 7249—7251.
39. Rees D., Rizza C. R., Brownlee G. G. Haemophilia B caused by a point mutation in a donor splice junction of the human factor IX gene // Nature.— 1985.— 316, N 6029.— P. 643—645.
40. Woo S. L. C. Molecular basis and population genetics of phenylketonuria // Biochemistry.— 1989.— 28, N 1.— P. 1—7.
41. An exon-skipping mutation in phenylketonuria / J. Marvit, A. G. DiLella, K. Brayton et al. // Amer. J. Hum. Genet.— 1986.— 39, N 3.— P. A15.
42. Molecular characterization of seven β -thalassemia mutations in Asian Indians / H. H. Kazazian, S. H. Orkin, S. E. Antonarakis et al. // EMBO J.— 1984.— 3, N 3.— P. 593—596.
43. A seven-base-pair deletion in an intron of the albumin gene of analbuminemic rats / H. Esumi, Y. Takanashi, S. Aalo et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1983.— 80, N 1.— P. 95—99.
44. «Silent» nucleotide substitution in a β^+ -thalassemic gene activates splice site in coding sequence RNA / M. E. Goldsmith, R. K. Humphries, T. Ley et al. // Ibid.— N 8.— P. 2318—2322.
45. Изучение молекулярных основ талассемии. IV. Клонирование β -глобинового гена больного талассемией из Азербайджана и определение точковой мутации в малом интроне / С. А. Лямборская, В. Л. Бухман, М. И. Просняк и др. // Генетика.— 1987.— 23, № 2.— С. 228—238.
46. Metherall J. E., Collins F. S., Pan J. β^0 -thalassemia caused by a base substitution that creates an alternative splice acceptor site in an intron // EMBO J.— 1986.— 5, N 10.— P. 2551—2557.

47. Initiation codon mutation as a cause of α -thalassemia / M. Pirasli, G. Saglio, J. C. Chang et al. // *J. Biol. Chem.*—1984.—259, N 20.— P. 12315—12317.
48. Kozak M. Compilation and analysis of sequences upstream from the initiation start site in eukaryotic mRNAs // *Nucl. Acids Res.*—1984.—12, N 2.— P. 857—872.
49. α -thalassemia associated with the deletion of two nucleotides at positions -2 and -3 preceding the AUG codon / F. Morle, P. Lopez, T. Henni, J. Godet // *EMBO J.*—1985.—4, N 5.— P. 1245—1250.
50. Morle F., Stark J., Godet J. α -thalassemia due to the deletion of nucleotides -2 and -3 preceding the AUG initiation codon affects translational efficiency both in vitro and in vivo // *Nucl. Acids Res.*—1986.—14, N 8.— P. 3279—3292.
51. Travis J., Salverson G. S. Human plasma proteinase inhibitors // *Ann. Rev. Biochem.*—1983.—52.— P. 655—709.
52. Translation and processing of normal (PiMM) and abnormal (PiZZ) human α_1 -antitrypsin / I. S. Bathurst, J. Stenflo, D. M. Errington, R. W. Carrell // *FEBS Lett.*—1983.—153, N 2.— P. 270—274.
53. Expression of normal and mutant alpha₁-antitrypsin genes in transgenic mice / J. L. DeMayo, R. N. Sifers, S. M. Carlson et al. // *Amer. J. Hum. Genet.*—1986.—39, N 3.— P. A195.
54. Elbein S. C., Gruppuso P., Schwartz R. Hyperproinsulinemia in a family with a proposed defect in conversion is linked to the insulin gene // *Diabetes.*—1985.—34, N 8.— P. 821—824.
55. Insulin resistance by unprocessed insulin proreceptors point mutation at the cleavage site / M. Kobayashi, T. Sasaoka, Y. Takata et al. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1988.—153, N 2.— P. 657—663.
56. Rablet M.-J., Furie B. C., Furie B. Molecular defect of prothrombin Barcelona. Substitution of cysteine for arginine at residue 273 // *J. Biol. Chem.*—1987.—261, N 32.— P. 15045—15048.
57. Defective propeptide processing of blood clotting factor IX caused by mutation of arginine to glutamine at position -4 / A. K. Bentley, D. J. Rees, C. Rizza, G. G. Brownlee // *Cell.*—1986.—45, N 3.— P. 343—348.
58. Sequence and expression of Tangier apoA-1 gene / S. C. Makridis, N. Ruiz-Opazo, M. Hayden et al. // *Eur. J. Biochem.*—1988.—173, N 2.— P. 465—471.
59. Mariotti M., Salmon C., Lucotte G. Individual polymorphism of albumin gene by sequencing DNA // *Protides in biol. fluids: Proc. 33rd colloq.*—New York: Pergamon Press, 1985.— P. 177—179.
60. Diverse point mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild and severe hemolytic anemia / T. J. Vulliamy, M. d'Urso, C. Battistuzzi et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1988.—85, N 14.— P. 5171—5175.
61. Cox D. N., Woo S. L. C., Mansfield T. DNA restriction fragments associated with α_1 -antitrypsin gene indicate a single progen for deficiency allele *PiZ* // *Nature.*—1985.—316, N 6023.— P. 79—81.
62. Geographic survey of β^s -globin gene haplotypes: evidence for an independent asian origin of the sickle-cell mutation / A. E. Kulozik, J. S. Wainscoat, G. R. Serjeant et al. // *Amer. J. Hum. Genet.*—1986.—39, N 2.— P. 239—244.
63. Akeson A. L., Wiginton D. A., Hutton J. J. Normal and mutant human adenosine deaminase genes // *J. Cell. Biochem.*—1989.—39, N 3.— P. 217—228.
64. Myerowitz R., Hogikian N. D. Different mutations in Ashkenazi Jewish and non-Jewish french canadians with Tay-Sachs disease // *Science.*—1986.—232, N 4758.— P. 1646—1648.
65. Myerowitz R. Splice junction mutation in some Ashkenazi Jews with Tay-Sachs disease: evidence against a single defect in this ethnic group // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1988.—85, N 11.— P. 3955—3959.
66. A 6 Kb insertion as a new case of the disorder hemophilia BEL Salvador / S.-H. Chen, J. R. Edson, K. Kurachi, C. R. Scott // *Amer. J. Hum. Genet.*—1986.—39, N 3.— P. A6.
67. Nonsense and missense mutations in hemophilia A: estimate of the relative mutation rate at CG dinucleotides / H. Yossoufian, S. E. Antonarakis, W. Bell et al. // *Ibid.*—1988.—42, N 5.— P. 718—725.
68. Thomas K. R., Capecchi M. R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells // *Cell.*—1987.—51, N 3.— P. 503—512.
69. Vines G. Gene therapy draws closer to its targets // *New. Sci.*—1988.— N 1642.— P. 22.
70. Constantini F., Chada K. Correction of murine β -thalassemia by gene transfer into the germ line // *Science.*—1986.—233, N 4769.— P. 1192—1194.
71. Expression of a myelin basic protein gene in transgenic shiverer mice: correction of dysmyelinating phenotype / C. Readhead, B. Popko, N. Talahashi et al. // *Cell.*—1987.—48, N 4.— P. 703—712.
72. Cuvard C., Grimmer G., Dubois N. Correction of mouse ornithine transcarbamylase deficiency by gene transfer into the germ line // *Nucl. Acids Res.*—1988.—16, N 5.— P. 2099—2110.
73. Perinatal lethal osteogenesis imperfecta in transgenic mice bearing an engineered mutant pro- α_1 (I) collagen gene / A. Stacey, J. Bateman, T. Choi et al. // *Nature.*—1988.—332, N 6160.— P. 131—136.
74. Betvenisty N., Reshel L. Direct introduction of genes into rats and the expression of the genes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1986.—83, N 24.— P. 9551—9555.

75. Wu G. Y., Wu C. H. Receptor-mediated *in vitro* gene transformation by a soluble DNA-carrier system // J. Biol. Chem.—1987.—262, N 10.— P. 4429—4432.
76. Parkman R. The application of bone marrow transplantation to the treatment of genetic diseases // Science.—1986.—232, N 4756.— P. 1373—1378.
77. Louis D. S., Verma I. D. An alternative approach to somatic cell gene therapy // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1988.—85, N 9.— P. 3150—3154.
78. Wilson J., Jefferson D. M., Chowdhury J. R. Retrovirus-mediated transduction of adult hepatocytes // Ibid.— P. 3014—3018.
79. Palmer T. D., Hock R. A., Osborne W. Efficient retrovirus-mediated transfer and expression of a human adenosine deaminase gene in diploid fibroblasts from an adenosine deaminase-deficient human // Ibid.—1987.—84, N 4.— P. 1055—1059.
80. Complete correction of the enzymatic defect of type I Goucher disease fibroblasts by retroviral-mediated gene transfer / J. Sorge, W. Kuhl, C. West, E. Beutler // Ibid.— P. 906—909.
81. Correction of the genetic defect in hepatocytes from the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits / J. M. Wilson, D. E. Johnston, D. M. Jefferson, R. C. Milligan // Ibid.—1988.—85, N 12.— P. 4421—4425.
82. Efficient expression of retroviral vector-transduced human low density lipoprotein (LDL) receptor in LDL-receptor-deficient rabbit fibroblasts *in vitro* / A. Miyanojara, M. F. Sharkey, J. L. Witztum et al. // Ibid.— N 17.— P. 6538—6542.

НИИ эксперим. медицины АМН СССР, Ленинград

Получено 13.06.89

УДК 616—055.5/7—084:614:061.14

В. С. Баранов

ПРОБЛЕМЫ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ И ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ ИХ КОРРЕКЦИИ

В работе дается определение пренатальной диагностики (ПД) как нового научного направления медицинской генетики, целью которого является изучение функций генома развивающегося зародыша человека в норме и патологии, его взаимодействий с материнским организмом и разработка на этой основе оптимальных путей профилактики, диагностики и, в перспективе,— лечения наследственных болезней. Рассмотрены наиболее актуальные задачи ПД, непосредственно связанные с широким применением молекулярно-генетических методов исследования. Таковыми для диагностики моногенных болезней являются: ПДРФ-анализ семей высокого риска и создание банков ДНК-данных; необходимость широкого внедрения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК; поиск новых диагностических полиморфных сайтов; анализ молекулярной природы патологических мутаций; выяснение первичных биомеханизмов действия мутантных генов. Актуальные задачи ПД хромосомных болезней включают: анализ хромосомных аберраций при помощи хромосом-специфических ДНК-зондов; исследование геноза анеуплоидии; анализ хромосомного мозаицизма; разработка неинвазивных методов определения пола и кариотипирования плода. Кратко обсуждаются основные подходы к проблеме коррекции генетических дефектов и терапии наследственных болезней на разных стадиях онтогенеза человека.

ПД — сравнительно новое направление медицинской генетики, по праву занимающее центральное место в комплексе мероприятий по профилактике и предупреждению наследственных болезней [1, 2]. Возникшая на стыке медицины и многих биологических наук ПД преследует сугубо практическую цель: своевременное выявление и предупреждение рождения плодов с тяжелыми пороками развития и наследственными болезнями, которая достигается при помощи самых разнообразных медицинских подходов и привлечения богатого арсенала разнообразных биохимических, цитогенетических, а в последние годы и молекулярных методов исследования. Вместе с тем сегодня становится все более очевидным, что ПД — отнюдь не простой набор методов. По мере развития ПД все больше трансформируется в самостоятельное научное направление со своими задачами, методами и предметом исследования. По сути ПД следует рассматривать как клиническую (медицинскую) генетику развития человека, основной задачей которой является изу-