

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ИМЕНИ АКАДЕМИКА Н.П. БОЧКОВА»**

На правах рукописи

Зернов Николай Владимирович

**Молекулярно-генетическая диагностика лице-лопаточно-
плечевой миодистрофии Ландузи-Дежерина**

Специальность 1.5.7. — Генетика

Диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Скоблов Михаил Юрьевич

Москва, 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
Актуальность темы исследования	6
Степень разработанности темы	7
Цель и задачи исследования	8
Научная новизна	8
Теоретическая и практическая значимость работы	9
Методология и методы исследования	9
Положения, выносимые на защиту	9
Степень достоверности результатов	10
Соответствие диссертации паспорту научной специальности	10
Апробация работы	11
Личное участие автора в выполнении исследования	11
Публикации	12
Объем и структура работы	12
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Повторяющиеся последовательности генома, их вовлеченность в развитие патологических состояний	13
1.2 Клиническая характеристика миодистрофии Ландузи-Дежерина	14
1.2.1 Клинические проявления	15
1.2.2 Морфологические изменения	17
1.3 Классификация и молекулярно-генетические механизмы развития МЛД	18
1.3.1 Этиопатогенез МЛД 1 типа	18
1.3.2 Этиопатогенез МЛД 2 типа	23
1.4 Современные методики молекулярно-генетической диагностики МЛД	24
1.4.1 Гибридизация по Саузерну	26
1.4.2 Метод молекулярного комбинга	29
1.4.3 Методы, основанные на использовании ПЦР	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	34

2.1	Материалы исследования	34
2.2	Методы исследования.....	34
2.2.1	Выделение геномной ДНК из лимфоцитов крови.....	34
2.2.2	Проведение рестрикции геномной ДНК в агарозных блоках	37
2.2.3	Проведение пульс-электрофореза фрагментов геномной ДНК	37
2.2.4	Подбор праймеров.....	39
2.2.5	Методика определения числа макросателлитных повторов D4Z4 методом количественной ПЦР	40
2.2.6	Гаплотипирование аллелей массивов D4Z4 с помощью аллель- специфичной ПЦР-системы.....	42
2.2.7	Трансформация E.coli контрольными генетическими конструкциями с известной длиной массивов D4Z4	44
2.2.8	Выделение контрольных генетических конструкций C85 и λ 260201 из E. coli.....	45
2.2.9	Выделение ПЦР продуктов из геля	46
2.2.10	Секвенирование по Сенгеру	47
2.2.11	Проведение гибридизации по Саузерну	47
2.2.12	Молекулярный комбинг	55
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ		60
3.1	Разработка методики диагностики МЛД	60
3.1.1	Разработка ПЦР-системы для специфичной амплификации D4Z4 повторов хромосомы 4	60
3.1.2	Оптимизация условий пульс-электрофореза рестрицированной геномной ДНК.....	64
3.1.3	Подбор условий для проведения количественной ПЦР на матрице геля после пульс-электрофореза.....	68
3.1.4	Гаплотипирование аллелей массивов D4Z4.....	70
3.2	Валидация разработанной методики диагностики МЛД1	72
3.2.1	Анализ образцов геномной ДНК с помощью гибридизации по Саузерну.....	72
3.2.2	Анализ образцов геномной ДНК с помощью молекулярного комбинга.....	73
3.2.3	Сравнение результатов диагностики МЛД, полученными с использованием разных методик	74

3.2.4 Сравнение результатов гаплотипирования образцов ДНК.....	76
3.2.5 Анализ представленности пермиссивных аллелей массивов D4Z4 в группе обследованных индивидов	78
3.3 Алгоритм молекулярно-генетической диагностики МЛД1.....	79
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	81
ВЫВОДЫ	82
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	83
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	84
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	86
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	102
Приложение 1. Пример клинического случая МЛД1 с ранним вариантом дебюта.....	102
Приложение 2. Пример клинического случая МЛД1 с классическим вариантом дебюта	104
Приложение 3. Пример клинического случая МЛД1 с поздним вариантом дебюта.....	105
Приложение 4. Результаты диагностики МЛД1 для пациента с одним укороченным аллелем массива повторов D4Z4 четвертой хромосомы	107
Приложение 5. Результаты диагностики МЛД1 для пациента с двумя укороченными аллелями массива повторов D4Z4 четвертой хромосомы.....	109
Приложение 6. Результаты диагностики МЛД1 у пациента без укороченных аллелей	111
Приложение 7. Таблица с результатами диагностики МЛД1 методиками гибридизации по Саузерну, молекулярного комбинга и количественной ПЦР с агарозным гелем	113

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

МЛД – миодистрофия Ландузи-Дежерина;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

SNP – single nucleotide polymorphism

STR – short tandem repeats;

SSLP – simple sequence length polymorphism;

CNV – copy number variation;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов;

ПГТ – предимплантационное генетическое тестирование.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В геноме человека широко представлены повторяющиеся нуклеотидные последовательности (повторы). Их доля, по оценкам разных авторов, может достигать ~70%. Отдельный интерес представляют из себя макросателлитные повторы – тандемно повторяющиеся последовательности ДНК с длиной одного повтора в несколько тысяч пар нуклеотидов. Для таких повторов показано, что их число в тандеме может оказывать влияние на корректное функционирование области генома, содержащей массив макросателлитных повторов. Для некоторых тандемов макросателлитных повторов характерна нестабильность с частыми случаями дупликаций, делеций и транслокаций единиц тандема.

Однако, из-за относительно большого размера и повторяющихся элементов, определение числа повторов в интересующем тандеме с помощью широкодоступных методик, например, таких как ПЦР, хромосомный микроматричный анализ или секвенирование, зачастую является невозможным. Классической методикой, позволяющей определять количественные изменения макросателлитных повторов, является гибридизация по Саузерну. Необходимо отметить, что этот метод изобретен достаточно давно (1975г.) и, несмотря на происходящий сегодня биотехнологический прогресс, остается золотым стандартом в изучении числа и структуры макросателлитных повторов. Стоит также отметить, что с помощью гибридизации по Саузерну возможно определение вариации числа копий отдельно, как на материнской, так и на отцовской хромосоме.

При этом гибридизация по Саузерну является достаточно трудоемкой и протяженной по времени методикой. Кроме того, в классическом варианте она предполагает использование радиоизотопных соединений, что, естественно, накладывает ограничения на использование данной методики в лабораториях. Альтернативное использование нерадиоактивных способов детекции (например, с помощью биотина или дигоксигенина) не получило широкого распространения из-за сложности в процессе гибридизации ДНК-зондов. Недавно появились более современные методы определения числа повторов, например, метод молекулярного комбинга, который сокращает

количество шагов необходимых для определения характеристик макросателлитных массивов, но является довольно дорогостоящим, а его применение описано лишь для некоторых типов макросателлитных повторов.

Проблема обнаружения вариации числа копий макросателлитных повторов в геноме стоит не только перед фундаментальной наукой, но и при выполнении прикладных целей. В качестве практического примера можно привести генетическое заболевание лице-лопаточно-плечевую миодистрофию Ландузи-Дежерина (МЛД), характеризующуюся изменением числа копий макросателлитных повторов D4Z4. Показано, что у больных данным заболеванием, тандем повторов D4Z4 на одном из аллелей 4-й хромосомы насчитывает от 1 до 10 повторяющихся копий, тогда как у здорового человека может достигать 100 копий. До настоящего времени молекулярная диагностика данного заболевания в Российской Федерации не производилась, а за рубежом она является дорогостоящей из-за использования радиоактивных изотопов и оборудования высокой стоимости. Для решения сложившейся ситуации, в ходе данной работы разработан новый метод для определения числа макросателлитных повторов, и проведен сравнительный анализ методов гибридизации по Саузерну и молекулярного комбинга с новым методом.

Степень разработанности темы

На сегодняшний день в ФГБНУ «МГНЦ» ежемесячно обследуются от 2 до 5 пациентов с фенотипическими признаками МЛД. В то время как клиническая диагностика данной патологии, в большинстве случаев, не вызывает затруднений, ее молекулярно-генетическая диагностика требует использования узкоспециализированных методик.

До последнего времени молекулярная диагностика данного заболевания в Российской Федерации не проводилась, а за рубежом она является малодоступной из-за использования радиоактивных изотопов и узкоспециализированного оборудования и проводится в небольшом числе лабораторий.

Поэтому важным является поиск широкодоступных и более дешевых методик молекулярно-генетического подтверждения МЛД.

Цель и задачи исследования

Целью исследования явилось изучение молекулярно-генетических основ, разработка методики, валидация ДНК-диагностики лице-лопаточно-плечевой миодистрофии Ландузи-Дежерина на группе российских пациентов.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Разработать методику обнаружения пермиссивных аллелей, включающую определение числа повторов D4Z4 хромосомы 4 и определение их сцепления с гаплотипом «А» на образцах ДНК группы пациентов с клиническим диагнозом миодистрофия Ландузи-Дежерина.
2. Провести валидацию разработанной методики на ДНК от пациентов с миодистрофией Ландузи-Дежерина и их родственников.
3. Провести исследование аллелей массивов D4Z4 у российских пациентов с миодистрофией Ландузи-Дежерина и их родственников.
4. Изучить молекулярно-генетические характеристики пермиссивных аллелей у пациентов и их родственников.
5. Разработать алгоритм и рекомендации по применению методики ДНК-диагностики лице-лопаточно-плечевой миодистрофии Ландузи-Дежерина.

Научная новизна

Впервые определен спектр и частота представленности аллелей массивов повторов D4Z4 хромосомы 4q35 у пациентов с миодистрофией Ландузи-Дежерина и их фенотипически здоровых родственников из Российской популяции.

Впервые разработана и применена методика определения числа макросателлитных повторов D4Z4 хромосомы 4, основанная на использовании количественной ПЦР. Валидация методики проведена с использованием референсных образцов с известными числами повторов D4Z4 хромосомы 4.

Впервые использована методика аллельспецифичной ПЦР для определения гаплотипа 4qA в образцах фрагментов агарозного геля, не требующая дополнительной стадии очистки ДНК от агарозы.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработана методика определения вариаций числа макросателлитных повторов D4Z4 аллелей хромосомы 4 для проведения ДНК-диагностики у пациентов с лице-лопаточной плечевой миодистрофией Ландузи-Дежерина.

Разработан метод использования фрагментов геля после пульс-электрофореза в качестве ПЦР-матрицы для определения дистального гаплотипа массива повторов D4Z4 хромосомы 4.

Наряду с гибридизацией по Саузерну и методом молекулярного комбинга, разработанная методика может быть использована в клинической практике как исследование первой линии при наличии у пациентов фенотипических признаков лице-лопаточно-плечевой миодистрофии Ландузи — Дежерина.

Разработан алгоритм и рекомендации по ДНК диагностике миодистрофии Ландузи-Дежерина.

Методология и методы исследования

Информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных получено от всех участников. Проведение исследования одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ». Выборка для молекулярно-генетического исследования сформирована из пациентов с клиническим диагнозом миодистрофия Ландузи-Дежерина и их фенотипически здоровых родственников.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработана методика выявления пермиссивных аллелей, включающая определение числа повторов D4Z4 хромосомы 4 и идентификация их сцепления с гаплотипом «А».

2. Проведена валидация разработанной методики с использованием референсных образцов ДНК с известными числами повторов D4Z4 хромосомы 4.

3. Проведено исследование аллелей массивов D4Z4 у российских пациентов с МЛД и их родственников.
4. Проведен анализ распределения числа повторов D4Z4 аллелей хромосомы 4 среди пациентов и их родственников.
5. Разработаны алгоритм и рекомендации по применению методики молекулярно-генетической диагностики МЛД.

Степень достоверности результатов

Основные положения диссертационной работы базируются на материалах первичной документации и полностью им соответствуют. Результаты, полученные автором в процессе комплексного исследования миодистрофии Ландузи-Дежерина в российской популяции, свидетельствуют о решении поставленных задач. Достоверность результатов исследования подтверждена верификацией полученных данных на референсных образцах от 129 пациентов с миодистрофией Ландузи-Дежерина и 46 фенотипически здоровых родственников. Результаты исследования соответствуют данным, представленным в отечественной и зарубежной литературе. Исследование выполнено при использовании различных методов диагностики (количественная ПЦР, секвенирование по Сенгеру, гибридизация по Саузерну, молекулярный комбинг и др.) и методов статистического анализа. Изложенные в диссертационном исследовании положения, выводы и рекомендации являются достоверными. Для сравнительного анализа привлечено достаточное количество современных источников отечественной и зарубежной литературы (129 источников). Выводы полноценно и объективно отражают результаты проведенных исследований.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

В соответствии с областями исследования специальности 1.5.7. (03.02.07) - Генетика (биологические науки) - «Генетика человека. Медицинская генетика. Наследственные болезни. Молекулярные основы наследственности. Мутационная изменчивость. Популяционная генетика» - работа включает в себя обсуждение генетики человека, медицинской генетики, наследственных заболеваний.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены в двух устных выступлениях автора и в двух выступлениях соавторов. Устные доклады: «50 лет ВОГиС: успехи и перспективы» (8 - 10 ноября 2016 г. Москва); «Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (18-20 апреля 2017 г. Москва). Соавторство устных докладов: «A new approach for FSHD diagnostic». A. Borovikov, N. Zernov, M. Skoblov. Future of Biomedicine 2017 (FOB 2017), Vladivostok, 10-15 September 2017; «The Russian registry of patients with facioscapulohumeral muscular dystrophy». Aysylu Murtazina, Nikolay Zernov, Galina Rudenskaya, Inna Sharkova, Natalia Semenova, Nina Demina, Varvara Galkina, Ludmila Bessonova, Artem Borovikov, Elena Dadali, Mikhail Skoblov. 28th Annual FSHD Society International Research Congress, JUNE 24–25, 2021. В виде тезисов и постерных сообщений материалы диссертации представлены на 5 конференциях: постерный доклад “Genotype-phenotype correlations in FSHD” N. Zernov, M. Skoblov. 11th International Multiconference “Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology” - BGRS\SB7 2018. Novosibirsk, Russia. 20-25 August 2018; постерный доклад “Genotype-phenotype correlations in FSHD” 11th International Multiconference “Bioinformatics of Genome Regulation and Structure Systems Biology”. N. Zernov, M. Skoblov. BGRS\SB7 2018. Novosibirsk, Russia. 20-25 August 2018; постерный доклад «DNA diagnostics for facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) by qPCR-based approach». N. Zernov, M. Skoblov. European Human Genetics Conference, Gothenburg, Sweden, June 15–18, 2019; European Human Genetics Conference, Berlin, Germany, JUNE 6–9, 2020; 27th Annual FSHD Society International Research Congress, JUNE 25–26, 2020. Работа одобрена этическим комитетом, прошла экспертную комиссию, рекомендована к защите на заседании Диссертационного совета ФГБНУ «МГНЦ».

Личное участие автора в выполнении исследования

Автор изучил современные данные отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации. Автор самостоятельно проводил все эксперименты, проводил анализ экспериментов с использованием основных методов молекулярной биологии. Зернов Н.В. лично участвовал в анализе и интерпретации полученных результатов, сформулированы

основные результаты и выводы. Написание глав собственных исследований, обсуждение результатов и формулировка выводов выполнены автором самостоятельно.

По результатам исследований автором опубликовано 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для соискателей ученой степени кандидата медицинских наук.

Публикации

Результаты диссертационной работы представлены в 6 статьях в журналах (Scopus и Web of Science), рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для соискателей ученой степени кандидата биологических наук.

Объем и структура работы

Структура диссертации включает: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, список литературы и приложения. Работа представлена на 114 страницах, содержит 15 рисунков, 6 таблиц и 7 приложений. Список литературы включает в себя 129 наименований, все являются зарубежными источниками.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Повторяющиеся последовательности генома, их вовлеченность в развитие патологических состояний

Человеческий геном более чем на две трети состоит из повторяющихся последовательностей различной длины [de Koning A.P. et al., 2011]. В целом все повторяющиеся последовательности можно разделить на две группы: диспергированные повторы и тандемные повторы. Тандемные повторы – это несколько примыкающих друг к другу одинаковых нуклеотидных последовательностей, к ним, например, относятся гены рибосомальной ДНК и сателлитные повторы [Jorda J. et al., 2010]. В свою очередь диспергированные повторы не примыкают друг к другу, а разбросаны по всему геному [McClintock B., 1956]. К диспергированным повторам относят, например, псевдогены, гены транспортной ДНК, локальные повторы. В зависимости от размеров, выделяют микросателлитные, минисателлитные и макросателлитные повторы. Размеры повторяющихся единиц сильно варьируют, так микросателлитные повторы содержат до 10 нуклеотидных пар, минисателлитные от 10 до нескольких сотен, а макросателлитные – несколько тысяч нуклеотидных пар [Richard G.F. et al., 2008; Burgess D.J. et al., 2011]. Долгое время повторяющиеся последовательности относили к так называемой «мусорной» ДНК [Ohno S., 1972]. Однако с развитием технологий, позволяющих изучать повторяющиеся участки генома, возрастает понимание их значения в структуре генома в норме и при патологии [Bowen N.J. et al., 2002; Hua-Van A. et al., 2011]. Наиболее изученными являются мини- и микросателлитные повторы. К примеру их значение показано в развитии таких заболеваний как колоректальный рак, болезни экспансии тринуклеотидных повторов, в частности болезнь Гентингтона, миотоническая дистрофия, синдром ломкой X-хромосомы [Baranovskaya S. et al., 2009; Budworth H. et al., 2013; Hamada H. et al., 1984; Ionov Y. et al., 1993; La Spada A.R. et al., 2010; Marra G. et al., 1995; Morris E.E. et al., 2010; Thibodeau S.N. et al., 1993; Wang B. et al., 2005].

Что же касается макросателлитных повторов, то их роль изучена гораздо меньше. Прежде всего это объясняется техническими сложностями в изучении данных повторов в виду их размеров и нуклеотидного состава. Тем не менее для некоторых из макросателлитных повторов обнаружена их вовлеченность в развитие патологических

состояний [Schaap M. et al., 2013; Tremblay D.C. et al., 2010; Tremblay D.C. et al., 2011; Warburton P.E. et al., 2008]. В частности, детально изучен пусковой механизм развития миодистрофии Ландузи-Дежерина, связанный с числом макросателлитных повторов D4Z4 хромосомы 4 [Lemmers R.J., van der Vliet P.J., Klooster R., et al., 2010]. Однако, для стандартных молекулярно-генетических лабораторий существующие методики определения числа макросателлитных повторов недоступны, что замедляет как понимание фундаментальной роли макросателлитных повторов в структуре генома, так и клиническую диагностику связанных патологий. В данной работе представлена новая методика для определения числа макросателлитных повторов в отдельности на каждом исследуемом аллеле на примере МЛД.

1.2 Клиническая характеристика миодистрофии Ландузи-Дежерина

Лице-плече-лопаточная миодистрофия Ландузи-Дежерина (МЛД) — одно из наиболее распространённых заболеваний из группы наследственных прогрессирующих мышечных дистрофий, по частоте уступающее лишь миодистрофии Дюшенна и миотонической дистрофии. Распространенность заболевания в различных популяциях варьирует от 1:20000 до 1:7000 населения [Flanigan K.M. et al., 2001; Mostacciuolo M.L. et al., 2009; Norwood F.L. et al., 2009; Padberg G.W., Frants R.R., et al., 1995], частота случаев вызванных *de novo* мутациями достигает 25% [Bakker E. et al., 1995a; Zatz M. et al., 1995]. На сегодняшний день известны две генетически различные формы МЛД: МЛД1 (МIM: 607903) и МЛД2 (МIM: 158901), фенотипически не отличающиеся друг от друга. МЛД1 наблюдается в большей части случаев (~95%) и носит аутосомно доминантный характер наследования [Tawil R. et al., 2006]. Причиной МЛД1 является делеция, приводящая к уменьшению числа копий макросателлитных повторов D4Z4 в регионе 4q35. При МЛД1 число повторов в тандеме сокращается до 10 и менее единиц D4Z4, но наличие хотя бы одной D4Z4 единицы на аллеле является необходимым условием для развития МЛД1. У большинства пациентов с МЛД2 идентифицированы различные мутации в гене *SMCHD1* — регуляторе конденсации хроматина [Lemmers R.J.L.F. et al., 2012], в частности региона 4q35. На сегодняшний день известны также случаи сочетания МЛД1 и МЛД2, такие пациенты имеют укороченный аллель D4Z4 от 1 до 10 и мутацию в гене *SMCHD1*.

Известно, что в таких случаях заболевание имеет более раннее начало и быстрое прогрессирование [Larsen M. et al., 2015b; Sacconi S. et al., 2013].

1.2.1 Клинические проявления

Одно из наиболее ранних описаний МЛД представлено в публикации французских неврологов Ландузи и Дежерина в 1886 году [Landouzy L. et al., 1885]. В этой работе авторы суммировали описание основных клинических проявлений МЛД, которыми являются раннее поражение лицевой мускулатуры, прогрессирующая слабость и атрофия мышц плечевого пояса и плеча, выраженный внутрисемейный полиморфизм. Наиболее полное исследование, описывающее основные черты МЛД, провел Padberg в 1982 году [Padberg G., 1982]. Тяжесть клинических проявлений МЛД может значительно отличаться у пораженных членов одной семьи и даже у монозиготных близнецов [Tawil R. et al., 1993].

В литературе описаны три клинических варианта прогрессирования МЛД 1 типа, отличающихся возрастом манифестации и тяжестью течения. Первый вариант [Chen T.H. et al., 2013; Klinge L. et al., 2006] встречается достаточно редко. На его долю приходится от 2% до 4% всех случаев заболевания. Заболевание манифестирует с рождения до 5-летнего возраста и характеризуется тяжелым течением, приводящим к инвалидизации больного спустя 10 лет после появления первых симптомов [Statland J.M. et al., 2013; Tawil R. et al., 1996]. Первыми в процесс вовлекается лицевая мускулатура, прежде всего круговые мышцы глаз и рта, что приводит к недостаточному смыканию век во время сна, слабому сосанию. Раннее моторное развитие, как правило, не страдает. По мере прогрессирования заболевания в патологический процесс вовлекаются мышцы плечевого и тазового поясов, а также перонеальной группы. В совокупности это приводит к ограничению движений в верхних конечностях, поясничному гиперлордозу, кифозу, появлению приемов Говерса и степпажной походки. У 50% больных отмечаются расстройства дыхания и у 20% дисфагия [Mah J.K. et al., 2018]. Для этого варианта МЛД характерным является формирование нейросенсорной тугоухости 75% [Padberg G.W., Brouwer O.F., Dekeizer R.J.W., et al., 1995] и ретинопатии 60% [Fitzsimons R.B. et al., 1987a], обусловленной патологией сосудов сетчатки. В 30% случаев обнаруживается

снижение интеллекта, у 20% могут отмечаться судороги и у 50% нарушение сердечного ритма [Funakoshi M. et al., 1998].

Второй, классический вариант заболевания наблюдается у 81%-93% больных [Padberg G.W., 1982]. Признаки заболевания возникают в возрасте 10-20 лет. Как и в раннем детском варианте первыми в процесс вовлекаются мышцы лица. Слабость мимической мускулатуры придает лицу больного специфический маскообразный вид («лицо сфинкса»). Губы больных утолщаются и выпячиваются («губы тапира»), возникают трудности при наморщивании лба, складывании губ в трубочку, свисте, больные не могут плотно сомкнуть веки, что наиболее заметно во время сна. Предполагается также, что первые признаки мышечной слабости могут быть отмечены в мышцах живота, на что редко обращают внимание как пациенты, так и врачи. У некоторых пациентов отмечена врожденная аплазия части или целой мышцы (например, *m. rectoralis*), этиология которой не ясна. Наряду с поражением лицевой мускулатуры на ранних стадиях заболевания отмечается слабость мышц плечевого пояса. Наиболее вовлеченными в патологический процесс оказываются трапециевидные, ромбовидные, грудные и широчайшая мышца спины. Это приводит к ограничению объема движений в плечевом суставе (возникают трудности при подъеме рук выше горизонтального уровня), и появлению так называемых «крыловидных лопаток». Вовлечение в процесс мышц тазового пояса и проксимальных групп мышц ног наблюдается лишь у небольшого процента больных и только на поздних стадиях заболевания (как правило, спустя 15—20 лет от появления первых признаков болезни). Наиболее пораженными областями нижних конечностей являются подвздошные, ягодичные и приводящие мышцы бедер.

Особенностью заболевания является нехарактерная для большинства генетических вариантов мышечных дистрофий асимметрия поражения, которая может наблюдаться даже в пределах одной мышечной группы у 70%-80% больных. Псевдогипертрофии мышц не характерны, но могут появляться на поздней стадии заболевания в икроножных мышцах. Вовлечение в процесс дыхательных мышц встречается редко. Тем не менее, для пациентов с МЛД 1 характерно расстройство дыхания во сне, не зависящее от тяжести заболевания и часто требующее коррективки [Scully M.A. et al., 2014]. Как правило, течение заболевания довольно медленное и равномерное, что позволяет пациентам адаптироваться и частично компенсировать недостаток мышечной силы. В редких

случаях наблюдаются периоды обострения и ремиссии. По мере развития заболевания в зрелом возрасте 10-20% пациентов теряют способность к самостоятельному передвижению и вынуждены пользоваться инвалидной коляской [Padberg G.W., 2004; Tawil R., 2008]. Продолжительность жизни снижается незначительно. Поражение ЦНС не характерно для пациентов с этим клиническим вариантом МЛД.

Частота экстрамышечных проявлений варьирует по данным разных авторов, однако установлено, что нередко можно наблюдать потерю слуха (75%) [Fitzsimons R.B. et al., 1987b]. Вторым по частоте (60%) экстрамышечным проявлением является ретинопатия, которая чаще возникает у больных женского пола и в большинстве случаев протекает бессимптомно. Лишь у небольшого процента больных ретинопатия протекает тяжело, вплоть до отслойки сетчатки и потери зрения [Padberg G.W., Brouwer O.F., de Keizer R.J., et al., 1995].

Уровень креатинфосфокиназы в плазме крови, как правило не превышает 1400 ед/л. У 25% больных активность фермента находится в пределах нормальных значений. При проведении электромиографического обследования регистрируется первично-мышечный уровень поражения [He J.J. et al., 2018].

Третий клинический вариант диагностируется у 5—15% больных. Заболевание возникает в возрасте сорока и более лет, характеризуется умеренным прогрессированием и представляет собой лопаточно-плечевой вариант прогрессирующей мышечной дистрофии, протекающей без поражения лицевой мускулатуры. Заболевание прогрессирует медленно и, как правило не приводит к инвалидизации больных [Lunt P.W. et al., 1991; Padberg G.W., 1982].

1.2.2 Морфологические изменения

Характер поражения мышц в биоптате больных с МЛД неспецифичен. В отличие от большинства мышечных дистрофий, миопатические изменения имеют довольно мягкий характер, со слабо выраженными фиброзом, гипертрофией мышечных волокон и центральной нуклеацией. Однако приблизительно у трети больных в мышечных биоптатах обнаруживаются признаки эндомизиального и периваскулярного воспаления разной степени выраженности. При этом эндомизиальные инфильтраты в основном

состоят из CD8⁺ Т-клеток, а периваскулярные — из CD4⁺. Известно, что при некоторых миодистрофиях, например, при миодистрофии Дюшенна и дисферлинопатиях, может наблюдаться воспалительная инфильтрация, но периваскулярное положение инфильтратов чаще наблюдается при МЛД [Arahata K. et al., 1995; Frisullo G. et al., 2011].

1.3 Классификация и молекулярно-генетические механизмы развития МЛД

На сегодняшний день известны два генетических типа МЛД, обозначаемых как МЛД1 (MIM: 607903) и МЛД2 (MIM: 158901), причем по фенотипическим проявлениям и вариантам прогрессирования данные типы МЛД друг от друга не отличимы.

1.3.1 Этиопатогенез МЛД 1 типа

МЛД 1 типа наследуется аутосомно-доминантно с неполной пенетрантностью. Наиболее часто отсутствие клинических симптомов отмечается у женщин-носительниц мутации. У 2/3 больных отмечается сегрегация заболевания в семьях, остальные случаи возникают в результате новых мутаций. Примерно в половине семей с *de novo* мутацией зарегистрирован соматический мозаицизм у пробанда или у одного из клинически непораженных родителей [Papa S. et al., 1992].

Локус генома сцепленный с МЛД1 картирован в субтеломерном регионе хромосомы 4q35 с использованием микросателлитных маркеров [Upadhyaya M. et al., 1990; Wijmenga C. et al., 1990]. Данная локализация вскоре подтверждена и в других работах [Mathews K.D. et al., 1992; Upadhyaya M. et al., 1992; Wijmenga C. et al., 1991]. Исследование длин рестрикционных фрагментов региона 4q35 показали, что в большинстве семей с МЛД прослеживалась связь заболевания с уменьшением размера полиморфного фрагмента *EcoRI* ниже порога в 38 тысяч пар нуклеотидов [Wijmenga C. et al., 1992]. Благодаря анализу нуклеотидной последовательности данного фрагмента удалось выявить в нем переменное число тандемно-повторяющихся макросателлитных повторов длиной 3,3 т.п.н., названных D4Z4 [Gabriels J. et al., 1999]. Показано, что МЛД1 вызывается делецией части повторов D4Z4 на хромосоме 4q35, не нарушая при этом последовательности ни одного гена. D4Z4-подобные последовательности широко представлены в геноме и могут быть найдены в прицентромерных и субтеломерных

областях различных хромосом. Максимальная гомология наблюдается для последовательностей повторов D4Z4 в субтеломерных областях хромосом 4 и 10. Среди фенотипически здоровых индивидов массив повторов D4Z4 на хромосоме 4 содержит от 11 до 100 и более единиц, в то время как на хромосоме 10 может варьировать от одной до 100 и более единиц [Deidda G. et al., 1995]. Исследования большого контингента здоровых лиц ($n = 622$) и пациентов с МЛД ($n = 662$) показали, что количество D4Z4 повторяющихся единиц на хромосоме 4 колеблется в общей популяции от 11 до 100 [Butz M. et al., 2003], а у пациентов с МЛД1 наблюдалось от 1 до 10 D4Z4 единиц на одном из аллелей 4-й хромосомы [Lunt P.W., 1998]. Лишь 3,6% пациентов со слабо выраженными клиническими признаками МЛД имели более 10 единиц D4Z4.

Несмотря на то, что высокая гомология D4Z4 единиц на хромосомах 4 и 10 затрудняют определение их хромосомной принадлежности, наличие специфичных полиморфизмов в последовательностях D4Z4 хромосом 4 и 10 позволяет правильно ее идентифицировать. Показано, что D4Z4 последовательности хромосомы 10 чувствительны к расщеплению эндонуклеазой *AvrII* (*BlnI*), в то время как D4Z4 последовательности хромосомы 4, чувствительны к расщеплению эндонуклеазой *XapI* [Bakker E. et al., 1995b]. Эта дифференциальная чувствительность к эндонуклеазам рестрикции, наряду с другими полиморфизмами, обнаруженными позже внутри и вблизи D4Z4 повторов, способствовала изучению динамической структуры тандемов этих повторов на четвертой и десятой хромосомах [Lemmers R.J. et al., 1998]. На основе нескольких популяционных исследований представлена модель, согласно которой во время недавних этапов эволюции гоминид произошли по меньшей мере четыре обмена субтеломерными участками между хромосомами 4 и 10. Это привело к сложной картине распределения повторов D4Z4 на гомологах хромосом 4 и 10. Таким образом выявлены индивиды, имеющие классическую генетическую конфигурацию повторов на 4 и 10 хромосомах, и индивиды со смешанными в разном соотношении повторами на хромосомах 4 и 10 [Lemmers R.J. et al., 1998; Lemmers R.J., van der Vliet P.J., van der Gaag K.J., et al., 2010; Lemmers R.J. et al., 2007].

Несмотря на высокую гомологию этих субтеломерных повторяющихся массивов, МЛД1 развивается только при уменьшении количества повторов D4Z4 на аллелях хромосомы 4 [Wijmenga C. et al., 1993]. Это указывает на то, что уникальные генетические

особенности хромосомы 4 являются необходимыми для проявления МЛД. Более того, наличие по меньшей мере, одной единицы D4Z4 необходимо для проявления МЛД, поскольку полные делеции массива D4Z4 хромосомы 4 не приводят к развитию МЛД1 [Tupler R. et al., 1996]. Для объяснения явной специфичности вовлечения 4 хромосомы в патогенез МЛД1 предложены различные модели. В некоторых исследованиях показано, что массив повторов D4Z4 длиной от 40 до 60 т.п.н. действует как барьер между гетерохроматином теломер и проксимальными белок-кодирующими последовательностями. Поэтому, существовала гипотеза, согласно которой укорочение повторов ведет к нарушению этого барьера, что приводит к распространению гетерохроматина в центромерном направлении и последующему ингибированию проксимально расположенных генов, которые являются уникальными для хромосомы 4 [Winokur S.T. et al., 1994]. Вторая модель предполагает, что гетерохроматиновый характер самого D4Z4 повтора ответственен за регулирование рядом расположенных генов посредством конденсации и деконденсации хроматина. При уменьшении количества D4Z4 повторов это регулирование нарушается, приводя к эктопической экспрессии проксимально расположенных генов на хромосоме 4 [Gabellini D. et al., 2002].

Кроме последовательностей ДНК, типичных для конститутивного гетерохроматина, каждая единица D4Z4 содержит копию последовательности транскрипционного фактора *DUX4*, кодирующего различные его изоформы [Dixit M. et al., 2007; Gabriels J. et al., 1999; Hewitt J.E. et al., 1994; Snider L. et al., 2009]. Однако последовательности *DUX4* внутри повторов не содержат такой важный элемент как сигнал полиаденилирования, и возможность трансляции *DUX4* являлась сомнительной.

Картина стала более полной после выявления другой важной характеристики региона 4q35. Популяционные исследования позволили обнаружить наличие двух преобладающих гаплотипов, обозначенных как А и В [Lemmers R.J., van der Vliet P.J., van der Gaag K.J., et al., 2010]. Частота их встречаемости приблизительно равна 50%. Важным различием между этими гаплотипами является то, что только гаплотип А содержит последовательность полиаденилирования мРНК *DUX4* и ассоциирован с экспрессией белка *DUX4* [van Geel M. et al., 2002].

На сегодняшний день остается плохо изученным механизм деконденсации хроматина в регионе 4q35 и активации транскрипции *DUX4* у пациентов с МЛД.

Как известно, двунаправленная транскрипция tandemных повторов, приводящая к образованию двухцепочечных РНК, является распространённым механизмом, регулирующим образование гетерохроматина. Такие РНК могут изменять экспрессию регулируемых генов за счет привлечения специфических белков регуляторов структуры хроматина [Lejeune E. et al., 2011; Pal-Bhadra M. et al., 2004; Probst A.V. et al., 2010; Sabin L.R. et al., 2013; Volpe T.A. et al., 2002]. Кроме белок-кодирующих изоформ *DUX4* с повторов D4Z4 4 хромосомы транскрибируется ряд длинных некодирующих РНК (днРНК) [Snider L. et al., 2009; Snider L. et al., 2010]. Наиболее интересной из них является днРНК DBE-T, транскрипция которой наблюдается при МЛД1 но отсутствует у здоровых индивидов [Cabianca D.S. et al., 2012]. С помощью методики иммунопреципитации хроматина обнаружено, что транскрипт DBE-T входит в состав белкового комплекса Триторакс, участвующего в деконденсации хроматина. Связывание белков комплекса Триторакс с D4Z4 единицами происходит благодаря комплементарному взаимодействию транскрипта DBE-T и участка повтора D4Z4 (D4Z4-связывающий элемент — DBE), расположенного проксимальнее последовательности *DUX4* [Cabianca D.S. et al., 2012]. На миогенных клетках, полученных от пациентов с МЛД1, показано, что DBE-T связывается с D4Z4-проксимальным регионом только укороченного аллеля, регулируя дерепрессию генов локуса 4q35, в том числе и *DUX4*. Активация транскрипции с локуса 4q35 происходит посредством привлечения белка ASH1L комплекса Триторакс [Cabianca D.S. et al., 2012]. ASH1L является метилтрансферазой, участвующей в метилировании гистонов промоторов множества генов и приводит к активации их транскрипции [Gregory G.D. et al., 2007; Tanaka Y. et al., 2007; Yuan W. et al., 2011]. Напротив, в клетках здоровых индивидов неукороченные массивы D4Z4 демонстрируют повышенное связывание с конденсирующим хроматин комплексом белков Поликомб и отсутствие транскрипции DBE-T. Вместе эти результаты поддерживают модель, согласно которой присутствие укороченного массива D4Z4 способствует связыванию Триторакс белков и активации транскрипции *DUX4* у пациентов с МЛД1.

Как упоминалось выше, помимо генов днРНК, единицы D4Z4 содержат один белок-кодирующий ген *DUX4*. Исследования функции белка *DUX4* указывают на его роль в качестве транскрипционного фактора генов апоптоза, иммунного ответа и дифференциации стволовых клеток. Было показано, что мРНК *DUX4* полиаденилируется

только в клетках мышц больных с МЛД [Dixit M. et al., 2007]. Впоследствии оказалось, что мРНК DUX4 присутствует также в клетках скелетных мышц здоровых людей, хотя в образцах больных отмечен более высокий уровень ее экспрессии [Snider L. et al., 2009]. Кроме того, было показано существование двух изоформ мРНК DUX4, с которых считывается как полноразмерный белок (DUX4-fl), так и белок, укороченный с С-конца (DUX4-s). В мышечных биоптатах здоровых индивидов была выявлена экспрессия только изоформы DUX4-s, в то время как в образцах больных МЛД обнаруживалась экспрессия DUX4-fl, что может указывать на то, что именно изоформа DUX4-fl может быть причиной патологических изменений в мышцах [Snider L. et al., 2010]. При этом оба транскрипта, DUX4-fl и DUX4-s, имели очень низкий уровень экспрессии, что требовало большого числа циклов ПЦР для достоверного их обнаружения. Было неясно, как такое низкое содержание мРНК, присутствующей в концентрации менее одной копии на ядро, может вызвать заболевание. Оказалось, что основное количество мРНК DUX4-fl и соответствующего белка производит лишь небольшое число ядер в миофибрилле, кроме того, данные ядра демонстрировали преапоптотические изменения. Известно, что миофибриллы содержат большое количество ядер и экспрессия мРНК одного ядра оказывает влияние на соседние ядра [Tassin A. et al., 2013].

Последствия активности DUX4 белка в скелетных мышцах изучены недостаточно [Bourque G. et al., 2008]. Кроме мышечной ткани DUX4 экспрессируется в спермогониях и сперматоцитах. Однако, в составе экзонов и последовательности полиаденилирования DUX4-fl между герминальными клетками и мышечными клетками пациентов с МЛД имеются существенные отличия [Snider L. et al., 2010]. Возможно, что данные различия могут объяснить деструктивные последствия экспрессии DUX4-fl в мышечных клетках при МЛД1. Для проверки данной гипотезы необходимы дальнейшие исследования.

На функциональную активность DUX4-fl и его роль в патогенезе указывает не только его экспрессия у пациентов с МЛД1, но и эволюционные события, приведшие к его образованию. DUX4 принадлежит семейству генов, кодирующих транскрипционные факторы, содержащие двойной гомеобоксный домен (double homeobox genes). Белки этого семейства имеются только у плацентарных млекопитающих. Предполагается, что предковый содержащий интроны ген, который в некоторых линиях млекопитающих привел к образованию гена *DUXC*, у приматов путем ретропозиции привел к образованию

ретрогена *DUX4*, открытая рамка считывания которого не содержит интронов. Впоследствии у предков приматов произошло приобретение ретрогеном *DUX4* интронов в 3'-нетранслируемой области [Leidenroth A. et al., 2010].

1.3.2 Этиопатогенез МЛД 2 типа

До 5% всех случаев с МЛД относятся ко второму типу – МЛД2. Фенотипические проявления заболевания сходны с таковыми при МЛД1, но пусковые механизмы этих двух форм различны. Важнейшим отличием МЛД2 от МЛД1 является нормальная длина массива D4Z4. Однако, наблюдается выраженное гипометилирование массива D4Z4 обеих пар хромосом 4 и 10. Обязательным условием проявления болезни, также как при МЛД1, является наличие хотя бы одного 4А гаплотипа [Balog J. et al., 2012; de Greef J.C. et al., 2009; van Overveld P.G. et al., 2003; Zeng W. et al., 2009].

Было показано, что в различных семьях с МЛД *DUX4-fl* экспрессируется на различном уровне [Kowaljow V. et al., 2007], кроме того в разных семьях с МЛД1 и МЛД2 наблюдается различное соотношение гипометилирования промотора и кодирующей части гена *DUX4* [Wallace L.M. et al., 2011]. Хотя механизм различий в паттерне метилирования остается не ясным, понятно, что метилирование промоторов влияет на связывание транскрипционных регуляторов, в то время как метилирование кодирующей части может влиять на сплайсинг и появление альтернативных изоформ. Таким образом, эпигенетические факторы могут приводить к дифференциальной экспрессии и стабильности *DUX4-fl*, и в итоге, к различиям в активации нижестоящих мишеней и модификации клинической картины заболевания.

При исследовании семей с МЛД2, не имеющих уменьшенного количества единиц D4Z4 на хромосоме 4, с использованием полноэкзомного секвенирования были найдены мутации в гене *SMCHD1* на хромосоме 18 [Lemmers R.J. et al., 2012]. Исследование большего числа пациентов этой группы подтвердило, что примерно в 85% случаев ген *SMCHD1* содержал варианты отличные от дикого типа. Полученные результаты явились основой для выделения второго генетического типа МЛД. Эксперименты на мышах позволили установить, что основной функцией этого гена является регулирование статуса метилирования моноаллельно экспрессирующихся участков, таких как набор генов X

хромосомы и кластер генов протокадгеринов [Blewitt M.E. et al., 2008; Gendrel A.V. et al., 2012; Gendrel A.V. et al., 2013; Mould A.W. et al., 2013]. В экспериментах на клеточных культурах, полученных от пациентов с МЛД2 и здоровых индивидов, продемонстрировано, что *SMCHD1* ответственен за метилирование последовательностей D4Z4 повторов, при этом, у пациентов с мутантным *SMCHD1* наблюдалось гипометилирование последовательностей D4Z4 и повышенный уровень экспрессии генов мишеней DUX4 [Mason A.G. et al., 2017]. Эксперименты по нокдауну и по пропуску экзонов подтвердили, что в мышечных клетках, содержащих гаплотип 4А, уменьшение уровня экспрессии *SMCHD1* либо экспрессия его мутированных копий, приводит к дерепрессии DUX4 [Lemmers R.J. et al., 2012]. Таким образом, на основании имеющихся на сегодняшний день данных, можно заключить, что МЛД2 является дигенным заболеванием, требующим для своего развития мутацию в *SMCHD1* и наличие массива повторов D4Z4 сцепленного с 4А гаплотипом.

Мутации в гене *SMCHD1* были обнаружены и у пациентов с МЛД1, имеющих уменьшение D4Z4 единиц. При этом у данных пациентов наблюдалось несоответствие между тяжестью клинических проявлений и укорочением массива D4Z4. Так, пограничные значения в 9 повторов давали необычно тяжелые проявления, указывая на то, что мутации в *SMCHD1* влияют на пенетрантность и экспрессивность МЛД [Larsen M. et al., 2015a].

1.4 Современные методики молекулярно-генетической диагностики МЛД

Как отмечено выше, D4Z4-подобные последовательности широко распространены в геноме человека, достигая 98% гомологии между районами хромосом 4q35 и 10q26. Это обстоятельство усложняет диагностику МЛД. На сегодняшний день «золотым» стандартом в определении числа единиц в тандеме повторов D4Z4 является гибридизация по Саузерну. Для этого геномная ДНК подвергается рестрикции парами эндонуклеаз *EcoRI* и *AvrII*, *EcoRI* и *XapI*, после чего полученные фрагменты ДНК разделяются с помощью пульс-электрофореза и гибридизуются с меченой пробой p13E-11 (D4F104S1) [Busse K. et al., 2000]. Данная проба комплементарна участку проксимальнее массива повторов D4Z4. Наличие сайтов рестрикции *AvrII* в повторах D4Z4 на хромосоме 10 в

районе q26 и их отсутствие на хромосоме 4 в районе q35, и наоборот – наличие сайтов рестрикции *XapI* в повторах D4Z4 на 4q35 и их отсутствие на 10q26 позволяет определять принадлежность массивов повторов D4Z4 к той или иной хромосоме. Для подтверждения диагноза МЛД1 обязательным является обнаружение укороченного тандема повторов D4Z4 хромосомы 4 ниже порогового уровня в 11 единиц (<38 т.п.н.).

Следующим важным моментом, который необходимо учитывать при диагностике МЛД, является то, что исключительно укорочение массива повторов D4Z4 недостаточно для проявления заболевания. Другим необходимым условием развития МЛД является наличие сцепления гаплотипа 4А с укороченным массивом повторов D4Z4.

В том случае, когда при определении гаплотипа выявлен 4А аллель, однако делеция в нем отсутствует, либо делеция затрагивает 4В аллель, следующим шагом является определение статуса метилирования 4А аллеля/аллелей. Для этого геномную ДНК обрабатывают смесью включающей эндонуклеазы *AvrII* и метилчувствительные эндонуклеазы *SmaI* либо *CpoI* с последующим электрофорезом и гибридизацией по Саузерну [de Greef J.C. et al., 2007; van Overveld P.G. et al., 2003]. Таким образом определяется статус метилирования CpG пар в проксимальной и внутренних D4Z4 единицах. Общепринятым критерием, позволяющим исключить диагнозы МЛД1 и МЛД2, является уровень метилирования исследуемых участков более 25% [de Greef J.C. et al., 2009; van Overveld P.G. et al., 2003]. В различных исследованиях было показано, что статус метилирования промотора и кодирующей части гена *DUX4* влияет на его экспрессию и сплайсинг [Balog J. et al., 2015; Haynes P. et al., 2018]. Однако такого рода анализы не дают информацию об уровне метилирования дистального D4Z4 повтора, с которого и происходит экспрессия *DUX4*.

Для решения этой проблемы в недавних работах [Jones T.I. et al., 2014] использовали бисульфитное секвенирование дистальных D4Z4 единиц из образцов донорских миобластов, что позволило получить убедительные доказательства влияния статуса метилирования дистального повтора на пенетрантность и экспрессивность МЛД. При этом установленный уровень метилирования дистальной D4Z4 единицы для больных и здоровых составил 7% и 71%, соответственно. Следующим важным шагом при наличии гипометилирования является поиск мутаций в генах регуляторах компактизации хроматина [Larsen M. et al., 2015a; Lemmers R.J. et al., 2012]. На данный момент показано,

что мутации в гене *SMCHD1* приводят к развитию МЛД2. Сложность анализа первичной структуры гена *SMCHD1* состоит в том, что он имеет большую длину, содержит 48 экзонов и кодирует мРНК размером 8672 п.н. Согласно последним публикациям, в гене *SMCHD1* обнаружено 187 вариантов, имеющих клиническое значение [Lemmers R. et al., 2019]. Хотя при МЛД2 встречается весь спектр мутаций на всей протяженности гена, наблюдается статистически значимое накопление миссенс-вариантов в АТФ-азном домене. Учитывая довольно большой размер гена *SMCHD1*, применение высокопроизводительного секвенирования (NGS) является наиболее подходящим диагностическим методом поиска мутаций в таком протяженном гене.

Подводя итог можно заключить, что молекулярно-генетическое подтверждение диагноза МЛД осложнено следующими факторами: для анализа требуется большое количество (около 10 микрограмм) высокомолекулярной ДНК (>300 т.п.н.); существует сложность дифференциации между последовательностями массивов повторов D4Z4 хромосом 4 и 10 из-за их высокой гомологии; требуется определение точного числа повторов D4Z4 в отдельности на каждом из аллелей четвертой хромосомы; требуется определение гаплотипов укороченных аллелей массивов D4Z4. В дополнение, для диагностики МЛД2 требуется определение статуса метилирования массивов повторов D4Z4 и поиск мутаций в генах-регуляторах статуса метилирования хроматина.

Таким образом, описанные критерии молекулярно-генетической диагностики сильно затрудняют верификацию диагноза МЛД для лабораторий.

1.4.1 Гибридизация по Саузерну

На сегодняшний день гибридизация по Саузерну является золотым стандартом молекулярно-генетической диагностики МЛД. Дифференциация D4Z4 массивов к 4 или 10 хромосоме основана на дифференциальной рестрикции геномной ДНК специфическими эндонуклеазами. Анализируемый образец ДНК разделяется на три равные части и подвергается обработке соответствующими эндонуклеазами. Первая часть образца обрабатывается эндонуклеазой *EcoRI*. Сайты рестрикции *EcoRI* локализованы на расстоянии 3,5 т.п.н. проксимальнее и дистальнее тандема повторов D4Z4. С помощью *EcoRI* неспецифично вырезаются тандемы D4Z4 хромосомы 4 и 10.

Таким образом возможно определить число единиц D4Z4 в тандемах, однако такой анализ не дает информацию о хромосомной принадлежности обнаруженных тандемов.

Вторая часть образца обрабатывается парой эндонуклеаз *EcoRI* и *AvrII*. Сайты рестрикции *AvrII* специфично локализованы в последовательностях D4Z4 на хромосоме 10, таким образом после использования смеси *EcoRI/AvrII* из анализа элиминируются только повторы D4Z4 10-й хромосомы, а детектируются только тандемы D4Z4 4-й хромосомы. Таким образом определяется число единиц D4Z4 в тандеме для каждого из аллелей хромосомы 4.

Третья часть образца ДНК обрабатывается смесью рестриктаз *EcoRI/XapI*. Сайты рестрикции эндонуклеазы *XapI* специфично расположены в последовательности хромосомы 4. Таким образом после обработки данной смесью рестриктаз из анализа элиминируется массивы D4Z4 хромосомы 4, а для тандемов 10-й хромосомы определяется число единиц D4Z4 для каждого из аллелей.

Полученные образцы ДНК, обработанные соответственно эндонуклеазами *EcoRI*, *EcoRI/AvrII*, *EcoRI/XapI* разделяются в агарозном геле методом пульс-электрофореза и переносятся на нейлоновую мембрану для последующей гибридизации с ДНК-пробой p13e11, расположенной проксимальнее массива повторов. В том случае, если образец имеет 4 аллеля массива повторов D4Z4 разной длины после гибридизации, на мембране будут детектироваться: четыре бенда на дорожке *EcoRI*, два бенда на дорожке *EcoRI/AvrII* (аллели 4-й хромосомы), два бенда на дорожке *EcoRI/XapI* (аллели 4-й хромосомы). Длина каждого бенда устанавливается в соответствии с длиной маркера молекулярного веса. По полученной длине судят о количестве повторов D4Z4.

Для А/В гаплотипирования методикой гибридизации по Саузерну образец обрабатывается эндонуклеазой *HindIII*. Полученные фрагменты ДНК разделяются в агарозном геле методом пульс-электрофореза и переносятся на нейлоновую мембрану. Мембрана гибридизуется отдельно с пробой А либо В [Lemmers R.J. et al., 2002], при детекции делается вывод о принадлежности интересующего массива D4Z4 к тому или иному гаплотипу.

Гибридизация по Саузерну используется для диагностики МЛД в течении многих лет, поэтому преимущества и недостатки этого метода хорошо известны. Для

определения размеров тандемов D4Z4 аллелей 4 и 10 хромосомы, а также их гаплотипирования требуется 10-12 микрограмм высокомолекулярной геномной ДНК. Гибридизационные мембраны с перенесенными на них образцами рестрицированной геномной ДНК могут быть использованы в нескольких циклах гибридизации и отмывки проб, это позволяет использовать одну мембрану для определения длин тандемов D4Z4 и их гаплотипов, а в некоторых случаях и для определения гибридного состава интересующих аллелей. Кроме того, мембраны могут храниться в течении многих лет, не требуя особых условий хранения. Согласно имеющимся на сегодняшний день протоколам, полный цикл диагностики МЛД методом гибридизации по Саузерну занимает 5 дней.

Однако у данной методики существуют некоторые ограничения. Как упоминалось выше, для проведения диагностики требуется около 10-12 микрограмм высокомолекулярной геномной ДНК, это требует использования 15-20 мл. свежей незамороженной крови. Чувствительность методики гибридизации по Саузерну бывает недостаточна в тех случаях, когда у обследуемого индивида наблюдается мозаицизм с низкой представленностью патогенного аллеля. Другая трудность — это диагностика МЛД у индивидов с так называемыми гибридными массивами D4Z4. Такие аллели содержат D4Z4 повторы как 4-й, так и 10-й хромосом в случайном порядке. В различных популяциях частота гибридных аллелей может сильно варьировать. Так, в совокупности, наиболее часто гибридные массивы повторов D4Z4 хромосомы 4 наблюдались в африканской популяции, достигая 47,7%, а минимальные значения равные 2,8% обнаружены в смешанной выборке популяций Китая и Японии. Разница в частотах гибридных аллелей 10-й хромосомы не столь выражена как для 4-й хромосомы и составляет 11,8% в смешанной выборке популяций Китая и Японии, и 0,6 % в европейской популяции [Lemmers R.J., van der Vliet P.J., van der Gaag K.J., et al., 2010; Rossi M. et al., 2007; van Overveld P.G. et al., 2000]. Для данных аллелей затруднительно установить их патогенность, т.к. сложно установить хромосомную принадлежность последнего повтора D4Z4. Следующее ограничение методики гибридизации по Саузерну с использованием пробы p13e11 — это невозможность определения длины массивов D4Z4 при делеции региона p13e11 ввиду отсутствия сайтов гибридизации для одноименной пробы. Наконец, сама процедура гибридизации по Саузерну требует

дорогостоящего специфического оборудования и реагентов, которые, по большей части не доступны для стандартных диагностических лабораторий.

1.4.2 Метод молекулярного комбинга

В последнее десятилетие метод молекулярного комбинга (molecular combing) или Fiber-FISH стал вторым по частоте использования для диагностики МЛД1. Этот метод позволяет одновременно дифференцировать хромосомную локализацию массива повторов D4Z4, определять их количество в массиве на каждой хромосоме, а также дистальный гаплотип [Nguyen K. et al., 2011]. Метод заключается в гибридизации набора проб меченых различными флуоресцентными красителями, комплементарных интересующим регионам хромосом 4 и 10, с равномерно растянутыми и выровненными на покровном стекле индивидуальными молекулами ДНК, последующей визуализацией и анализом гибридизационной картины. По литературным данным, метод молекулярного комбинга имеет ряд преимуществ по сравнению с классическим подходом с использованием гибридизации по Саузерну, особенно в случаях с близким к норме числом повторов D4Z4, наличием мозаицизма или хромосомных перестроек, которые затрагивают регионы 4q/10q [Vasale J. et al., 2015]. Кроме того, данный метод нашел применение в области исследования репликации ДНК, ДНК-белковых взаимодействий, *in vitro* транскрипции, геномных перестроек и анализе повторяющихся последовательностей ДНК.

Имеющаяся коммерческая платформа (Genomic Vision, France) для проведения диагностики МЛД предполагает четырехстадийный процесс: на первом этапе, концы молекул высокомолекулярной ДНК фиксируются на покровном стекле, обработанным специальным образом; на втором этапе, полученные стекла с фиксированными молекулами ДНК поднимаются вертикально с постоянной скоростью 300 мкм/сек. из раствора с ДНК, при этом единичные молекулы ДНК растягиваются вдоль вертикальной оси; на третьем этапе, полученные покровные стекла гибридизуются с интересующими FISH-пробами; на четвертом этапе, проводится детекция флуоресцентного сигнала и его компьютерная обработка. В итоге удается получить изображения единичных молекул

ДНК, гибридизованных с пробами к тандемам повторов D4Z4, гаплотип-специфичным последовательностям и последовательностям специфичным для хромосомы 4 либо 10.

На сегодняшний день имеющаяся коммерческая платформа для молекулярного комбинга позволяет одновременно проводить диагностику МЛД для 4 образцов за 3-4 дня. В результатах анализа присутствуют данные о длине всех аллелей массива повторов D4Z4 хромосом 4 и 10, гаплотипах данных аллелей, уровне мозаицизма и перестройках массивов. Основным ограничением использования данной методики является высокая стоимость оборудования и реагентов. Кроме того, бывает затруднительно определить принадлежность к хромосомам 4 или 10 в случае гибридного состава массива повторов D4Z4.

1.4.3 Методы, основанные на использовании ПЦР

1.4.3.1 STR-гаплотипирование

Многие семьи, имеющие пациентов с МЛД заинтересованы в проведении предимплантационного генетического тестирования (ПГТ). Однако такая диагностика подразумевает использование единичных клеток для анализа, таким образом гибридизация по Саузерну и молекулярный комбинг не подходят для ПГТ при МЛД. Barat-Houari с соавторами провели поиск STR-маркеров сцепленных с массивами повторов D4Z4 на 4-й хромосоме [Barat-Houari M. et al., 2010]. В данной работе были исследованы STR-маркеры D4S2390, D4S1652, D4S2930 и D4S1523, локализованные проксимальнее массива повторов D4Z4. Несмотря на высокую гетерозиготность данных маркеров (67-91%), из-за высокого риска рекомбинации и отсутствия маркеров дистальнее массива D4Z4, авторы не рекомендовали использование данных маркеров для ПГТ при МЛД.

1.4.3.2 SSLP и 4qA гаплотипирование

Для хромосом 4 и 10 охарактеризованы различные гаплотипы на основе полиморфизма длин простых последовательностей (SSLP), локализованных

проксимальнее массива повторов D4Z4 и однонуклеотидных полиморфизмов дистальнее тандема повторов D4Z4 [Lemmers R.J. et al., 2007].

Всего описано 9 SSLP-гаплотипов. Среди них для гаплотипа 4qA161 показана наибольшая частота встречаемости (86%), кроме того, данный гаплотип специфичен для МЛД, а для гаплотипов 4qA163, и 4qA166 сцепление с МЛД показано не было. Аллели хромосомы 10 менее гетерогенны и представлены гаплотипами 10qA166 (96%) и 10qA164 (4%).

Простую и информативную дифференциальную диагностику для определения гаплотипов, предложил Tsumagari с коллегами [Tsumagari K. et al., 2010]. Для определения принадлежности к 4А либо 4В гаплотипу авторы использовали различия в последовательностях 4А и 4В и разработали два подхода, основанных на секвенировании по Сенгеру и рестрикционном анализе участков дистальнее повторов D4Z4 с высоким содержанием SNP.

Альтернативный подход к определению гаплотипов был предложен Paranikos с соавторами [Paranikos F. et al., 2014]. В этой работе было предложено использовать ПЦР с аллель-специфичными праймерами для обнаружения пермиссивных 4qA161 гаплотипов на укороченном 4qA аллеле. Методика была протестирована на 36 неродственных пробандах, 3-х семьях (4 члена в каждой) и 38 контролях (5 здоровых родственников и 33 неродственных индивида). В качестве референсных образцов использовались: фаговый клон λ 260201, крысиные монохромосомные соматические гибридные клетки 4L10, космида С85, представляющие 4qA161, 4В163 и 10qA166 гаплотипы соответственно. При использовании трех ПЦР-систем, в совокупности позволяющих определить принадлежность к гаплотипу 4qA161, авторы успешно гаплотипировали исследуемые образцы и предложили методику для косвенной диагностики МЛД1.

1.4.3.3 Нанопоровое секвенирование

Секвенирование полной последовательности массива D4Z4 по Сенгеру либо с использованием NGS-методик не представляется возможным. Однако появление нанопорового секвенирования делает возможным секвенирование полной длины массива повторов за одно прочтение. Имеющаяся на сегодняшний день коммерческая платформа (Oxford Nanopore, UK) позволяет получать ультрадлинные прочтения с показателем N50

> 100 т.п.н. [Jain M. et al., 2018]. Возможность использования нанопорового секвенирования для определения числа повторов D4Z4 была показана [Mitsuhashi S. et al., 2017]. Применив ВАС клоны, авторы подтвердили наличие 13 повторов в массиве D4Z4. Теоретически, нанопоровое секвенирование может стать наиболее информативным методом диагностики МЛД, однако на текущий момент, для применения данного метода в качестве диагностического необходимо больше экспериментальных данных.

1.4.3.4 Прямая детекция DUX4

Используемые в настоящее время методы диагностики характеризуют состояние локуса D4Z4 и тем самым позволяют косвенно установить наличие экспрессии гена *DUX4* — основного этиологического фактора развития МЛД. Прямая детекция экспрессии *DUX4* в мышечных клетках пациентов, на сегодняшний день затруднена по следующим причинам: во-первых, *DUX4* экспрессируется на довольно низком уровне, что может явиться причиной ложноотрицательных результатов [Jones T.I. et al., 2012; Snider L. et al., 2010]; во-вторых, экспрессию *DUX4-fl* в биоптатах от пациентов с МЛД удается обнаружить не всегда в связи с рядом биологических особенностей :

- в биоптате могут отсутствовать ядра, экспрессирующие *DUX4-fl* [Bosnakovski D. et al., 2018];
- как и большинство транскрипционных факторов, *DUX4* экспрессируется в пульсирующем режиме [Newlands S. et al., 1998], поэтому в некоторые моменты времени невозможно обнаружить экспрессию *DUX4-fl*;
- не удается обнаружить транскрипт *DUX4-fl* в биоптатах из сильно пораженных мышц, в которых произошла потеря большого числа миотубул и выражен фиброз [Tassin A. et al., 2013].
- экспрессия *DUX4-fl* является ранним событием в патогенезе, на более поздних стадиях она отсутствует из-за гибели продуцирующих его ядер [Bosnakovski D. et al., 2008].

В-третьих, на сегодняшний день нет работ, показывающих корреляции между уровнем транскрипта *DUX4-fl* в определенных группах мышц пациентов и прогрессированием заболевания. Кроме того, необходимы исследования корреляцию

уровня экспрессии и возраста начала заболевания, а также изучение экспрессии DUX4-fl у бессимптомных носителей.

Таким образом, к настоящему времени идентифицированы два генетических варианта МЛД, диагностика которых имеет специфические особенности. Так, в основе возникновения МЛД 1 типа лежит уменьшение количества D4Z4 единиц в области хромосомы 4q35, приводящее к ремоделированию субтеломерного хроматина и активации экспрессии гена *DUX4*. При МЛД1 основными методами диагностики являются гибридизация по Саузерну и молекулярный комбинг. Ключевую роль в патогенезе МЛД2 играет сочетание мутации белка SMCHD1, ремоделирующего хроматин, и пермиссивного гаплотипа 4А хромосомы 4q35. Диагностика МЛД2 методами NGS проводится после исключения МЛД1.

Ввиду того, что МЛД1 встречается в 95% случаев, данная работа сфокусирована на разработке диагностике МЛД1, позволяющей обойти ограничения, связанные с гибридизацией по Саузерну и молекулярным комбингом.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

Выборка пациентов и их родственников была сформирована на основе клинико-диагностических признаков, характеризующих МЛД. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ». От всех обследованных пациентов и их родственников получены информированные согласия на участие в исследовании.

В исследование включены 129 пациентов с клиническими признаками МЛД и 47 фенотипически здоровых родственников. Клинический диагноз поставлен на основе анамнестических данных и анализа фенотипической картины.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Выделение геномной ДНК из лимфоцитов крови

Наиболее удобным и доступным материалом для диагностики МЛД является геномная ДНК, выделенная из крови. Важным моментом на этом этапе является получение как можно более цельной, полноразмерной геномной ДНК. Выделение может производиться с использованием двух методов:

- выделение геномной ДНК из цельной крови в агарозных блоках;
- выделение геномной ДНК из лимфоцитарной фракции в агарозных блоках, с использованием метода фиколяльного градиента.

2.2.1.1 Выделение геномной ДНК из цельной крови в агарозных блоках

1. Образцы венозной крови (5-10 мл) перенести в чистые 50 мл пробирки и добавить лизирующий буфер (EDTA 1 mM pH 8.0; KHCO_3 10 mM; NH_4Cl 155mM) до конечного объема в 50 мл. Плавно перемешать.

2. Полученную смесь инкубировать на ледяной бане в течении 5-15 минут, пока не произойдет лизис эритроцитов (раствор темнеет, приобретая окраску по типу «лаковая кровь»).

3. Центрифугировать полученную смесь при 1600 об/мин (400 g), 20°C, 8 минут.
4. Аккуратно удалить надосадочную жидкость до остаточного объема 5 мл.
5. Ресуспендировать осадок в остаточном объеме.
6. Добавить лизирующий буфер до конечного объема 15 мл, плавно перемешать.
7. Инкубировать полученную смесь на ледяной бане 5 минут.
8. Центрифугировать полученную смесь при 1600 об/мин (400 g), 20°C, 8 минут.
9. Удалить супернатант. Дать стечь остаткам раствора на дно пробирки (примерно 2 мин.), аккуратно убрать остатки жидкости пипеткой, не забирая осадка.
10. К осадку добавить SE-буфер (NaCl 75 mM; EDTA 25 mM pH 8,0) из расчета 1 мл SE-буфера на 10 мл крови. Ресуспендировать осадок до полной гомогенизации.
11. К полученной смеси добавить 0,5 объема жидкой (50°-60°C) 1,4% агарозы («PCR Low Melt Agarose», BioRad, #1613114). Т.о. конечная концентрация агарозы составляет 0,7%.
12. Полученную смесь перенести пипеткой в пластиковые формы («Plug Molds», BioRad, #1703713), оставить до полимеризации агарозы (для ускорения процесса полимеризации, формы можно поместить на +4°C). Важно не дать пересохнуть агарозе.
13. Подготовить 10 мл депротеинизирующей смеси: 9,7 мл. буфера (NaCl 75 mM; EDTA 25 mM pH 8,0; N-lauroyl-sarcosine 1%); 300 мкл протеиназы К (сток: 20 мг/мл).
14. Агарозные блоки, после полимеризации, поместить в депротеинизирующую смесь и инкубировать при +37°C в течении 2 суток.
15. Удалить депротеинизирующую смесь, добавить 10 мл дистиллированной воды, аккуратным перемешиванием промыть остатки депротеинизирующего раствора, удалить воду.
16. Добавить к агарозным блокам 10 мл 0.5M EDTA pH 8.0. Указать примерную концентрацию ДНК в агарозном блоке из расчета, что 10 мл крови содержат около 140 мкг ДНК.
17. Хранить агарозные блоки при +4°C.

2.2.1.2 Выделение геномной ДНК из лимфоцитарной фракции в агарозных блоках, с использованием метода фиколевого градиента

1. Свежую венозную кровь (5-10 мл) развести в равном объеме среды DPBS (ПанЭко, Россия). В 15 мл пробирки внести 5 мл фикола (плотность 1,077, ПанЭко, Россия)
3. Аккуратно наложить 10 мл смеси кровь/DPBS на поверхность фикола.
4. Центрифугировать при 20°C, 40 мин, 1600 об/мин (400g), без торможения.
5. Отобрать лимфоцитарную фракцию из области интерфазы в новую 15 мл пробирку.
6. Добавить 10 мл 1x DPBS (ПанЭко, Москва, Россия). Аккуратно перемешать.
7. Центрифугировать при 20°C, 10 мин, 1600 об/мин (400g).
8. Удалить надосадочную жидкость, дать отстояться 1-2 минуты, пипеткой отобрать остаток надосадочной жидкости.
9. К осадку добавить SE-буфер (NaCl 75 mM; EDTA 25 mM pH 8,0) из расчета 1 мл SE-буфера на 10 мл крови. Ресуспендировать осадок до полной гомогенизации.
10. К полученной смеси добавить 0,5 объема жидкой (50°-60°C) 1,4% агарозы (PCR Low Melt Agarose, BioRad, #1613114). Т.о. конечная концентрация агарозы составляет 0,7-0,8%.
11. Полученную смесь перенести в пластиковые формы («Plug Molds», BioRad, #1703713), оставить до полимеризации агарозы (для ускорения процесса полимеризации, формы можно поместить на +4°C). Важно не дать пересохнуть агарозе.
12. Подготовить 10 мл депротенинизирующей смеси: 9,7 мл. буфера (75 mM NaCl; 25 mM EDTA pH 8,0; 1% N-lauroyl-sarcosine); 300 мкл протеиназы К (сток: 20 мг/мл).
13. Агарозные блоки, после полимеризации, поместить в депротенинизирующую смесь и инкубировать при +37°C в течении примерно 1,5-2 суток.
14. Удалить депротенинизирующую смесь, добавить 10 мл дистиллированной воды, аккуратным перемешиванием промыть остатки депротенинизирующего раствора, удалить воду.
15. Добавить к агарозным блокам 10 мл 0.5M EDTA pH 8.0. Указать примерную концентрацию ДНК в агарозном блоке (из расчета, что 10 мл крови содержат около 140 мкг ДНК).

16. Хранить агарозные блоки при +4°C.

2.2.2 Проведение рестрикции геномной ДНК в агарозных блоках

Протокол рестрикции ДНК в агарозных блоках выглядит следующим образом:

1. Фрагмент агарозного блока, содержащий примерно 3 мкг ДНК подвергается отмывке в 1х TE буфере (10 mM Tris–HCl pH 7.4, 0,1 mM ЭДТА) 2 раза по 1,5 часа в 2 мл пробирке на качалке при комнатной температуре.

2. Полученный после отмывки фрагмент агарозного блока уравнивается в рестрикционном буфере (2х Tango buffer (Thermo Scientific); 3.3 mM спермидин; 1 mM DTT) в течение двух часов на качалке при комнатной температуре.

3. Перенести фрагмент агарозного блока в 0,6 мл пробирку. Добавить 250 мкл свежего рестрикционного буфера и добавить по 30-40U рестриктаз *EcoRI* и *AvrII* (Thermo Scientific).

4. Инкубировать при +37°C ночь. После инкубации образец готов для пульс-электрофореза.

В качестве контроля сохранности целостности молекул геномной ДНК также подготавливали нерестрицированный образец по выше описанной методике, но без добавления эндонуклеаз рестрикции.

2.2.3 Проведение пульс-электрофореза фрагментов геномной ДНК

2.2.3.1 Пробоподготовка агарозного блока

1. Удалить рестрикционный буфер, не повредив агарозные блоки.
2. К агарозным блокам добавить по 5 мкл 6х загрузочной краски для электрофореза (6х DNA Loading Dye, Thermo Scientific).

2.2.3.2 Подготовка проведения пульс-электрофореза

1. Приборы: электрофорезная камера и гексогональный электрод «Gene Navigator» (Pharmacia Biotech, Sweden), источник питания «2301 MacroDrive 1 Power

Supply» (LKB Bromma, Stockholm, Sweden); пульсация задавалась с помощью блока управления «2015 Pulsaphor Plus Control Unit» (LKB Bromma, Stockholm, Sweden); температура в электрофорезной камере поддерживалась при помощи «2219-001 Multitemp II Thermostatic Circulator» (LKB Bromma, Stockholm, Sweden).

2. Приготовление электрофорезного буфера:

- Приготовить 0,5х ТВ-буфер (Tris base 44,5мМ; Борная кислота 44,5мМ). Необходимый объем буфера – 2,5 литра.
- Добавить 3,8 г DTT (конечная концентрация в буфере 10мМ).
- Перемешать. Использовать в качестве электрофорезного буфера и буфера

для приготовления агарозного геля.

3. Приготовление геля (гель не должен содержать бромистого этидия!):

- Для приготовления 50 мл 0,8% агарозного геля необходимо 0.4 г легкоплавкой агарозы (Certified Low Melt Agarose, BioRad, #1613112), добавить к ней электрофорезный буфер до 50 мл.

- Полученный раствор плавить в микроволновой печи до полного растворения агарозы (не допускать кипения).

- Аналогично приготовить 2% агарозный гель.

- Собрать плашку для заливки геля и 2% гелем залить по краям агарозную пробку. Установить гребенку.

- Расплавленный 0,8% гель остудить до +40-50°C и залить в форму с гребенкой

4. Внести рестрицированный и контрольный нерестрицированный образцы агарозных блоков в лунки геля, оставляя между ними пустую лунку. Лунки геля с агарозными блоками залить 0,8% агарозным гелем для предотвращения выхода агарозного блока из лунки геля.

5. Гель на заливочной платформе поместить в камеру для пульс-электрофореза.

6. В лунки геля, находящиеся между лунками с агарозными блоками, внести по 2,5 мкл (250 нг) маркера Lambda Mix Marker 19 (Thermo Scientific, #SM0231 USA). В крайние левую и правую лунки внести 1 kb ДНК-маркер (СибЭнзим, Россия).

7. Пульс-электрофорез проводить в течении 3.5 часов при температуре буфера +5°C, напряжении 450 В (15.5 В/см) и времени пульса 0.5 сек.

2.2.3.3 Окраска геля

1. После прохождения пульс-электрофореза гель помещается для окрашивания в 300 мл раствора 0.5x TB буфера, содержащий бромистый этидий (1мкл бромистого этидия (сток 10 мг/мл.) на 100 мл буфера) на 5 мин при комнатной температуре.

2. Затем гель помещается в дистиллированную воду для промывки на 20 мин, этот шаг необходимо повторить три раза.

3. После этого гель помещается на трансиллюминатор, фотографируется, определяется схема нарезки.

4. Каждая дорожка геля, содержащая исследуемый и контрольный образец ДНК, нарезается на фрагменты, соответствующие определенной длине маркера молекулярного веса.

5. Отдельно берется образец контрольного геля, не содержащий ДНК, для контроля контаминации геля в электрофорезной камере и влияния чистого геля на ПЦР.

При нарезке геля следует точно сопоставить длины маркера и нарезаемые фрагменты. В случае МЛД1, фрагменты геля, находящиеся в районе от 38 т.п.н. и более содержат непатогенные аллели повторов D4Z4, а фрагменты геля, расположенные в районе от 38 т.п.н. и менее содержат патогенные аллели.

2.2.4 Подбор праймеров

Дизайн праймеров осуществлялся с помощью программного обеспечения Oligo 7. В качестве референсных использованы последовательности GeneBank: AF117653.3 и AY028079.1 относящиеся к хромосомам 4q35 и 10q26 соответственно. При подборе учитывались следующие характеристики праймеров: уникальность для повторов D4Z4 хромосомы 4; длина 20-25 нуклеотидов; температура отжига в пределах 60°-64°С; отсутствие «шпилек» и комплементарности к собственной последовательности и последовательности противоположного праймера.

2.2.5 Методика определения числа макросателлитных повторов D4Z4 методом количественной ПЦР

2.2.5.1 Реагенты и условия ПЦР

ПЦР проводилась в приборе «Step One Plus» (Applied Biosystems, Foster City, USA). Использовались ДНК-полимераза «Smar^{NG}Taq» (Диалат ЛТД, Москва, Россия); 10x ПЦР-буфер («Ampli Taq» Диалат ЛТД, Россия, состав: 166mM (NH₄)₂SO₄; 670mM Tris-HCl (pH 8.8 при 25°C); 0.1% Tween-20); бетаин (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan); раствор MgCl₂ (Диалат ЛТД, Москва, Россия); дезоксинуклеотидтрифосфаты (Диалат ЛТД, Москва, Россия). Неспецифичная пара праймеров, использовавшаяся для подтверждения наличия 6-ти нуклеотидной делеции в последовательностях повторов D4Z4 хромосомы 10: Rep1F 5'-TCCCACCCTCAGGCTCCTC-3; Rep1R1seq 5'-AGTGCAGACCAGGGCGCCG-3'. Пара праймеров и ДНК-зонд для специфичной амплификации последовательностей D4Z4 хромосомы 4: Rep1,5F 5'-GTGCTTGCGCCACCCACGT-3', Rep1R 5'-GCCGCGCGGAGGCGGAG-3'. ДНК-зонд zond2Rep1 5'FAM-AGTCCGTGGTGGGGCTGGGG-BHQ1 3'.

В случае использования фрагмента геля в качестве матрицы для ПЦР проводилась следующая пробоподготовка:

1. Фрагменты геля после пульс-электрофореза плавилась в термостате при +90°C.
2. В 0,6 мл пробирки вносились по 90 мкл воды для ПЦР
3. Отбирались 10 мкл геля каждого из фрагментов расплавленного геля и перенести в 0,6 мл пробирки с водой для ПЦР (т.о. получается разведённый в 10 раз раствор фрагмента геля).
4. Полученная матрица инкубировалась при +90°C в течении 5 мин до использования в ПЦР (для гарантии однородности раствора).
5. Матрица перемешивалась. 10 мкл матрицы использовались в ПЦР.

ПЦР проводилась в объеме 25 мкл. Состав ПЦР-смеси указан в таблице 1.

Таблица 1 – Состав ПЦР смеси для специфичной амплификации повторов D4Z4 хромосомы 4

Реагент	Исходная концентрация	Конечная концентрация
ПЦР-буфер	10x	1x
MgCl ₂	100мМ	2,5мМ
Дезоксинуклеотидтрифосфаты	По 100мМ	По 0,2мМ
Бетаин	6М	1,2мМ
Форвардный праймер (F)	100мкМ	0,4мМ
Реверсный праймер (R)	100мкМ	0,4мМ
ДНК-зонд	100мкМ	1мМ
ДНК-полимераза	5 Ед/мкл	0,05 Ед/мкл
Матрица	Вариабельна	10 мкл (концентрация вариабельна)
Вода	-	Довести объем водой до 25 мкл

Температурный профиль выглядит следующим образом: «горячий старт» при 95°C – 3 мин.; далее 40 циклов: 95°C – 30 сек, 62°C – 5 сек, 72°C – 15 сек, снятие флуоресцентного сигнала.

Типы использованных контролей:

- «К+» состоял из 15 мкл смеси + 8 мкл воды + 2 мкл (50 нг.) геномной ДНК исследуемого образца;
- «К-» состоял из 15 мкл смеси + 10 мкл воды;
- «G+» состоял из 15 мкл смеси + 2 мкл (50 нг.) геномной ДНК исследуемого образца + 8 мкл фрагмента контрольного геля, разведенного водой в 10 раз;
- «G-» состоял из 15 мкл смеси + 10 мкл фрагмента контрольного геля, разведенного водой в 10 раз.

2.2.5.2 Анализ ПЦР-данных

ПЦР проводилась в двух технических повторностях для каждого фрагмента геля. Средние значения пороговых циклов каждого фрагмента геля обрабатывались в программе Microsoft Excel. Обсчет данных ПЦР осуществлялся методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [Livak K.J. et al., 2001].

При расчетах вычислялась разница между двумя типами фрагментов геля: фрагменты вне зоны дорожек и фрагменты дорожки геля. Внутренним контролем служил агарозный гель из зоны вне дорожек, т.к. он отражает контаминированность агарозного геля таргетными молекулами. Таким образом, изменения в типе образцов вне зоны дорожек геля сводятся к нулю. Поэтому уравнение для определения относительной концентрации таргетных молекул в образце сводится к виду:

$$N_{(i)}=2^{-(Ct(i) - Ct(g))}$$

Где $N_{(i)}$ – относительное значение концентрации последовательностей D4Z4 в исследуемом фрагменте геля; $Ct(g)$ – среднее значение порогового цикла в образце контрольного геля «G-»; $Ct(i)$ – среднее значение порогового цикла в исследуемом фрагменте геля. По полученным данным строились гистограммы.

Фрагменты геля с максимальными значениями относительной концентрации D4Z4 указывают на наличие в них таргетных аллелей. Сопоставив положение данных фрагментов геля относительно маркера молекулярного веса, делался вывод о количестве повторов D4Z4 исследуемого аллеля.

2.2.6 Гаплотипирование аллелей массивов D4Z4 с помощью аллель-специфичной ПЦР-системы

Фрагмент геля, содержащий таргетный аллель, использовали в качестве матрицы для ПЦР-гаплотипирования. Пробоподготовка осуществляли аналогично вышеописанной пробоподготовке для определения числа макросателлитных повторов D4Z4 методом количественной ПЦР.

Для определения гаплотипа интересующего аллеля нами была оптимизирована ранее описанная аллель-специфичная ПЦР-система [Papanikos F. et al., 2014]. ПЦР проводилась в приборе «DNA Engine Tetrad 2» (Bio-Rad Laboratories, Veenendaal, The

Netherlands). Реагенты: ДНК-полимераза «Smar^{NG}Taq» (Диалат ЛТД, Москва, Россия); 10x ПЦР-буфер (166mM (NH₄)₂SO₄; 670mM Tris-HCl (pH 8.8 при 25°C); 0.1% Tween-20); диметилсульфоксид (ДМСО) (ПанЭко, Москва, Россия); раствор MgCl₂ (Диалат ЛТД, Москва, Россия); дезоксинуклеотидтрифосфаты (Диалат ЛТД, Москва, Россия).

Праймеры: pLAM-FW 5'- TCTGTGCCCTTGTTCCTCCGT -3', pLAM-RV 5'- CTGATCACCGAAGTTATGTAAACCAA -3'; AS-pLAM 5'- CACAGGGAGGGGGCATTTTA-3'.

ПЦР проводилась в объеме 25 мкл. Состав ПЦР-смеси указан в таблице 2.

Таблица 2 – Состав ПЦР-смеси для определения гаплотипа А массивов повторов D4Z4

Реагент	Исходная концентрация	Конечная концентрация
ПЦР-буфер	10x	1x
MgCl ₂	100mM	3mM
Дезоксинуклеотидтрифосфаты	По 100mM	По 0,2mM
ДМСО	100%	2,5%
форвардный (pLAM-FW) праймер	100мкМ	0,48mM
реверсный (pLAM-RV) праймер	100мкМ	0,24mM
аллельспецифичный (AS-pLAM) праймер	100мкМ	0,48mM
ДНК-полимераза	5 Ед/мкл	0,05 Ед/мкл
Матрица	Вариабельна	10 мкл (концентрация вариабельна)
Вода	-	Довести объем водой до 25 мкл

Температурный профиль выглядел следующим образом: «горячий старт» при 95°C – 3 мин.; далее 38 циклов: 95°C – 15 сек., 62°C – 15 сек., 72°C – 15 сек.; финальная элонгация при 72°C – 2 мин. Типы использованных контролей: «С85» – 10 пг образца космиды С85; «L26» – 10 пг образца космиды λ 260201; «NTC» отрицательный контроль.

ПЦР-продукты разделялись методом горизонтального электрофореза в 1,5-2% агарозном геле. Наличие двух ПЦР-продуктов (242 н.п. и 137 н.п.) свидетельствовало о принадлежности аллеля к гаплотипу 4А; наличие только одного ПЦР-продукта размером 242 н.п. свидетельствовало о принадлежности аллеля к гаплотипу 10А; отсутствие ПЦР-продуктов (при условии должного срабатывания контролей) свидетельствовало об отсутствии в образце аллелей с гаплотипами 4А и 10А.

2.2.7 Трансформация *E.coli* контрольными генетическими конструкциями с известной длиной массивов D4Z4

В качестве контрольных образцов с известной длиной массива повторов D4Z4 использовались следующие генетические конструкции: фаговый клон λ 260201 (3 повтора D4Z4 4-й хромосомы), космида С85 (6 повторов D4Z4 10 хромосомы) [van Deutekom J.C. et al., 1993]. Образцы любезно предоставлены доктором R.J.L.F. Lemmers, Leiden University Medical Center, Netherlands. Клетки *E.coli* были трансформированы данными генетическими конструкциями для их последующего препаративного выделения по следующей методике:

1. Подготовить раствор ДНК С85 либо λ 260201 из расчета 10 нг на 200 мкл компетентных клеток.
 2. В ледяной бане разморозить аликвоту компетентных клеток XL-1 Blue.
 3. К аликвоте компетентных клеток добавить 10 нг ДНК для трансформации.
 4. Инкубировать при +4°C, 30 мин.
 5. Инкубировать при +42°C, 1,5 мин.
 6. Смесь перенести в ледяную баню, инкубировать 2 мин.
 7. Добавить 800 мкл среды LB (Бакто-триптон 1%; Бакто-дрож. экстракт 0,5%; NaCl 1%).
 8. Инкубировать при +37°C, 60 мин.
 9. На чашку Петри с твёрдой средой LB (Бакто-триптон 1%; Бакто-дрож. экстракт 0,5%; NaCl 1%, бакто-агар 1,5%) содержащей ампициллин (25мкг/мл) высеять 50 мкл трансформированной культуры.
 10. Рассеянные бактерии культивировать в течении 16-24 часа.
- Полученные колонии использовать для выделения ДНК.

2.2.8 Выделение контрольных генетических конструкций C85 и λ 260201 из E. coli

Выделение конструкций осуществлялось с помощью набора ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, CA, USA) в соответствии с протоколом производителя:

1. Растить ночную культуру 16-24 часа в богатой среде 2 YT (Бакто-триптон 1,6%; Бакто-дрож. экстракт 1%; NaCl 0.5%) при +37°C, в шейкере-инкубаторе при 220 об/мин.
2. В 1,5 мл пробирку внести максимально возможный объем ночной культуры, центрифугировать 30 сек, при 14000-16000g, удалить надосадочную жидкость;
3. Повторить действия п.2 ещё 2 раза в той же пробирке;
4. Центрифугировать 1 мин, при 14000-16000g. Удалить остатки надосадочной жидкости;
5. Добавить 250 мкл раствора ZymoPURE™ P1 (Red), ресуспендировать.
6. Добавить 250 мкл раствора ZymoPURE™ P2 (Green) и немедленно плавно перемешать, переворачивая пробирку 6-8 раз. Не вортексировать! Инкубировать при комнатной температуре 2-3 минуты, до приобретения раствором прозрачной сиреневой окраски и жидкой консистенции.
7. Добавить 250 мкл охлажденного на водяной бане раствора ZymoPURE™ P3 (Yellow) и тщательно перемешать, переворачивая пробирку. Не вортексировать! После приобретения раствором желтого цвета перемешивать еще 3-4 минуты. Образуется желтоватый осадок.
8. Инкубировать 5 мин на ледяной бане.
9. Центрифугировать 5 минут при 16000g.
10. Аккуратно перенести 600 мкл надосадочной жидкости в новую 1,5 мл пробирку.
11. Добавить 275 мкл ZymoPURE™ Binding Buffer, тщательно перемешать, переворачивая пробирку 8 раз. Не вортексировать!
12. Поместить колонку Zymo-Spin™ II-P в собирательную пробирку и перенести всю смесь, полученную в п. 11, в колонку Zymo-Spin™ II-P.
13. Инкубировать при комнатной температуре 2 мин. Центрифугировать 1 мин, 5000g. Удалить жидкость из собирательной пробирки.

14. Добавить 800 мкл ZymoPURE™ Wash 1 в колонку Zymo-Spin™ II-P. Центрифугировать 1 мин, при 5000g. Удалить жидкость из собирательной пробирки.

15. Добавить 800 мкл ZymoPURE™ Wash 2 в колонку Zymo-Spin™ II-P. Центрифугировать 1 мин, при 5000g. Удалить жидкость из собирательной пробирки.

16. Добавить 200 мкл ZymoPURE™ Wash 2 в колонку Zymo-Spin™ II-P. Центрифугировать 1 мин, при 5000g. Удалить жидкость из собирательной пробирки.

17. Центрифугировать 1 мин, при $\geq 10000g$ для удаления остатков жидкости из колонки.

18. Перенести колонку Zymo-Spin™ II-P в новую 1,5 мл пробирку и добавить 25 мкл ZymoPURE™ Elution Buffer непосредственно на дно колонки. Инкубировать при комнатной температуре в течении 2 мин. Центрифугировать 1 мин, при $\geq 10000g$.

19. Полученный раствор хранить в холодильнике при +4°C.

Качество и количество выделенной плазмидной ДНК проверялось спектрофотометром и стандартным горизонтальным элетрофорезом в 1% агарозном геле.

2.2.9 Выделение ПЦР продуктов из геля

Для выделения ДНК из геля использовалась коммерческая система Cleanup Standard (Евроген, Москва, Россия), в соответствии с протоколом производителя:

1. Вырезать фрагмент геля с целевой ДНК и взвесить. Поместить гель в микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл. Вес геля в мг численно приравнивается к его объему в мкл (100 мг геля = 100 мкл).

2. К гелю добавить 3 объема «Связывающего раствора», но не менее 350 мкл.

ВНИМАНИЕ! При использовании гелей с концентрацией агарозы 1.8% и выше количество «Связывающего раствора» следует увеличить до 4-объемов от объема геля.

3. Инкубировать смесь при 50-55°C до полного растворения геля. Для ускорения растворения рекомендуется перемешивать раствор встряхиванием пробирки.

4. После полного растворения геля дополнительно добавить 1 объем изопропанола на 1 объем геля, смесь перемешать.

5. Поместить спин-колонку в собирательную пробирку.

6. Перенести смесь, полученную в п.4 в спин-колонку и центрифугировать 30 сек, при 7000g. Удалить фильтрат из собирательной пробирки.

7. Добавить 700 мкл «Промывочного раствора» в колонку, центрифугировать 30 сек, при 7000g. Удалить фильтрат из собирательной пробирки.

8. Повторить п.7.

9. Центрифугировать пустую колонку 1 мин для полного удаления промывочного раствора.

10. Поместить колонку в новую 1,5 мл пробирку. Инкубировать при комнатной температуре 5 мин для испарения остатка спирта.

11. Нанести в центр спин-колонки 50 мкл элюирующего раствора.

12. Центрифугировать 30 сек, при 7000g.

13. Хранить при -20°C.

2.2.10 Секвенирование по Сенгеру

Двунаправленное автоматическое прямое секвенирование по Сенгеру осуществлялось лабораторией ЗАО «Евроген» (Москва, Россия). Для анализа хроматограмм сиквенса использовано программное обеспечение «Finch TV 1.4.0» (Geospiza Inc., WA, USA).

2.2.11 Проведение гибридизации по Саузерну

Для определения количества D4Z4 повторов методом Саузерн-блоттинга использовался стандартный протокол диагностики [White S.J. et al.].

2.2.11.1 Рестрикция ДНК в агарозных блоках

Рестрикция в агарозных блоках проводилась по следующей методике:

1. Для каждого образца подготовить по 4 фрагмента агарозного блока, содержание ДНК в каждом фрагменте примерно 3 мкг.

2. Агарозные блоки отмыть в 1x TE буфере (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; ЭДТА 0,1 mM) 2 раза по 1,5 часа в 2 мл пробирке на качалке при комнатной температуре.

3. Агарозные блоки разделить пополам, каждый фрагмент поместить в новую пробирку. На пробирке указать используемые эндонуклеазы рестрикции. (*EcoRI/HindIII*; *EcoRI/AvrII*; *XapI*; *HindIII*).

4. Полученные после отмывки фрагменты агарозного блока уравновесить в рестрикционном буфере (буфер подбирается в соответствии с используемыми эндонуклеазами рестрикции см. табл. 3) в течении двух часов на качалке при комнатной температуре.

5. Далее, фрагменты агарозного блока перенести в 0,6 мл пробирку. Добавить 150 мкл свежего соответствующего рестрикционного буфера (см. табл. 3) и добавить эндонуклеазы рестрикции.

6. Инкубировать при +37°C ночь. После инкубации образец готов для пульс-электрофореза.

Таблица 3 – Состав буферов для проведения реакции рестрикции геномной ДНК в агарозных блоках

Эндонуклеазы рестрикции и их количество на 1 реакцию	Буфер
<i>EcoRI</i> 30 Ед./ <i>HindIII</i> 30 Ед. (Thermo Scientific)	1x R buffer (Thermo Scientific)
<i>EcoRI</i> 30 Ед./ <i>AvrII</i> 20 Ед. (Thermo Scientific)	2x Tango buffer (Thermo Scientific)
<i>XapI</i> 20 Ед. (Thermo Scientific)	1x Tango buffer (Thermo Scientific)
<i>HindIII</i> 30 Ед.(Thermo Scientific)	1x R buffer (Thermo Scientific)

2.2.11.2 Пульс-электрофорез

1. Подготовить 2,5 л электрофорезного буфера: 0,5x TBE (Tris base 44,5мМ; Борная кислота 44,5 мМ; ЭДТА 1 мМ) + 75 мкл бромистого этидия (сток 10 мг/мл). В электрофорезную камеру прибора Chef-DR II System (Bio-Rad Laboratories, Veenendaal, The Netherlands) залить 2,5 л электрофорезного буфера.

2. Подготовить 0,88% агарозный гель (2,65 гр. агарозы (MP agarose, Roche) + 300 мл 0,5x TBE + 4,5 мкл бромистого этидия (сток 10 мг/мл)).

3. Гель залить в форму для заливки (20x20 см).

4. После полимеризации агарозного геля в лунки внести образцы рестрицированной ДНК в агарозных блоках:

- С каждой стороны геля оставить по одной пустой крайней лунке.
- Для определения длин массивов повторов D4Z4 на аллелях 4 и 10 хромосом, в электрофорезный гель внести следующие фрагменты рестрицированных агарозных блоков в указанном порядке: *EcoRI/HindIII*; *EcoRI/AvrII*; *XapI*. Т.о. каждый образец занимает три соседние лунки в агарозном геле.
- Для определения гаплотипа аллелей массивов D4Z4 в лунки геля загрузить агарозные блоки после рестрикции *HindIII*.
- Гель погрузить в электрофорезную камеру

5. В крайние лунки внести MidRange I PFG Marker (NEB, #N0342).

6. Пульс-электрофорез проводился на приборе Chef-DR II System (Bio-Rad Laboratories, Veenendaal, The Netherlands) при следующем цикле пульсации: стартовое время пульсации 1 сек, финальное время пульсации 20 сек; продолжительность цикла 10 часов. Всего два идентичных цикла пульсации. Напряжение 6 В/см. Температура буфера 21,5°C.

7. После завершения пульс-электрофореза перейти к блоттингу.

2.2.11.3 Блоттинг

1. После пульс-электрофореза гель сфотографировать в трансиллюминаторе.

2. Гель перенести в буфер для блоттинга (0,4М NaOH, 0,6М NaCl), инкубировать 15 мин, при комнатной температуре, на шейкере при минимальной скорости.

3. Буфер слить, повторить п.2.

4. Параллельно с п.1-2 подготовить составляющие блотницы указанные на рисунке 1. С мембраной работать в чистых перчатках.

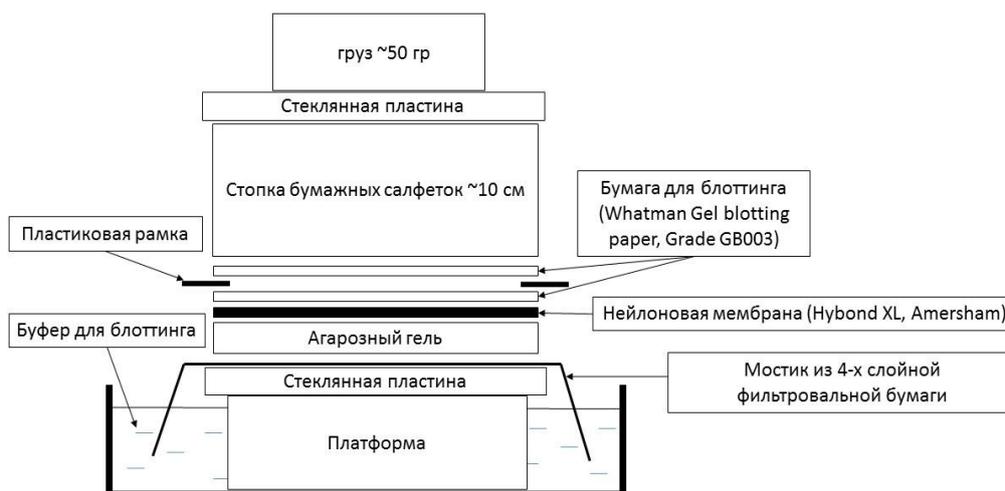


Рисунок 1 – Схема блотницы

5. Собиралась блотницу как указано на рисунке 1. Сторону мембраны, соприкасающуюся с гелем (лицевая сторона) пометить цветной авторучкой. Проверить, чтобы между гелем и мостиком из фильтровальной бумаги, и между гелем и мембраной для блоттинга не было пузырей воздуха.

6. Оставить на ночь.

7. Разобрать блотницу. Мембрану перенести в нейтрализующий буфер (2x SSC буфер (0,3M NaCl; 0,03M $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, pH 7.0), Tris-HCl 0,2M pH 7.5.). Инкубировать 10 мин, при комнатной температуре.

8. Сушить мембрану между двумя листами фильтровальной бумаги.

9. Провести UV-кросслинкинг мембраны с ДНК дозой ультрафиолета 1200 мкРДж на приборе Stratalinker 1800(Stratagene, USA).

10. Хранить высушенную мембрану, завернутую в полиэтиленовую пленку, в темном месте, при комнатной температуре.

2.2.11.4 Гибридизация

Гибридизация по Саузерну с радиоактивно-мечеными ДНК-зондами проводилась на базе лаборатории генетики человека лейденского университетского медицинского центра (Human genetic department, LUMC, Netherlands).

2.2.11.5 Подготовка радиоактивно-меченных ДНК-зондов

Использовать следующие специфичные радиоактивно-меченные ДНК-зонды p13e11 [Wijmenga et al. Nature 1993; 2; 26-30], 4qA, 4qB [Nature Genetics 2002 Oct; 32(2): 235-6.] и D4Z4 [Chromosoma (2007) 116: page 107-116]. Последовательности ДНК-зондов содержатся в плаزمидах pCR2.1-ТОРО (4qA, 4qB, D4Z4) и pBS (p13e11). С целью определения хромосомной принадлежности и длины массивов D4Z4 использовался ДНК-зонд p13e11; с целью определения гаплотипа А использовался ДНК-зонд 4qA; с целью определения гаплотипа В использовался ДНК-зонд 4qB, с целью определения гибридного состава массивов D4Z4 использовался ДНК-зонд D4Z4.

Мечение p13e11, 4qA, 4qB и D4Z4 ДНК-зондов набором «Megaprime™ DNA Labelling System» (GE Healthcare, USA #RPN1607) производилось непосредственно перед гибридизацией (в расчете на 1 мембрану размерами 15x15 см):

1. В зависимости от цели, использовать 1-10 пг плазмиды pCR2.1-ТОРО plasmid D4Z4, либо pBS plasmid p13E-11, либо pCR2.1-ТОРО plasmid 4qA, либо pCR2.1-ТОРО plasmid 4qB;
2. К плазмидной матрице добавить воду для ПЦР до объема 11,5 мкл.
3. Добавить 2 мкл смеси праймеров M13 forward + M13 reverse (по 10 пмоль каждого)
4. Денатурировать полученную смесь при +95°C в течение 5 минут, охладить до комнатной температуры (~ 5 мин). Конденсат со стенок пробирки сбросить на микроцентрифуге.
5. К полученной смеси добавить: 1 мкл фрагмента Кленова (1 Ед.); 4 мкл 5x реакционного буфера; 1,5 мкл [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (сток 3000Ci/мМ).
6. Полученную смесь инкубировать при +37°C в течении 20 мин.
7. Далее добавить 80 мкл Stop mix.
8. Использовать всю полученную смесь для гибридизации.

Мечение ДНК фага λ для получения зондов к маркеру молекулярного веса набором Megaprime™ DNA Labelling System (GE Healthcare, USA #RPN1607) производилось непосредственно перед гибридизацией:

1. Использовать 4 мкл (25 нг) ДНК фага λ в качестве матрицы.
2. Добавить 2 мкл смеси праймеров (Random hexanucleotides 100 пмоль)/

3. Добавить 7,5 воды для ПЦР.
4. Смесь инкубировать при +95°C в течении 5 минут, далее охладить при комнатной температуре 5 мин. Конденсат со стенок пробирки сбросить центрифугированием.
5. Добавить: 1 мкл фрагмент Кленова (1 Ед.); 4 мкл 5x реакционного буфера; 1,5 мкл [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (сток 3000Ci/мМ).
6. Смесь инкубировать при +37°C в течении 20 мин.
7. После чего остановить реакцию добавлением 480 мкл Stop mix.
8. Для гибридизации использовались 2 мкл данной пробы на каждые 100 мкл специфичной пробы (p13e11 либо D4Z4).

2.2.11.6 Проведение гибридизации

1. Гибридизационный буфер нагреть до необходимой температуры. На одну мембрану размером 15x15 см использовать 500 мл гибридизационного буфера.
2. ДНК спермы лосося (концентрация стокового раствора 100 мкг/мл) нагреть до +95°C, и добавить к гибридизационному буферу из расчета 1 мл на 100 мл буфера. Полученный буфер тщательно перемешать.
3. Мембрану погрузить в 500 мл гибридизационного буфера и инкубировать при соответствующей температуре (см. табл. 4) в течении 45 минут.
4. Подготовить меченные пробы:
 - весь объем свежеприготовленной специфичной пробы смешать с пробой к ДНК фага λ (из расчета 2 мкл пробы к ДНК фага λ на каждые 100 мкл специфичной пробы).
 - Денатурировать полученную смесь при +95°C, 7 мин.
 - Затем сразу поместить в лед.
5. Снять мембрану с инкубации; далее поднять из раствора гибридизационного буфера; добавить смесь специфичной пробы и пробы к ДНК фага λ к гибридизационному буферу; полученный буфер перемешать; опустить мембрану в полученный раствор.
6. Мембрана инкубировать при соответствующей специфичной пробе температуре (см. табл. 4) в течение ночи.

Таблица 4 – Буферы и условия гибридизации

Условие	ДНК-зонд (проба)	
	p13e11, 4qA, 4qB	D4Z4
Состав гибридационного буфера	125 мМ Na ₂ HPO ₄ , pH 7.2; 10% PEG 6000; 0,25M NaCl; 1мМ EDTA; 7% SDS; 1% ДНК спермы лосося (конечная концентрация 1 мкг/мл)	125 мМ Na ₂ HPO ₄ , pH 7.2; 50% формамид (добавлять свежий перед гибридизацией); 0,25M NaCl; 7% SDS; 1% ДНК спермы лосося (конечная концентрация 1 мкг/мл)
Температура гибридизации	65°C	62°C

2.2.11.7 Проведение отмывки мембраны

1. Буферы для отмывки мембраны, соответствующие пробам (см. табл. 5), разогреть до 65°C и поддерживать данную температуру буфера на водяной бане в течение процесса отмывки.

2. Гибридационный буфер слить.

3. Добавить 500 мл буфера для отмывки

4. Отмывку повторить три раза при 65°C, по 10 минут. Каждый раз меняя отмывочный буфер на соответствующий свежий.

5. Мембрану перенести на фильтровальную бумагу, дать стечь основной части влаги.

6. Влажную мембрану запечатать в пластиковую пищевую пленку.

Таблица 5 – Буферы и условия отмывки

Условие	ДНК-зонд (проба)			
	p13e11,	4qA	4qB	D4Z4
Состав буфера для отмывки	2x SSC; 0.1% SDS	Первая отмывка: 2x SSC; 0.1% SDS; Вторая и третья отмывки: 1x SSC; 0.1% SDS	Первая отмывка: 2x SSC; 0.1% SDS; Вторая и третья отмывки: 0,3x SSC; 0.1% SDS	0.1x SSC; 0.1% SDS
Температура отмывки	65°C	65°C	65°C	65°C

2.2.11.8 Детекция сигнала с мембраны

1. Запечатанную мембрану поместить в кассету (Storage Phosphor Screen, Amersham Bioscience) лицевой стороной мембраны к детектирующей пластине кассеты. Кассету плотно закрыть, оставить в темном месте при комнатной температуре на 4 часа.

2. Разобрать кассету, детектирующую пластину поместить в прибор STORM-820 (GE Healthcare, USA).

3. Снять флуоресцентный сигнал на приборе STORM-820 (GE Healthcare, USA). С помощью программы ImageQuant-TL (GE Healthcare, USA), оценить уровень сигнала по отношению к фону и задокументировать полученные данные.

4. Сигналы с детектирующей пластины стереть на приборе Eraser 810-UNV (Amersham Bioscience).

5. Запечатанную мембрану вновь поместить в кассету (Storage Phosphor Screen, Amersham Bioscience) лицевой стороной мембраны к детектирующей пластине кассеты. Кассету плотно закрыть, оставить в темном месте при комнатной температуре. Продолжительность экспозиции варьирует: при четко выраженных специфичных сигналах после 4 часов экспозиции достаточно оставить кассету на 1 сутки; при отсутствии специфичных сигналов после 4 часов экспозиции оставить кассету на 2 суток.

6. Повторить детекцию сигнала как в п.3. Сохранить изображение, определить длины аллелей массивов повторов соотнося сигналы от специфичных проб с сигналами от пробы ДНК фага λ .

2.2.12 Молекулярный комбинг

Методика молекулярного комбинга состоит из следующих этапов:

- выделение геномной ДНК в агарозных блоках;
- Молекулярный комбинг - получение растянутых на покровном стекле нитей хроматина;
- Молекулы ДНК, на покровных стеклах, гибридизуются с интересующими FISH-пробами;
- детекция флуоресцентного сигнала и его компьютерная обработка.

Исследование образцов геномной ДНК методикой молекулярного комбинга осуществлялось на коммерческой платформе «FiberVision® Molecular Combing Platform» (Genomic Vision, France) на базе лаборатории генетики человека Лейденского университета, Нидерланды.

2.2.12.1 Выделение геномной ДНК в агарозных блоках

На данном этапе использована методика идентичная описанной в разделе 2.2.1.1 «Методика выделения геномной ДНК из цельной крови в агарозных блоках».

2.2.12.2 Молекулярный комбинг - получение растянутых на покровном стекле нитей хроматина

1. Агарозный блок отмыть в растворе 0,01x «Buffer4» (FiberPrep® DNA extraction kit, Genomic vision, France) в 15 мл пробирке в течении 60 мин. при комнатной температуре на ротаторе при минимальной скорости. Этот шаг повторить еще 2 раза (в общей сложности 3 отмывки).

2. Перенести отмытый агарозный блок в 2 мл пробирку и добавить 1 мл «Buffer7» (FiberPrep® DNA extraction kit, Genomic vision, France). Проверить, что блок полностью погружен в буфер.

3. Установить пробирку на штатив и поместить в водяную баню на +68°C на 20 мин. В ходе этого шага подготовить водяную баню на +42°C

4. После инкубации на +68°C сразу перенести пробирку в водяную баню на +42°C. Инкубировать 10 мин.

5. В пробирку с агарозным блоком добавить 1,5 мкл «component 7» (FiberPrep® DNA extraction kit, Genomic vision, France).

6. Инкубировать ночь (16-18 часов) при 42°C.

7. На следующий день снять пробирку с полученным раствором ДНК с инкубации, добавить 1200 мкл «Buffer7» в одноразовый резервуар «Disposable DNA Reservoir» (FiberPrep® DNA extraction kit, Genomic vision, France).

8. Аккуратно залить раствор ДНК в «Disposable DNA Reservoir». При необходимости довести объём с помощью «Buffer7» до верхней отметки на «Disposable DNA Reservoir».

9. Поместить «Disposable DNA Reservoir» в соответствующий слот прибора молекулярного комбинга FiberComb® Molecular Combing System (Genomic vision, France).

10. Установить на держатели покровные стекла CombiCoverslips™ (Genomic vision, France). Держатели с покровными стеклами установить в прибор FiberComb® Molecular Combing System, запустить прибор.

11. После завершения работы прибора, снять покровные стекла с держателей, сушить при +60°C в течении 4 часов. Покровные стекла могут сразу использоваться для гибридизации либо храниться при -20°C в непрозрачной коробке.

2.2.12.3 Гибридизация с FISH-пробами CombHeliX® FSHD probes (Genomic vision, France)

1. Компоненты набора «CombHeliX® FSHD probes» (Genomic vision, France) и покровные стекла (после процедуры молекулярного комбинга) с фиксированными молекулами ДНК инкубировать при комнатной температуре в течении 10-15 минут (до того, как они достигнут комнатной температуры).

2. Провести дегидратацию покровных стекол по 3 мин, последовательно в серии спиртов с 70%, 90% и 100% этанолом комнатной температуры.
3. Стекла сушить при комнатной температуре в темном месте в течении 10 мин.
4. В 0,6 мл пробирку внести 10 мкл смеси гибридизационных проб «CombHeliX® FSHD probes» и 10 мкл деионизированного формамида. Смесь перемешать и инкубировать при +37°C в течении 30 мин.
5. Весь объём (20 мкл) полученного раствора нанести на предметное стекло ровной каплей.
6. Покровное стекло (п.3) наложить на каплю гибридизационных проб на предметном стекле (п.5), важно не допускать образования пузырей между стеклами.
7. Отметить сторону стекла, не контактирующую с гибридизационными пробами (внешняя сторона).
8. Полученный в п.6 препарат денатурировать во влажной гибридизационной камере Dako Hybridizer (Dako, USA) в течении 5 мин. при 90°C.
9. Инкубировать в течении 16-20 часов при +37°C во влажной гибридизационной камере Dako Hybridizer (Dako, USA).
10. Покровные стекла снять и поместить в керамический держатель (Genomic vision, France).
11. Разогреть до +60°C буфер для отмывки «Hybridization Washing Buffer» (CombHeliX® FSHD probes, Genomic Vision, France).
12. Поместить держатель с покровным стеклом в ванночку и залить разогретым буфером для отмывки, так, чтобы покровное стекло полностью находилось в буфере.
13. Инкубировать 5 мин. Слить буфер.
14. Повторить п. 12-13 в общей сложности 3 раза. Температуру буфера поддерживать в районе +60°C.
15. На чистое предметное стекло нанести 20 мкл детектирующего раствора «Detecting solution» (CombHeliX® FSHD probes, Genomic Vision, France) ровной каплей.
16. Покровное стекло (п.14) поместить на предметное стекло с детектирующим буфером, внешней стороной кверху, не допуская образования пузырей между стеклами.
17. Инкубировать стекла 20 мин. при +37°C во влажной гибридизационной камере Dako Hybridizer (Dako, USA).

18. Повторить п. 10-17 в общей сложности три раза.
19. Снять покровные стекла и промыть их в 1x PBS (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) при комнатной температуре в течении 3 мин. на качалке с минимальными колебаниями.
20. Провести дегидратацию покровных стекол по 3 мин. последовательно в серии спиртов с 70%, 90% и 100% этанолом комнатной температуры.
21. Сушить при комнатной температуре в темном месте в течении 10 мин.
22. Далее полученные покровные стекла могут быть использованы для микроскопии либо храниться при +4°C в непрозрачной коробке.

2.2.12.4 Детекция флуоресцентного сигнала и его компьютерная обработка

Детекция флуоресцентного сигнала осуществлялась на приборе «ImageXpress® Micro System» (Genomic vision, France), компьютерная обработка полученного сигнала осуществлялась с помощью программного обеспечения «CombHeliX® FSHD software» (Genomic vision, France). Последовательность и окраска гибридизационных проб (бар-код) для изучаемых хромосом указаны на рисунке 2.

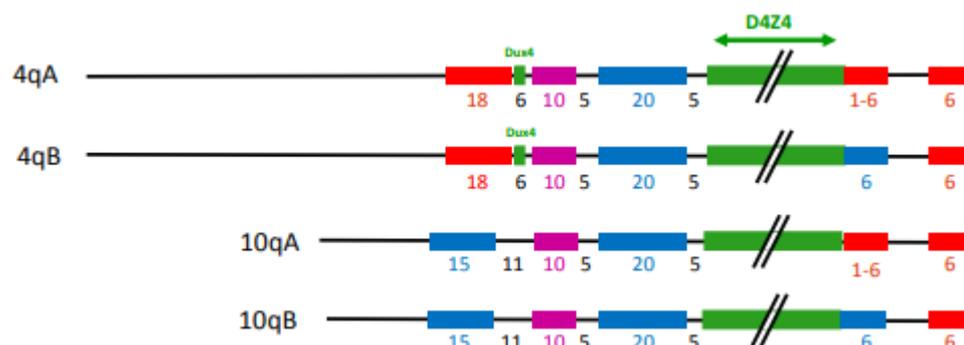


Рисунок 2 – Цветовые бар-коды изучаемых хромосом.

Примечание: 4qA, 4qB, 10qA, 10qB – варианты бар-кодов для хромосомы 4 и 10. Слева-направо – последовательность флуоресцентных сигналов от центромерного (проксимального) конца к теломерному (дистальному) концу. Зеленый сигнал соответствует последовательности массива повторов D4Z4. Проксимальнее массива D4Z4 расположены специфические последовательности сигналов для хромосомы 4 либо 10. Дистальнее массива D4Z4 расположены последовательности сигналов специфичные для гаплотипов А либо В. Под последовательностями флуоресцентных сигналов цифрами указаны их длины (т.п.н.)

В соответствии с рекомендациями производителя, для достоверного подтверждения существования конкретного аллеля, необходимо минимум 15 нитей ДНК с идентичным бар-кодом. По результатам компьютерной обработки флуоресцентных сигналов устанавливались длины массивов D4Z4, их хромосомная принадлежность и дистальный гаплотип.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Разработка методики диагностики МЛД

3.1.1 Разработка ПЦР-системы для специфичной амплификации D4Z4 повторов хромосомы 4

Первым этапом выполнения работы была разработка ПЦР-система для специфичной амплификации D4Z4 повторов четвертой хромосомы. Для это был проведён поиск уникальных последовательностей в пределах повторов D4Z4 хромосомы 4: референсные последовательности этого региона хромосом 4 и 10 были выравнены друг относительно друга. В результате была обнаружена 6-ти нуклеотидная делеция на 10 хромосоме относительно 4 (рис. 3). Для подтверждения существования данной делеции были секвенированы соответствующие космиды λ 260201 (несущего 3 повтора D4Z4 4-й хромосомы) и космиды C85 (несущей 6 повторов D4Z4 10 хромосомы). Полученные хроматограммы подтверждают специфичность 6-ти нуклеотидной делеции для хромосомы 10.

Также был секвенирован аналогичный участок, полученный при амплификации образца геномной ДНК. Как видно из рисунка 4, смещение сигналов секвенограммы ПЦР-продуктов, полученных с геномной ДНК, свидетельствует о наличии аллелей как 4, так и 10 хромосом. На хромосоме 4 присутствуют две копии 6-ти нуклеотидного повтора «СТССГС», в то время как на 10 хромосоме только одна такая копия.

А

4q35	A	C	G	C	C	T	C	C	G	C	C	T	C	C	G	C	G	C	G	G	C
10q26	A	C	G	C	-	-	-	-	-	-	-	C	T	C	C	G	C	G	C	G	C

Б

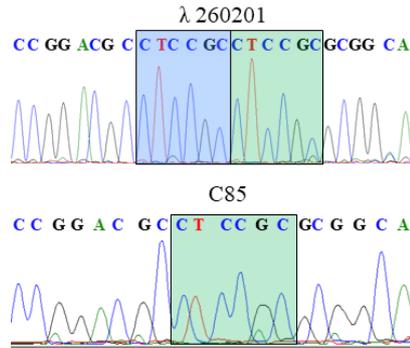


Рисунок 3 – Сравнение референсных последовательностей D4Z4 хромосом 4 и 10. Примечание: А – фрагмент выравнивания последовательности D4Z4 хромосомы 4 (AF117653.3) против референсной последовательности хромосомы 10 (AY028079.1). Пунктиры в последовательности хромосомы 10 демонстрируют 6-ти нуклеотидную делецию. Б – хроматограмма сиквенса ПЦР-продуктов (пара праймеров Rep1F и Rep1R1seq), полученных с использованием космид λ260201 и C85, демонстрирует специфичность 6-ти нуклеотидной делеции для последовательности 10 хромосомы (C85). В синие прямоугольники выделены 6-ти нуклеотидные полиморфные участки

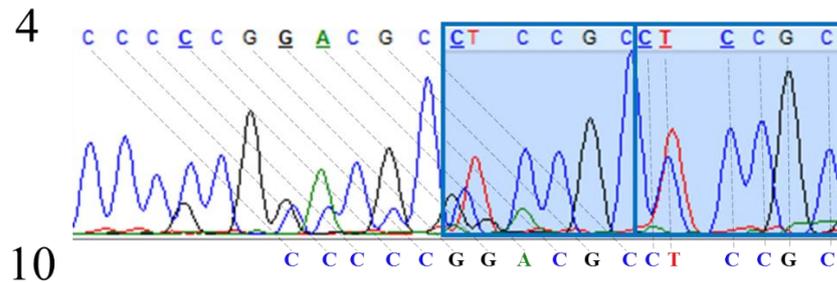


Рисунок 4 – Сиквенсограмма участка 6-ти нуклеотидного полиморфизма последовательностей D4Z4, полученная с матрицы геномной ДНК.

Примечание: Верхняя нуклеотидная последовательность соответствует последовательности повторов D4Z4 хромосомы 4. В синие прямоугольники выделены последовательности 6-ти нуклеотидных повторов хромосомы 4. Нижняя нуклеотидная последовательность соответствует последовательности D4Z4 хромосомы 10. Серыми пунктирными линиями сопоставлены идентичные участки последовательностей хромосом 4 и 10. Минорные пики хроматограммы соответствуют нуклеотидной последовательности 10-й хромосомы

После подтверждения существования 6-ти нуклеотидной делеции уникальной для D4Z4 повторов хромосомы 10, осуществлен подбор различных комбинации праймеров, один из которых отжигался на данном участке 6-ти нуклеотидной инсерции на хромосоме 4. Последующее проведение ПЦР показало, что использование пары праймеров Rep1,5f и Rep1R (рис. 5) приводило к специфичной амплификации с космиды λ 260201, а с космиды C85 амплификация отсутствовала.

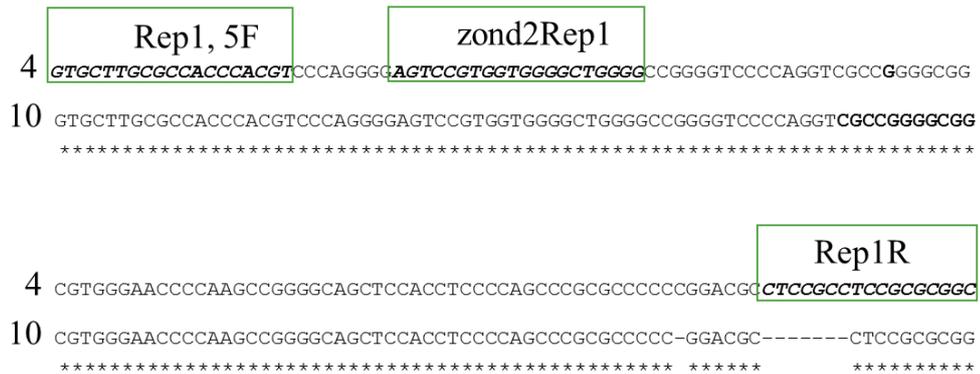


Рисунок 5 – ПЦР-система для специфичной амплификации D4Z4 повторов хромосомы 4. Последовательности форвардного праймера (Rep1.5F), реверсного праймера (Rep1R) и Taq-man зонда (zond2Rep1) выделены в зеленые прямоугольники. Пунктирные линии в последовательности 10-й хромосомы обозначают делетированные нуклеотиды

Однако, высокий процент содержания GC нуклеотидов (>70%) в последовательности D4Z4 осложнял амплификацию и снижал эффективность реакции. Для увеличения эффективности ПЦР тестировались различные энхансеры для ПЦР-амплификации GC-насыщенных районов:

- Бетаин, в конечных концентрациях от 0,5 до 2 М.
- ДМСО, в конечных концентрациях от 0,5% до 5%
- Трегалоза, в конечных концентрациях от 0,05 до 0,5 М.

Также были протестированы следующие Taq-полимеразы (в конечных концентрациях от 1 до 2 единиц активности на реакцию):

- SmarTaq (Диалат ЛТД)
- Smar^{NG}Taq (Диалат ЛТД)
- IQexTaq (Диалат ЛТД)

- UltraSmar (Диалат ЛТД)

Для специфичной амплификации также был оптимизирован температурный профиль и все компоненты ПЦР смеси: концентрация $MgCl_2$ и дезоксинуклеотидтрифосфатов, концентрации праймеров и зонда, количество фрагмента агарозного геля. Таким образом, определен оптимальный состав ПЦР (табл. 6)

Таблица 6 – Оптимизированный состав ПЦР для специфичной детекции повторов D4Z4 хромосомы 4

Компонент	Конечная концентрация
Буфер AmpliTaq (Диалат ЛТД)	1x
Полимераза Smar ^{NG} Taq (Диалат ЛТД)	1,25 ед. на реакцию
Праймеры Rep1,5F, Rep1R	По 10 пмоль на реакцию
TaqMan зонд zond2Rep1	25 пмоль на реакцию
Бетаин	1,2 мМ
Фрагмент пульс-электрофорезного геля	0,03-0,04%

Данная ПЦР-система использовалась для амплификации геномных ДНК матриц контрольных образцов с известной длиной массивов D4Z4 хромосомы 4. Полученные амплификаты были секвенированы по Сенгеру, для определения специфичности полученных последовательностей (рис. 6). Таким образом была разработана количественная ПЦР-система для специфичной амплификации участка повторов D4Z4 хромосомы 4.

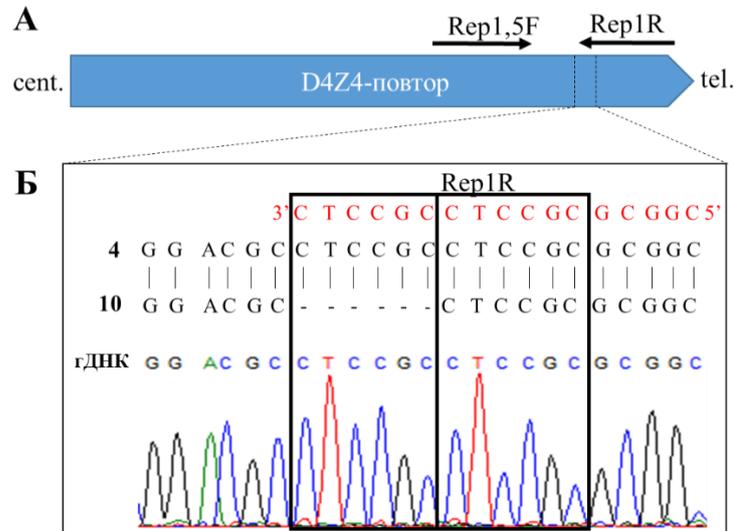


Рисунок 6 – Схема расположения пары праймеров Rep1,5F и Rep1R, и хроматограмма сиквенса ПЦР-продукта, полученного с использованием данной пары праймеров на матрице геномной ДНК.

Примечание: А – места отжига праймеров Re1,5F и Rep1R, расположенные ближе к теломерному концу (tel.) каждого из повторов D4Z4. Б – Фрагмент выравнивания последовательности D4Z4 хромосомы 4 (AF117653.3) против референсной последовательности хромосомы 10 (AY028079.1). Красным шрифтом обозначена последовательность реверсного праймера Rep1R. Пунктиры в последовательности хромосомы 10 демонстрируют 6-ти нуклеотидную делецию. Хроматограмма сиквенса ПЦР-продукта демонстрирует специфичную амплификацию последовательности 4 хромосомы с матрицы геномной ДНК. В прямоугольники выделены 6-ти нуклеотидные повторы

3.1.2 Оптимизация условий пульс-электрофореза рестрицированной геномной ДНК

Из литературы известно, что оптимальное время разделения фрагментов D4Z4 геномной ДНК методом пульс-электрофореза для проведения Саузерн-гибридизации, составляет около 20 часов в диапазоне длин от 6 до 300 т.п.н. Оптимизацию данного шага проводили с целью уменьшения продолжительности пульс-электрофореза, но сохранения достаточного разрешения в диапазоне длин от 10 до 38 т.п.н., именно в этом диапазоне представлены укороченные до 1-10 повторов аллели. На рисунке 7 представлена

электрофореграмма демонстрирующая зависимость продолжительности электрофореза и степени разделения фрагментов ДНК в диапазоне длин от 10 до 38 т.п.н.

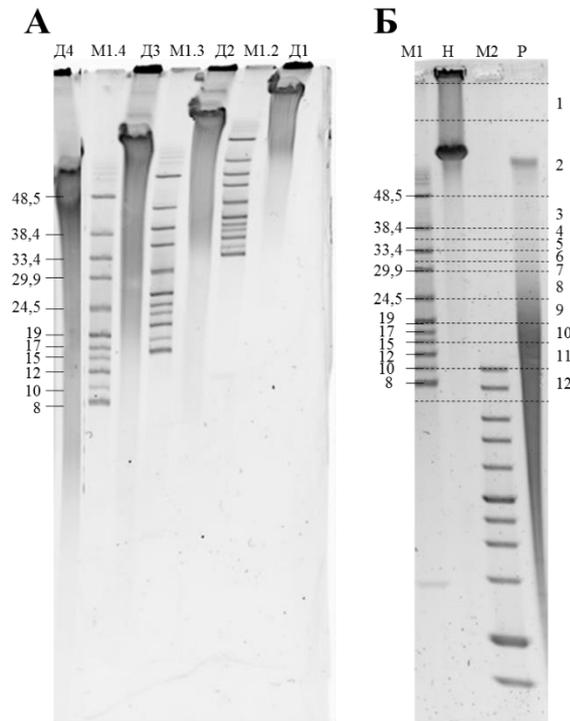


Рисунок 7 – Оптимизация условий пульс-электрофореза и схема фрагментации агарозного геля. Примечание: **А** – Электрофореграмма полученная после разделения водного раствора цельной геномной ДНК методом пульс-электрофореза, использовавшийся маркер молекулярного веса – Lambda Mix Marker 19 (Thermo Scientific, #SM0231). Дорожки геля: Д4 и М1.4 – геномная ДНК и маркер молекулярного веса соответственно, после пульс-электрофореза в течении 4-х часов; Д3 и М1.3 – геномная ДНК и маркер молекулярного веса соответственно, после пульс-электрофореза в течении 3-х часов; Д2 и М1.2 – геномная ДНК и маркер молекулярного веса соответственно, после пульс-электрофореза в течении 2-х часов; Д1 – геномная ДНК после пульс-электрофореза в течении 1-го часа; Слева от фото геля цифрами указаны размеры фрагментов маркера молекулярного веса (т.п.н.). **Б** - Электрофореграмма образца геномной ДНК выделенной в агарозном блоке. М1 – дорожка геля, содержащая маркер молекулярного веса «Lambda Mix Marker 19». М2 – дорожка агарозного геля содержащая маркер молекулярного веса «1 kb ДНК-маркер» (СибЭнзим). Н – образец геномной ДНК после инкубации в рестрикционном буфере без добавления эндонуклеаз рестрикции; судя по слабовыраженному шмеру и выраженному мажорному бэнду, геномная ДНК в агарозных блоках в ходе выделения и хранения фрагментируется незначительно. Р – образец геномной ДНК после обработки эндонуклеазой *EcoRI*. Отсутствие следов геномной ДНК выше мажорного бэнда, смещение мажорного бэнда в сторону низкомолекулярной фракции и появление шмера свидетельствует о успешной рестрикции. Слева от фото геля арабскими цифрами указаны размеры фрагментов маркера молекулярного веса (т.п.н.). Дорожки геля «Н» и «Р» подвергались фрагментации, границы фрагментов обозначены горизонтальными пунктирными линиями. Справа от фото геля обозначены номера фрагментов геля по порядку. В итоге каждая из дорожек «Н» и «Р» разделены на 12 фрагментов.

В результате условия разделения имели следующие характеристики: напряжение 15,5 В/см, время пульса 0,5 сек, температура буфера +5°C. Эти условия были использованы на всём протяжении выполнения данной работы.

Как видно (рис. 7А) при использовании в работе раствора геномной ДНК, наблюдается выраженный шмер в дорожке агарозного геля, свидетельствующий о её частичной деградации. Выделение геномной ДНК в агарозных блоках (рис. 7Б), существенно не влияет на ее доступность эндонуклеазам рестрикции и препятствует деградации.

После пульс-электрофореза, агарозный гель был нарезан на фрагменты согласно длинам маркера (рис. 7Б). При этом шаг нарезки в диапазоне длин от 8 до 48 т.п.н. составляет 1-2 повтора D4Z4 (3,3-6,6 т.п.н.). Диапазон дорожки геля от лунки и до бэнда маркера молекулярного веса размером в 48 т.п.н. делится на два фрагмента, причем фрагмент ближний к низкомолекулярной фракции содержит весь мажорный бэнд геномной ДНК.

Далее полученные после нарезки фрагменты геля были использованы в качестве матрицы для ПЦР с парой праймеров Rep1,5F и Rep1R. Несмотря на то, что контрольная ПЦР с геномной ДНК проходила успешно, ПЦР с использованием фрагментов геля в качестве матриц давала небольшие количества ПЦР-продукта, результаты практически не отличались между различными образцами (рис. 8). Это явление проявлялось тем выраженнее, чем дольше продолжается пульс-электрофорез. Вероятным объяснением являлось ингибирование ПЦР, ввиду изменений в качестве ДНК в ходе пульс-электрофореза.

Для проверки данной гипотезы, проведена серия электрофорезов геномной ДНК с разной продолжительностью электрофореза. Последующая ПЦР показала прямую зависимость степени ингибирования ПЦР от продолжительности электрофореза. Предположительно, данное ингибирование вызвано изменениями качества геномной ДНК в ходе пульс-электрофореза.

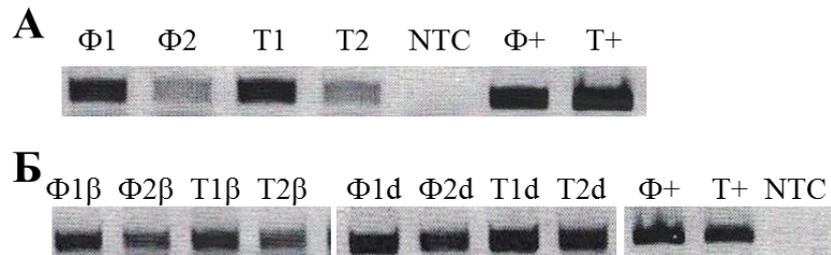


Рисунок 8 – Зависимость конечного количества ПЦР-продукта от продолжительности пульс-электрофореза и наличия в буфере антиоксиданта.

Примечание: Эксперимент проводился на двух образцах геномной ДНК здоровых индивидов (Φ, Т). Матрицы для ПЦР получены в ходе пульс-электрофореза следующим образом: каждый образец геномной ДНК вносился в две лунки пульс-электрофорезного геля; первая дорожка каждого образца фрагментировалась после 15 минут пульс-электрофореза, вторая дорожка каждого образца фрагментировалась после 2-часов пульс-электрофореза; фрагменты геля содержащие мажорный бенд использовались в качестве матрицы для ПЦР. А – результаты ПЦР при отсутствии в пульс-электрофорезном буфере антиоксидантов. Φ1 и T1 - результаты с использованием в качестве матриц фрагментов агарозного геля, содержащих мажорный бенд после 15 минут пульс-электрофореза. Φ2 и T2 - результаты с использованием в качестве матриц фрагментов агарозного геля, содержащих мажорный бенд после 2-х часов пульс-электрофореза. Φ+ и T+ результаты с использованием в качестве матриц образцов геномной ДНК, не подвергнутых пульс-электрофорезу. NTC отрицательный контроль. В – результаты ПЦР при наличии в пульс-электрофорезном буфере антиоксидантов (β – образцы после пульс-электрофореза в буфере с 2-меркаптоэтанолом в конечной концентрации 500мМ; d – образцы после пульс-электрофореза в буфере с DTT в конечной концентрации 10 мМ. Φ1β, T1β, Φ1d и T1d результаты, полученные с использованием фрагментов агарозного геля, содержащих мажорный бенд после 15 минут пульс-электрофореза, в качестве ПЦР-матрицы. Φ2β, T2β, Φ2d и T2d результаты, полученные с использованием фрагментов агарозного геля, содержащих мажорный бенд после 2-х часов пульс-электрофореза, в качестве ПЦР-матрицы

В ходе попыток устранить данное явление, в составе буфера для пульс-электрофореза были протестированы такие широко используемые антиоксиданты, как DTT и 2-меркаптоэтанол [Fjelstrup S. et al., 2017; Kim J.H. et al., 1998; Solen G. et al., 1991; Stanton J. et al., 1993; Yee W. et al., 2018;; Zheng S.X. et al., 1988]. Результаты ПЦР показали, что DTT в концентрации 10 мМ является оптимальным для нивелирования нежелательных изменений качества геномной ДНК в ходе пульс-электрофореза (рис. 8). При данной концентрации DTT наблюдается восстановление работоспособности ПЦР,

сравнимой с контрольными образцами, где в качестве матриц использовалась геномная ДНК, не подвергавшаяся пульс-электрофорезу.

3.1.3 Подбор условий для проведения количественной ПЦР на матрице геля после пульс-электрофореза

При постановке ПЦР с детекцией результатов по конечной точке с образцами фрагментов геля в некоторых случаях удавалось получить выраженную разницу в количестве ПЦР-продукта между фрагментами геля, в которых ожидается содержались массивы D4Z4 и между остальными фрагментами геля. Но были образцы, для которых такой разницы, не наблюдалось (рис. 9).

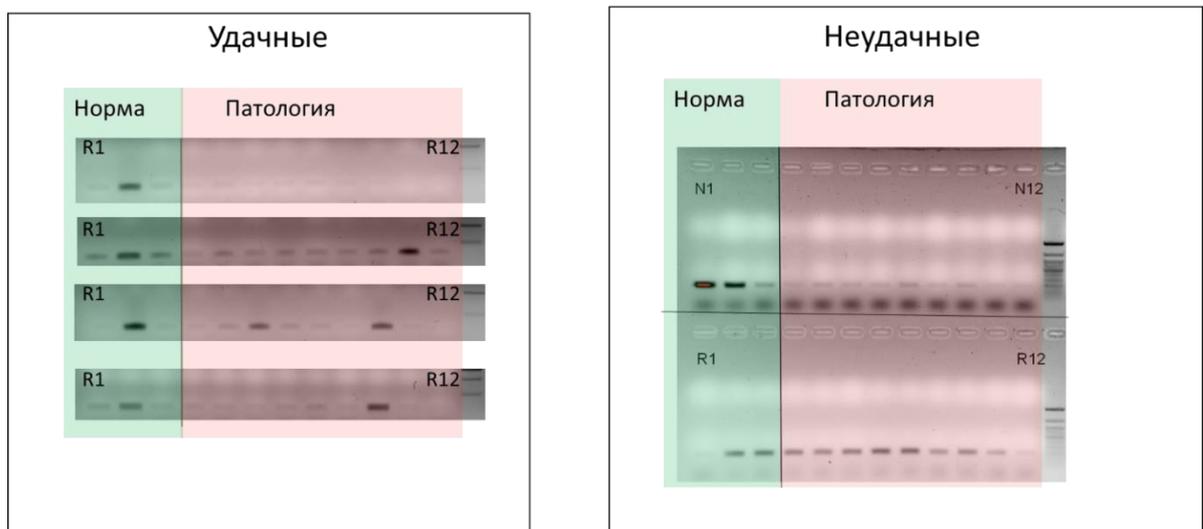


Рисунок 9 – Результаты ПЦР с парой праймеров Rep1F + Rep1R, с дедукцией результатов по конечной точке.

Примечание: Удачные – образцы, для которых визуально определяется разница между фрагментами геля, содержащими массивы повторов D4Z4 и остальными фрагментами геля. Последовательно, слева направо в лунки нанесены ПЦР-продукты, полученные после амплификации матриц из фрагментов геля с R1 по R12. Неудачные - приведен пример неудачного определения числа повторов D4Z4 хромосомы 4. Для данного образца визуально не наблюдалось выраженной разницы между фрагментом геля, содержащим массив повторов D4Z4 и остальными фрагментами, в серии ПЦР с фрагментами R1-R12. Для контроля деградации геномной ДНК, как причины отсутствия четко-выраженной разницы в количестве ПЦР продукта, амплифицированы матрицы из фрагментов геля после пульс-электрофореза нерестрицированной геномной ДНК (ПЦР-продукты с N1 по N12). Наличие выраженной разницы в количестве ПЦР-продукта между группой образцов N1, N2 и оставшимися образцами с N3 по N12, свидетельствует об отсутствии деградации геномной ДНК на этапах до ПЦР

Такое явление может быть объяснено деградацией ДНК в ходе выделения, хранения и пульс-электрофореза, либо низкой концентрацией ДНК для амплификации. Однако, наиболее явным является объяснение, связанное с самим методом детекции результатов ПЦР. Так, детекция ПЦР по конечной точке не гарантирует того, что наблюдаемое, приблизительно равное количество ПЦР-продукта, свидетельствует о равном начальном количестве таргетной матрицы в образцах. При выходе реакций на плато, в интересующих образцах конечное количество ПЦР-продукта может достичь одинаково значения. В таких случаях установление количества D4Z4 повторов, с помощью ПЦР с детекцией в конечной дочке, невозможно, поэтому, для решения проблемы предпринят переход на ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan-зондов.

Для этого подобран TaqMan-зонд Rep1zond2 содержащий на 5'-конце флуоресцентный краситель FAM, а на 3'-конце тушитель BHQ1 (рис. 5). В экспериментах в присутствии геля после электрофореза и без него, ПЦР-система Rep1,5F+Rep1R с TaqMan зондом Rep1zond2 показала способность специфично амплифицировать таргетные последовательности (рис. 10).

В итоге, данная количественная ПЦР-система позволила решить проблему обнаружения фрагмента агарозного геля с максимальным содержанием таргетного локуса. В последующих экспериментах данная количественная ПЦР-система использовалась для определения длин массивов повторов D4Z4 аллелей хромосомы 4 и для сравнения с результатами, полученными методиками гибридизации по Саузерну и молекулярного комбинга.

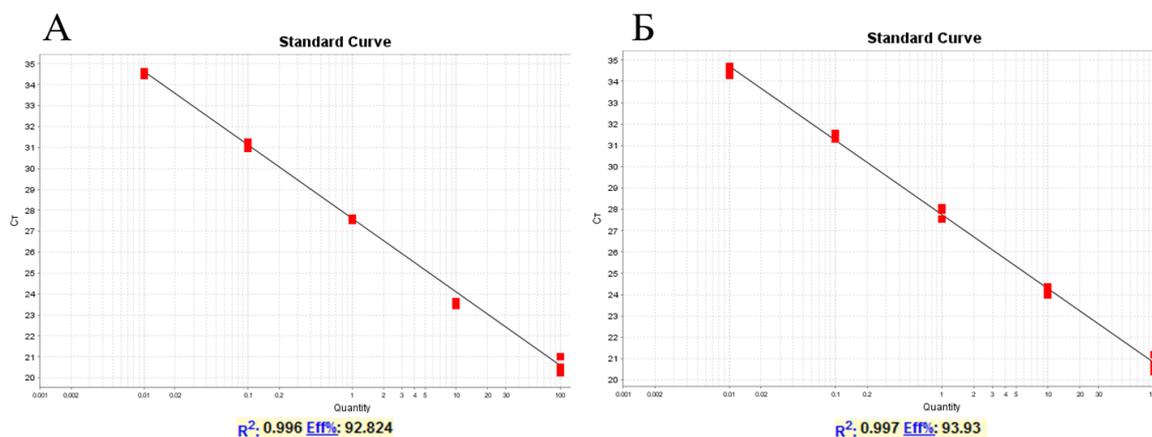


Рисунок 10 – Показатели эффективности количественной ПЦР с парой праймеров Rep1,5F+Rep1R и с TaqMan зондом Rep1zond2.

Примечание: Эффективность ПЦР определялась по стандартной кривой разведений геномной ДНК. Использовано 5 разведений матрицы с шагом 1:10, по три повторности каждое разведение (красные квадраты на графике). А – стандартная кривая для ПЦР с использованием смеси геномной ДНК и чистого (не содержащего ДНК) агарозного геля, подвергнутого воздействию пульс-электрофореза. Б – стандартная кривая для ПЦР с использованием в качестве матрицы геномной ДНК без добавления агарозного геля

3.1.4 Гаплотипирование аллелей массивов D4Z4

Для молекулярно-генетического подтверждения диагноза МЛД1 вторым обязательным этапом является гаплотипирование укороченного аллеля – определение наличия/отсутствия на данном аллеле сигнала полиаденилирования транскрипта DUX4. Основанный на ПЦР (трех-праймерная ПЦР) подход к определению гаплотипа интересующего аллеля ранее был предложен Paraničkos с соавторами [Paraničkos F. et al., 2014]. Специфичность определения гаплотипа А хромосомы 4 достигалась использованием аллельспецифичного праймера. Следует отметить, что авторы данной статьи использовали геномную ДНК после разделения методом пульс-электрофореза в качестве матрицы для ПЦР. Однако, авторы применяли очистку геномной ДНК от компонентов агарозного геля. В нашем случае было принято решение использовать непосредственно аликвоту фрагмента геля, содержащего массив D4Z4, в качестве матрицы для ПЦР.

Оптимизация условий и состава ПЦР проводилась с использованием следующих контрольных образцов: фаговый клон λ 260201 (гаплотип А хромосомы 4); космида С85 (гаплотип А хромосомы 10); фрагмент геля Р8, содержащий аллель массива повторов D4Z4 хромосомы 4, гаплотип В (пациент №131); фрагмент геля Р10, содержащий аллель массива повторов D4Z4 хромосомы 4, гаплотип А (пациент №131); отрицательный контроль геля – фрагмент геля из зоны вне дорожек, использован для контроля контаминации геля в ходе пульс-электрофореза (рис. 11). После проведения оптимизации состава ПЦР-смеси, а именно используемой ДНК-полимеразы и количества праймеров (табл. 2). было проведено гаплотипирование имеющихся образцов. Для этого, в качестве матрицы для ПЦР были использованы фрагменты гелей после пульс-электрофореза, которые, согласно результатам ПЦР в реальном времени, содержали аллели массивов D4Z4.

В итоге, как видно из рисунка 11, данная система для ПЦР-гаплотипирования специфично амплифицирует таргетный локус даже в присутствии агарозного геля. Это позволяет избавиться от дополнительного этапа очистки ДНК из агарозного геля и еще больше ускоряет и упрощает процесс диагностики.

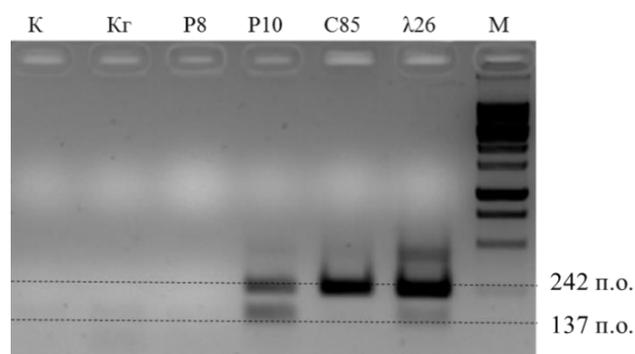


Рисунок 11 – Результаты ПЦР-гаплотипирования массивов D4Z4 аллелей хромосомы 4. Примечание: В качестве матриц для ПЦР использованы: К – отрицательный контроль, не содержащий геля; Кг – отрицательный контроль с использованием пульс-электрофорезного агарозного геля в качестве матрицы; P8 – фрагмент агарозного геля, содержащего аллель четвертой хромосомы с тандемом повторов D4Z4 имеющих гаплотип В; P10 – фрагмент агарозного геля, содержащего аллель четвертой хромосомы с тандемом повторов D4Z4 имеющих гаплотип А; C85 – космидная матрица C85 (содержит аллель хромосомы 10 с тандемом повторов D4Z4 имеющих гаплотип А); λ26 – космидная матрица λ260201 (содержит аллель хромосомы 4 с тандемом повторов D4Z4 имеющих гаплотип А). М – маркер молекулярного веса. ПЦР-продукт длиной 242 п.о. образуется с как 4 так и 10 хромосом. ПЦР-продукт длиной 140 п.о. образуется только с матрицы, содержащей аллель четвертой хромосомы с тандемом повторов D4Z4 имеющих гаплотип А

3.2 Валидация разработанной методики диагностики МЛД1

На сегодня, стандартами молекулярно-генетической диагностики МЛД1 признаны две методики – гибридизация по Саузерну и молекулярный комбинг. Именно эти методики использовались для валидации результатов разработанной методики. В качестве материала использованы образцы ДНК от российских пациентов с клиническим диагнозом МЛД и их фенотипически здоровых родственников.

3.2.1 Анализ образцов геномной ДНК с помощью гибридизации по Саузерну

Данный этап работы выполнялся на базе лаборатории генетики человека Лейденского университета, Нидерланды.

Образцы ДНК 30 российских пациентов с МЛД и их 12 фенотипически здоровых родственников были выделены в агарозных блоках из свежей венозной крови. Для определения длин тандемов D4Z4 на аллелях 4 и 10 хромосом использовалась дифференциальная рестрикция и гибридизация по Саузерну с радиоактивно-мечеными ДНК-зондами. Полученные результаты диагностики суммированы в таблице 7 Приложения.

Известно, что повторы D4Z4 широко распространены в геноме, их гомология между хромосомами 4 и 10 достигает 98-99%. Одним из отличий является присутствие сайта эндонуклеазы рестрикции *AvrII* в каждом повторе D4Z4 10 хромосомы и сайта *XapI* в каждом повторе D4Z4 на 4 хромосоме. Вся область повторов D4Z4 ограничена сайтами рестрикции *EcoRI* на обеих хромосомах (4 и 10). С помощью системы двойной рестрикции *EcoRI/AvrII* (рис. 12А) можно установить изменение длины области повторов D4Z4 на 4 хромосоме, в то время как все повторы 10 хромосомы элиминируются из анализа при помощи эндонуклеазы рестрикции *AvrII*. При определении гаплотипов, геномная ДНК обрабатывалась рестриктазой *HindIII* и гибридизовалась с пробами комплементарными гаплотипам либо А, либо В (рис. 12Б). Для разделения рестрикционных фрагментов по длине использован пульс-электрофорез.

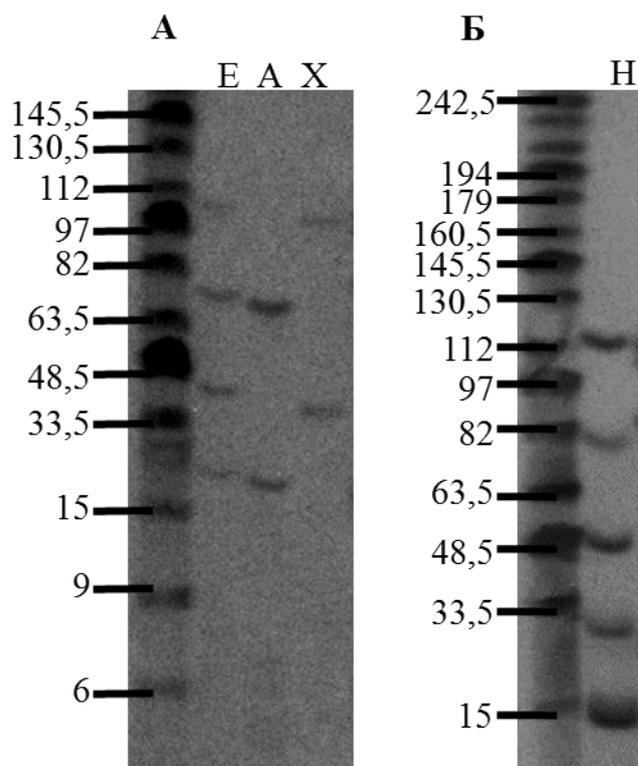


Рисунок 12 – Определение длин аллелей тандемов повторов D4Z4 и их гаплотипов методикой гибридизации по Саузерну.

Примечание: А – определение длин массивов D4Z4, Е – дорожка с ДНК после рестрикции эндонуклеазой *EcoRI*; А – дорожка с ДНК после рестрикции эндонуклеазами *EcoRI/AvrII*; X – дорожка с ДНК после рестрикции эндонуклеазой *XapI*. Б – определение гаплотипа А; Н – дорожка с ДНК после рестрикции эндонуклеазой *HindIII*. Слева от изображения блотов указаны длины фрагментов маркера молекулярного веса

3.2.2 Анализ образцов геномной ДНК с помощью молекулярного комбинга

Вторым по частоте использования методом диагностики МЛД является молекулярный комбинг. У данной методики имеется ряд преимуществ над гибридизацией по Саузерну, в частности одновременно определяются такие характеристики, как: длины и гаплотипы всех аллелей 4 и 10 хромосом; структурные перестройки и уровень мозаицизма исследуемых аллелей. Кроме того, детекция данных характеристик осуществляется с помощью программного обеспечения и может быть полностью автоматизирована.

Молекулярным комбингом проанализировано 5 образцов ДНК пациентов с клиническим диагнозом МЛД, среди которых: 2 образца, не обследованные/частично обследованы ранее другими молекулярно-генетическими методами (№126, №146). Один образец был с установленными длинами массивов D4Z4 и их гаплотипами, но неустановленной хромосомной принадлежностью (№146); один образец был не охарактеризован из-за низкой концентрации геномной ДНК, оказавшейся недостаточной для детекции при гибридизации по Саузерну (№126). Следующая группа из 3 образцов, обследованных методом гибридизации по Саузерну (№125, №134, №136) включала: один образец с неустановленной хромосомной принадлежностью двух аллелей массивов D4Z4, но с установленным гипометилированием массивов D4Z4 (№125); два образца с подозрением на наличие мозаицизма по одному из аллелей 4 хромосомы (№134, №136).

Для всех образцов обследованных молекулярным комбингом получены данные о длине аллелей массивов D4Z4 и их гаплотипе и хромосомной принадлежности, на этом основании сделаны выводы о наличии/отсутствии у данных индивидов МЛД1 (табл. 7).

Полученные методиками гибридизации по Саузерну и молекулярного комбинга данные были использованы для сравнения с результатами, полученными при использовании разработанной методики для диагностики МЛД1: количественной ПЦР для определения числа повторов D4Z4 на аллелях четвертой хромосомы и ПЦР-гаплотипирование данных аллелей.

3.2.3 Сравнение результатов диагностики МЛД, полученными с использованием разных методик

Наиболее важным для молекулярной диагностики миодистрофии Ландузи–Дежерина является обнаружение укороченного аллеля тандема повторов D4Z4 сцепленного с гаплотипом А на хромосоме 4 (число D4Z4 повторов от 1 до 11). Стандартами диагностики на сегодняшний день являются дорогостоящие и трудоемкие методики гибридизации по Саузерну и молекулярного комбинга. В этой работе представлена альтернативная широкодоступная методика детекции D4Z4 повторов 4-й хромосомы во фрагментах геля после пульс-электрофореза. Данная методика показала свою работоспособность на образцах космидной ДНК с известным числом повторов.

Следующей задачей было сравнение разработанной методики с гибридизацией по Саузерну и молекулярным комбингом. Для этого образцы геномной ДНК пациентов с клиническими признаками миодистрофии Ландузи-Дежерина и их родственников были исследованы гибридизацией по Саузерну и молекулярным комбингом. Полученные данные использовались далее в качестве референсных при детекции D4Z4 повторов с помощью количественное ПЦР с фрагментами геля в качестве матрицы.

Для анализа методикой количественной ПЦР с фрагментами пульс-электрофорезного геля было доступно 42 образца, среди них: пациенты с фенотипическими проявлениями МЛД – 30 пациентов (минимум один укороченный тандем D4Z4, n=21; без укороченных тандемов D4Z4, n=9); фенотипически здоровые родственники – 12 (один укороченный тандем D4Z4, n=4; без укороченных тандемов D4Z4, n=8).

При гибридизации по Саузерну, сравнение гибридизационного сигнала с длинами маркера молекулярного веса происходит визуально, это может вносить ошибку в определение точного числа повторов D4Z4. Учитывая это, совпадением считалось разница в пределах 2-х D4Z4-повторов. Несовпадение – разница на 3 и более D4Z4-повтора.

Совпадение результатов наблюдалось в 93% (n=39). Среди них 20 индивидов имели один укороченный аллель тандема D4Z4 хромосомы 4. На гистограммах данных количественной ПЦР такие образцы имели один мажорный пик от фрагмента геля более 48 т.п.н. и один пик от фрагмента геля менее 48 т.п.н. (Приложение 4). Два индивида имели два укороченных аллеля тандема D4Z4 хромосомы 4, при этом, на гистограммах количественной ПЦР оба пика получены от фрагментов геля из зоны менее 48 т.п.н. (Приложение 5). Для 17 индивидов не обнаружено укороченных аллелей тандемов D4Z4 хромосомы 4. Для этой группы образцов на гистограммах количественной ПЦР наблюдался один пик от фрагмента геля более 48 т.п.н. (Приложение 6).

В одном случае (2%, один укороченный аллель тандема D4Z4) установить длину методом количественной ПЦР не удалось. Наиболее вероятно, данный образец геномной ДНК деградировал к моменту проведения анализа. Для двух неродственных индивидов (5%, один укороченный аллель тандема D4Z4) были получены ложноотрицательные результаты. Для выяснения причины ошибки были проделаны следующие шаги: образцы

геномной ДНК повторно обработаны рестриктазой; полученные фрагменты ДНК разделены пульс-электрофорезом; вырезан фрагмент геля в котором, согласно референсным данным, должен был находиться искомый аллель; полученный фрагмент геля использовался в качестве матрицы в ПЦР с неспецифичной парой праймеров Re1F + Rep1R1seq. Поскольку данная пара праймеров неспецифично отжигается как на D4Z4 повторах четвертой так и десятой хромосом, постольку было исключено негативное влияние на ПЦР возможных гибридных состояний тандема D4Z4 (присутствие D4Z4 повторов десятой хромосомы на четвертой хромосоме). Однако для исследуемых образцов ПЦР-продуктов не наблюдалось, отсюда был сделан вывод об отсутствии в выделенных фрагментах гелей тандемов повторов D4Z4. Наиболее вероятным объяснением в этом случае является путаница в образцах геномной ДНК. К сожалению, повторного цикла диагностики с вновь выделенной геномной ДНК провести не удалось ввиду отказа участников от дальнейших исследований.

3.2.4 Сравнение результатов гаплотипирования образцов ДНК

Вторым обязательным критерием молекулярно-генетического подтверждения диагноза МЛД1 является определение сцепления укороченного массива повторов D4Z4 с гаплотипом «А». В данной работе использована ранее описанная ПЦР-система для гаплотипирования. На рисунке 13 представлены хроматограммы, подтверждающие принадлежность контрольных образцов космид к гаплотипам «А» четвертой и десятой хромосом. Также, данная ПЦР-система успешно амплифицирует гаплотипы «А» в составе геномной ДНК. Присутствие геля не влияет на специфичность прохождения ПЦР.

Для валидации метода ПЦР-гаплотипирования использованы образцы фрагментов гелей от 40 индивидов, с имеющимися референсными результатами гаплотипирования массивов D4Z4 аллелей четвертой хромосомы. Среди обследованных индивидов, в соответствии с референсными результатами: 17 не имели укороченных аллелей, но хотя-бы один аллель имел гаплотип А; 2 индивида с двумя укороченными аллелями, но только по одному аллелю с гаплотипом А; и 21 индивид с одним укороченным аллелем с гаплотипом А.

В качестве матрицы для ПЦР использованы фрагменты пульс-электрофорезного геля, содержавшие аллели тандемов D4Z4 четвертой хромосомы. Стоит заметить, что этапы рестрикции ДНК, пульс-электрофореза и фрагментации геля не проводились повторно, но использовались те же фрагменты пульс-электрофорезного геля, что и для количественной ПЦР. В случае если индивиды не имели укороченных тандемов D4Z4, для ПЦР-гаплотипирования использованы фрагменты геля, содержащие ДНК-фрагменты более 48 т.п.н. Данные фрагменты пульс-электрофорезных гелей могут содержать смесь аллелей тандемов D4Z4 хромосом 4 и 10.

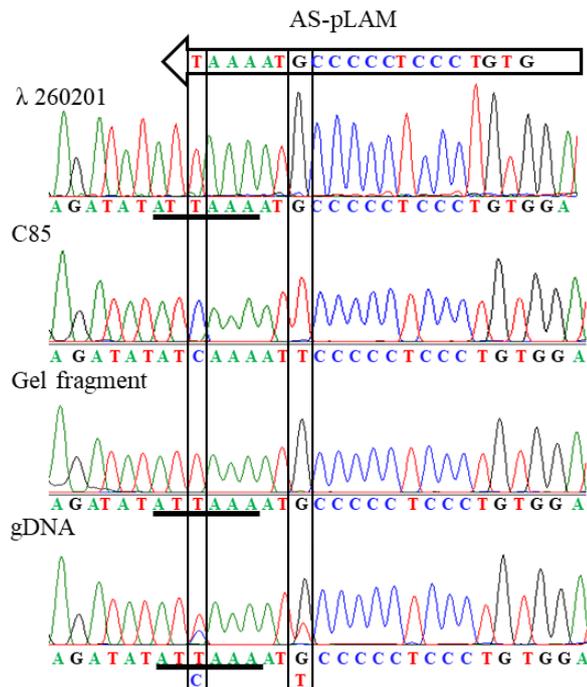


Рисунок 13 – Нуклеотидная последовательность, содержащая сигнал полиаденилирования мРНК DUX4.

Примечание: Для ПЦР использованы пара праймеров pLAM-FW и pLAM-RV. Сигнал полиаденилирования (AATAA) выделен подчеркиванием. Последовательность аллель-специфичного праймера AS-pLAM выделена над хроматограммами в черной стрелке. В качестве ПЦР-матриц использованы: контрольные космиды λ260201 (4q35) и C85 (10q26); «Gel fragment» - 10 мкл фрагмента геля, содержащего укороченный аллель массива повторов D4Z4 пациента с МЛД; «gDNA» - нерестрицированная, не подвергнутая пульс-электрофорезу матрица геномной ДНК здорового индивида. Хроматограммы контрольных космид демонстрируют их специфичность. Идентичность последовательности матриц λ260201 и «Gel fragment» подтверждают принадлежность

укороченного аллеля массива D4Z4 к гаплотипу А. Наличие в матрице «gDNA» последовательностей идентичных как λ 260201 так и С85 подтверждает наличие в геномной ДНК аллелей 4 и 10 хромосом

В 39 случаях наблюдалось совпадение результатов ПЦР-гаплотипирования с референсными данными. В 1 случае, для которого также не удалось провести определение количества повторов D4Z4, не удалось провести и ПЦР-гаплотипирование по той же причине – недостаточное количество/качество ДНК во фрагменте геля.

По полученным данным можно заключить, что использование аллель-специфичной ПЦР-системы для гаплотипирования, с фрагментами геля в качестве ПЦР матрицы, позволяет избежать трудоемких и время-затратных процедур в составе методик гибридизации по Саузерну и молекулярного комбинга. Результаты сравнения гаплотипирования подтверждают возможность использования аллель-специфичной ПЦР в качестве диагностической методики определения гаплотипа А тандемов D4Z4.

3.2.5 Анализ представленности пермиссивных аллелей массивов D4Z4 в группе обследованных индивидов

Для более полной характеристики укороченных массивов повторов D4Z4 хромосомы 4 у российских пациентов с МЛД и их родственников, дополнительно, к имеющимся результатам молекулярно-генетического обследования, проведено обследование 133 индивидов из российской популяции. Среди них: 99 пациентов с признаками МЛД и их 34 фенотипически здоровых родственника. Всем индивидам проведена диагностика с использованием количественной ПЦР с фрагментами пульс-электрофорезного геля для определения длин аллелей тандемов D4Z4 четвертой хромосомы и, в случае их укорочения - ПЦР-гаплотипирование данных аллелей.

Подводя итог диагностики МЛД1 методиками гибридизации по Саузерну, молекулярного комбинга и количественной ПЦР с последующим ПЦР, ди-гаплотипированием, обнаружено следующее: в группе из 129 пациентов МЛД1 подтвержден для 85 (65,9%) из них; для 3 пациентов установлен диагноз МЛД2; для 41 пациента диагноз МЛД не подтвержден в группе из 46 фенотипически здоровых родственников обнаружено 12 (26%) носителей пермиссивного аллеля; для 34 (74%)

индивидов укороченных аллелей не обнаружено; на основании полученных данных построены гистограммы распределения пермиссивных аллелей в группах пациентов и фенотипически здоровых родственников (рис 14 А, Б); при сравнении соотношений полов в группах пациентов и фенотипически здоровых родственников преобладания в зависимости от пола не выявлено ($\chi^2 = 1.29$. $p = 0.26$).

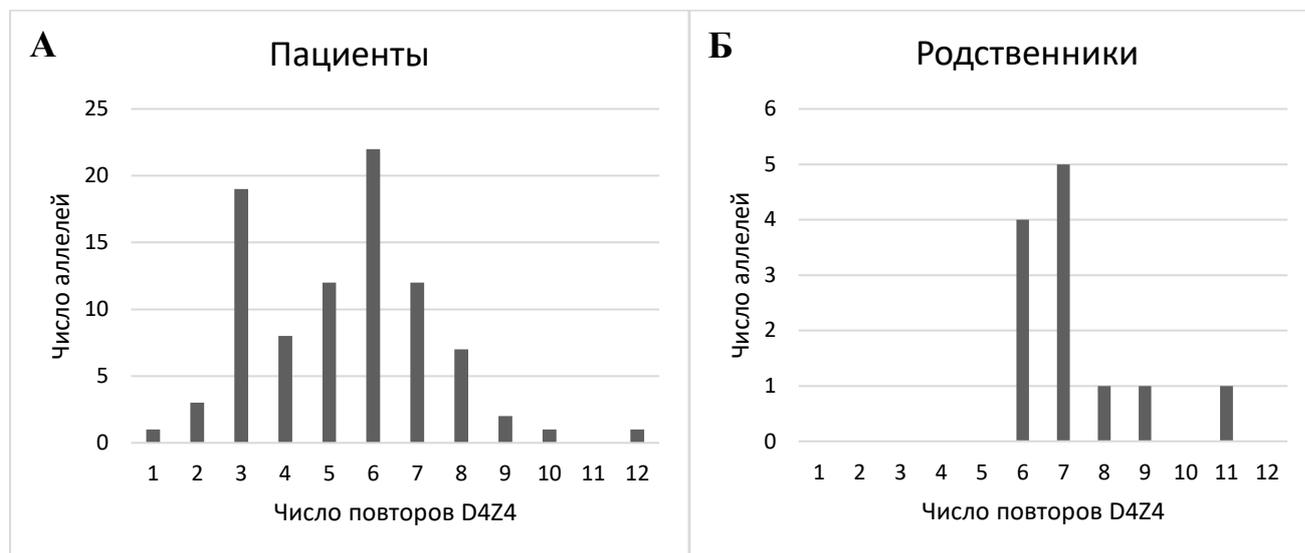


Рисунок 14 – Распределение длин пермиссивных аллелей массивов D4Z4 четвертой хромосомы в группе пациентов с МЛД1 (А) и их фенотипически здоровых родственников-носителей патогенного аллеля (Б)

3.3 Алгоритм молекулярно-генетической диагностики МЛД1

На основании результатов проделанной работы, предложен модифицированный алгоритм диагностики МЛД1. При этом этапы гибридизации по Саузерну для определения длин массивов D4Z4 и гаплотипирования заменяются на ПЦР в реальном времени и ПЦР с детекцией по конечной точке, соответственно. Схема алгоритма представлена на рисунке 15.

В случае обнаружения укороченного аллеля массива повторов D4Z4 четвертой хромосомы, следующий обязательный шаг – это гаплотипирование данного аллеля. В случае если обнаруженный аллель сцеплен с гаплотипом «А», диагноз подтверждается. Если укороченный аллель не сцеплен с гаплотипом «А», диагноз МЛД не подтверждается.

В случае, если не обнаруживается укороченного аллеля массива повторов D4Z4 четвертой хромосомы, диагноз МЛД 1-го типа не подтверждается. Далее рекомендовано ПЦР-гаплотипирование с геномной ДНК. В случае если обнаруживается гаплотип «А», то остается вероятность диагноза МЛД 2-4-го типов. В таких случаях рекомендован поиск мутаций в генах ответственных за развитие МЛД 2-4-го.

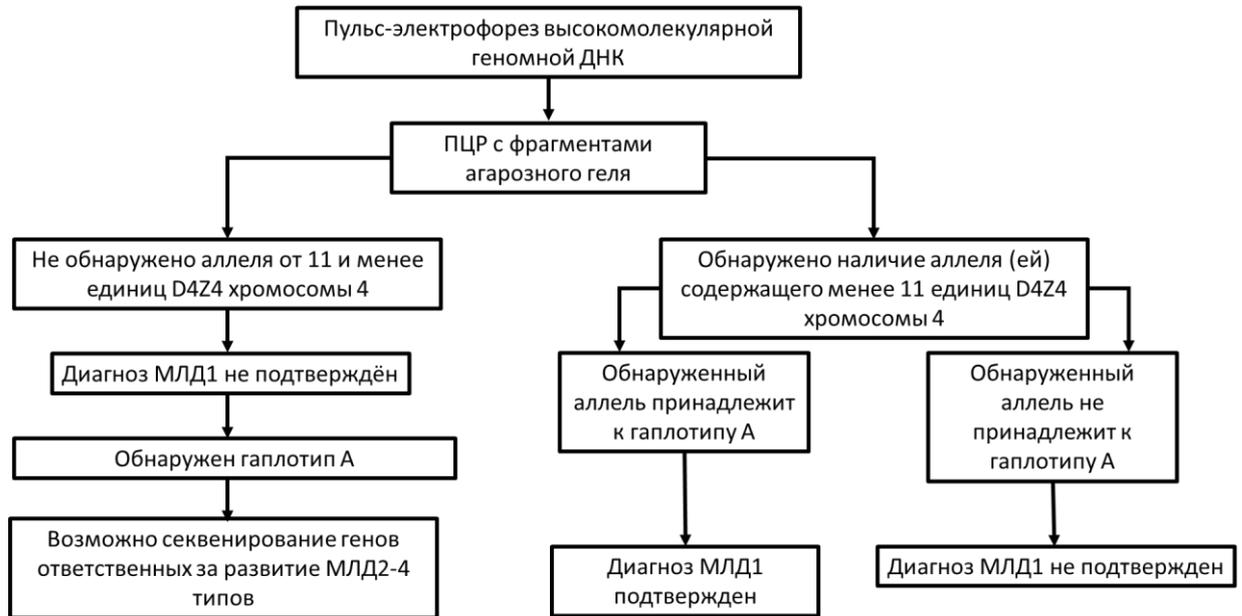


Рисунок 15 – Комплексный алгоритм молекулярно-генетической диагностики МЛД

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы была разработана новая методика ДНК-диагностики миодистрофии Ландузи-Дежерина. Данная методика основана на ПЦР, что делает ее широкодоступной для применения в большинстве диагностических лабораторий, в отличие от стандартных методик гибридизации по Саузерну и молекулярного комбинга. Разработанная методика была валидирована сравнением с результатами диагностики гибридизацией по Саузерну и молекулярным комбингом.

Разработанная методики использовалась для исследования аллелей массивов D4Z4 для российских пациентов и их фенотипически-здоровых родственников. На территории России подобное исследование проводилось впервые. Была обнаружена статистически значимая разница в накоплении пермиссивных аллелей между пациентами и носителями. В группе пациентов наиболее часто встречались пермиссивные аллели с числом повторов D4Z4 от 3 до 6 единиц. Тогда как среди бессимптомных носителей больше всего индивидов имели пермиссивные аллели с 6-9 повторами D4Z4.

В целях молекулярно-генетического подтверждения МЛД1 разработанная методика рекомендована как исследование первой линии т.к. предоставляет всю необходимую информацию для постановки диагноза: число повторов D4Z4 на укороченном аллеле и сцепление данного аллеля с гаплотипом «А».

ВЫВОДЫ

1. Для проведения ДНК-диагностики у пациентов с миодистрофией Ландузи-Дежерина разработана методика обнаружения пермиссивных аллелей, включающая определение числа повторов D4Z4 аллелей хромосомы 4 и установление их сцепления с гаплотипом «А».

2. Для валидации полученных результатов проведён сравнительный анализ определения длин массивов D4Z4 на 42 образцах от пациентов с миодистрофией Ландузи-Дежерина и их родственников с помощью разработанной методики и методик гибридизации по Саузерну и молекулярного комбинга. Совпадение результатов наблюдалось в 93%; несовпадение в 5%; спорные результаты в 2%.

3. Показано, что разработанная методика имеет преимущества над гибридизацией по Саузерну и молекулярным комбингом в скорости и стоимости исследования. Методика может быть использована в клинической практике как исследование первой линии при наличии у пациентов фенотипических признаков лице-лопаточно-плечевой миодистрофии Ландузи-Дежерина.

4. Впервые проведено исследование аллелей массивов D4Z4 суммарно у 129 российских пациентов с МЛД. Диагноз МЛД1 подтвержден у 85 (66%), у 3 пациентов установлен диагноз МЛД2 (2,33%), у 41 пациента диагноз МЛД не подтвержден (31,7%). Среди фенотипически здоровых родственников обнаружено 12 индивидов имеющих пермиссивные аллели.

5. В группе из 85 пациентов с подтвержденным диагнозом, среднее значение числа повторов D4Z4 пермиссивных аллелей составило 5 единиц. У индивидов без клинических проявлений заболевания, число повторов D4Z4 пермиссивных аллелей составило 6 более.

6. Разработан комплексный алгоритм и рекомендации по применению метода ДНК-диагностики лице-лопаточно-плечевой миодистрофии Ландузи-Дежерина.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. По результатам проведенного исследования представлен алгоритм подтверждающей и дифференциальной диагностики миодистрофии Ландузи-Дежерина, включающий как этапы поиска укороченного аллеля массива повторов D4Z4 хромосомы 4 и обязательно ПЦР-гаплотипирования укороченного аллеля для проверки его сцепления с гаплотипом «А».

2. При обнаружении у пациентов с миодистрофии Ландузи-Дежерина аллеля 4 хромосомы с числом повторов D4Z4 11-12 единиц и сцепления данного аллеля с гаплотипом «А», рекомендовано секвенирование генов ответственных за развитие МЛД 2-4 типов.

3. При отсутствии в исследуемом образце аллелей массивов D4Z4 хромосомы 4, сцепленных с гаплотипом «А», любой из типов МЛД исключается из диагностического поиска данного заболевания.

4. Разработанный метод определения длин массивов повторов D4Z4 может быть использован для определения длин массивов других макросателлитных повторов с целью диагностики других заболеваний.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список статей, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России

1. **Зернов Н.В.**, Марахонов А.В., Вяхирева Ю.В., Гуськова А.А., Дадали Е.Л., Скоблов М.Ю. Клинико-генетические характеристики и особенности диагностики лице-плече-лопаточной миодистрофии Ландузи –Дежерина // Генетика. – 2017. – Т. 53. №6. – С. 651-662. (Scopus, WoS)
2. Вяхирева Ю.В., **Зернов Н.В.**, Марахонов А.В., Гуськова А.А., Скоблов М.Ю. Современные подходы к лечению миодистрофий // Медицинская генетика. – 2016. – Т 15. №10. – С. 3-16.
3. Дадали Е.Л., Шаркова И.В., **Зернов Н.В.**, Руденская Г.Е., Скоблов М.Ю. Клинико-генетические характеристики лице-плечелопаточной миодистрофии Ландузи—Дежерина типа 1 // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2017. – Т. 117. №11. – С. 122-128. (Scopus)
4. **Zernov N**, Skoblov M. Genotype-phenotype correlations in FSHD // BMC medical genomics. – 2019. – V 12 (Suppl 2). – P 43. doi.org/10.1186/s12920-019-0488-5 (Scopus, WoS)
5. **Зернов Н.В.**, Гуськова А.А., Скоблов М.Ю. Новый подход к диагностике миодистрофии Ландузи-Дежерина, основанный на полимеразной цепной реакции // Медицинская генетика. – 2019. – Т. 18. №7. – С 3-9. doi.org/10.25557/2073-7998.2019.07.3-9
6. **Zernov N.V.**, Guskova A.A., Skoblov M.Y. FSHD1 Diagnosis in a Russian Population Using a qPCR-Based Approach // Diagnostics. – 2021. – V 11, № 6. – P 982. doi.org/10.3390/diagnostics11060982 (Scopus, WoS)

Список публикаций в других изданиях

7. **Zernov N.**, Skoblov M. Genotype-phenotype correlations in FSHD // Abstracts the 11th International Conference Integrative bioinformatics and systems biology (WIBSB-2018). First Sino-Russian Workshop. – 2018. – P. 71.

8. **Zernov N.**, Skoblov M. DNA diagnostics for facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) by qPCR-based approach // *European Journal of Human Genetics*. – 2019. V 27, Supplement 2. – P. 1174-1813. doi.org/10.1038/s41431-019-0494-2.

9. **Зернов Н.В.**, Гуськова А.А., Скоблов М.Ю. Молекулярно-генетическая характеристика миодистрофии Ландузи-Дежерина в российской популяции // *Медицинская генетика*. – 2020. – Т. 19. №4. – С 57-58. doi.org/10.25557/2073-7998.2020.04.57-58.

10. **Zernov N.V.**, Guskova A.A., Skoblov M.Yu. qPCR based approach for FSHD1 diagnostic and its implementation for studying Russian population // *27th Annual FSHD Society International Research Congress*. – 2020. – P. 63.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arahata K., Ishihara T., Fukunaga H., Orimo S., Lee J. H., Goto K., & Nonaka I. Inflammatory response in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): immunocytochemical and genetic analyses. // *Muscle Nerve Suppl.* - 1995. - V. 2. - P. S56-66.
2. Bakker E., Wijmenga C., Vossen R. H., Padberg G. W., Hewitt J., van der Wielen M., Rasmussen K., & Frants R. R. The FSHD-linked locus D4F104S1 (p13E-11) on 4q35 has a homologue on 10qter. // *Muscle Nerve Suppl.* - 1995a. - V. 2. - P. S39-44.
3. Bakker E., Wijmenga C., Vossen R. H., Padberg G. W., Hewitt J., van der Wielen M., Rasmussen K., & Frants R. R. The FSHD-linked locus D4F104S1 (p13E-11) on 4q35 has a homologue on 10qter. // *Muscle Nerve Suppl.* - 1995b. № 2. - P. S39-44.
4. Balog J., Thijssen P. E., de Greef J. C., Shah B., van Engelen B. G., Yokomori K., Tapscott S. J., Tawil R., & van der Maarel S. M. Correlation analysis of clinical parameters with epigenetic modifications in the DUX4 promoter in FSHD. // *Epigenetics.* - 2012. - V. 7. № 6. - P. 579-584. doi: 10.4161/epi.20001
5. Balog J., Thijssen P. E., Shadle S., Straasheijm K. R., van der Vliet P. J., Krom Y. D., van den Boogaard M. L., de Jong A., RJ F. L., Tawil R., Tapscott S. J., & van der Maarel S. M. Increased DUX4 expression during muscle differentiation correlates with decreased SMCHD1 protein levels at D4Z4. // *Epigenetics.* - 2015. - V. 10. № 12. - P. 1133-1142. doi: 10.1080/15592294.2015.1113798
6. Baranovskaya S., Martin Y., Alonso S., Pisarchuk K. L., Falchetti M., Dai Y., Khaldoyanidi S., Krajewski S., Novikova I., Sidorenko Y. S., Perucho M., & Malkhosyan S. R. Down-regulation of epidermal growth factor receptor by selective expansion of a 5'-end regulatory dinucleotide repeat in colon cancer with microsatellite instability. // *Clin Cancer Res.* - 2009. - V. 15. № 14. - P. 4531-4537. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1282
7. Barat-Houari M., Nguyen K., Bernard R., Fernandez C., Vovan C., Bareil C., Khau Van Kien P., Thorel D., Tuffery-Giraud S., Vasseur F., Attarian S., Pouget J., Girardet A., Levy N., & Claustres M. New multiplex PCR-based protocol allowing indirect diagnosis of FSHD on single cells: can PGD be offered despite high risk of recombination? // *European Journal of Human Genetics.* - 2010. - V. 18. № 5. - P. 533-538. doi: 10.1038/ejhg.2009.207
8. Blewitt M. E., Gendrel A. V., Pang Z., Sparrow D. B., Whitelaw N., Craig J. M., Apedaile A., Hilton D. J., Dunwoodie S. L., Brockdorff N., Kay G. F., & Whitelaw E. SmcHD1,

containing a structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain, has a critical role in X inactivation. // *Nature Genetics*. - 2008. - V. 40. № 5. - P. 663-669. doi: 10.1038/ng.142

9. Bosnakovski D., Gearhart M. D., Toso E. A., Ener E. T., Choi S. H., & Kyba M. Low level DUX4 expression disrupts myogenesis through deregulation of myogenic gene expression. // *Sci Rep*. - 2018. - V. 8. № 1. - P. 16957. doi: 10.1038/s41598-018-35150-8

10. Bosnakovski D., Xu Z., Gang E. J., Galindo C. L., Liu M., Simsek T., Garner H. R., Agha-Mohammadi S., Tassin A., Coppee F., Belayew A., Perlingeiro R. R., & Kyba M. An isogenetic myoblast expression screen identifies DUX4-mediated FSHD-associated molecular pathologies. // *EMBO J*. - 2008. - V. 27. № 20. - P. 2766-2779. doi: 10.1038/emboj.2008.201

11. Bourque G., Leong B., Vega V. B., Chen X., Lee Y. L., Srinivasan K. G., Chew J. L., Ruan Y., Wei C. L., Ng H. H., & Liu E. T. Evolution of the mammalian transcription factor binding repertoire via transposable elements. // *Genome Res*. - 2008. - V. 18. № 11. - P. 1752-1762. doi: 10.1101/gr.080663.108

12. Bowen N. J., & Jordan I. K. Transposable elements and the evolution of eukaryotic complexity. // *Curr Issues Mol Biol*. - 2002. - V. 4. № 3. - P. 65-76.

13. Budworth H., & McMurray C. T. A brief history of triplet repeat diseases. // *Methods Mol Biol*. - 2013. - V. 1010. - P. 3-17. doi: 10.1007/978-1-62703-411-1_1

14. Busse K., Kohler J., Stegmann K., Pongratz D., Koch M. C., & Schreiber H. An inherited 4q35-EcoRI-DNA-fragment of 35 kb in a family with a sporadic case of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). // *Neuromuscul Disord*. - 2000. - V. 10. № 3. - P. 178-181.

15. Butz M., Koch M. C., Muller-Felber W., Lemmers R. J., van der Maarel S. M., & Schreiber H. Facioscapulohumeral muscular dystrophy. Phenotype-genotype correlation in patients with borderline D4Z4 repeat numbers. // *J Neurol*. - 2003. - V. 250. № 8. - P. 932-937. doi: 10.1007/s00415-003-1116-y

16. Cabianca D. S., Casa V., Bodega B., Xynos A., Ginelli E., Tanaka Y., & Gabellini D. A long ncRNA links copy number variation to a polycomb/trithorax epigenetic switch in FSHD muscular dystrophy. // *Cell*. - 2012. - V. 149. № 4. - P. 819-831. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.035

17. Chen T. H., Lai Y. H., Lee P. L., Hsu J. H., Goto K., Hayashi Y. K., Nishino I., Lin C. W., Shih H. H., Huang C. C., Liang W. C., Wang W. F., & Jong Y. J. Infantile

facioscapulohumeral muscular dystrophy revisited: Expansion of clinical phenotypes in patients with a very short EcoRI fragment. // *Neuromuscular Disorders*. - 2013. - V. 23. № 4. - P. 298-305. doi: 10.1016/j.nmd.2013.01.005

18. de Greef J. C., Lemmers R. J., van Engelen B. G., Sacconi S., Venance S. L., Frants R. R., Tawil R., & van der Maarel S. M. Common epigenetic changes of D4Z4 in contraction-dependent and contraction-independent FSHD. // *Hum Mutat*. - 2009. - V. 30. № 10. - P. 1449-1459. doi: 10.1002/humu.21091

19. de Greef J. C., Wohlgemuth M., Chan O. A., Hansson K. B., Smeets D., Frants R. R., Weemaes C. M., Padberg G. W., & van der Maarel S. M. Hypomethylation is restricted to the D4Z4 repeat array in phenotypic FSHD. // *Neurology*. - 2007. - V. 69. № 10. - P. 1018-1026. doi: 10.1212/01.wnl.0000271391.44352.fe

20. de Koning A. P., Gu W., Castoe T. A., Batzer M. A., & Pollock D. D. Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. // *PLoS Genet*. - 2011. - V. 7. № 12. - P. e1002384. doi: 10.1371/journal.pgen.1002384

21. Deidda G., Cacurri S., Grisanti P., Vigneti E., Piazza N., & Felicetti L. Physical mapping evidence for a duplicated region on chromosome 10qter showing high homology with the facioscapulohumeral muscular dystrophy locus on chromosome 4qter. // *European Journal of Human Genetics*. - 1995. - V. 3. № 3. - P. 155-167.

22. Dixit M., Ansseau E., Tassin A., Winokur S., Shi R., Qian H., Sauvage S., Matteotti C., van Acker A. M., Leo O., Figlewicz D., Barro M., Laoudj-Chenivresse D., Belayew A., Coppee F., & Chen Y. W. DUX4, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy, encodes a transcriptional activator of PITX1. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2007. - V. 104. № 46. - P. 18157-18162. doi: 10.1073/pnas.0708659104

23. Fitzsimons R. B., Gurwin E. B., & Bird A. C. Retinal Vascular Abnormalities in Facioscapulohumeral Muscular-Dystrophy - a General Association with Genetic and Therapeutic Implications. // *Brain*. - 1987a. - V. 110. - P. 631-648. doi: DOI 10.1093/brain/110.3.631

24. Fitzsimons R. B., Gurwin E. B., & Bird A. C. Retinal vascular abnormalities in facioscapulohumeral muscular dystrophy. A general association with genetic and therapeutic implications. // *Brain*. - 1987b. - V. 110 (Pt 3). - P. 631-648. doi: 10.1093/brain/110.3.631

25. Fjelstrup S., Andersen M. B., Thomsen J., Wang J., Stougaard M., Pedersen F. S., Ho Y. P., Hede M. S., & Knudsen B. R. The Effects of Dithiothreitol on DNA. // *Sensors (Basel)*. - 2017. - V. 17. № 6. doi: 10.3390/s17061201
26. Flanigan K. M., Coffeen C. M., Sexton L., Stauffer D., Brunner S., & Leppert M. F. Genetic characterization of a large, historically significant Utah kindred with facioscapulohumeral dystrophy. // *Neuromuscul Disord*. - 2001. - V. 11. № 6-7. - P. 525-529.
27. Frisullo G., Frusciante R., Nociti V., Tasca G., Renna R., Iorio R., Patanella A. K., Iannaccone E., Marti A., Rossi M., Bianco A., Monforte M., Tonali P. A., Mirabella M., Batocchi A. P., & Ricci E. CD8(+) T cells in facioscapulohumeral muscular dystrophy patients with inflammatory features at muscle MRI. // *J Clin Immunol*. - 2011. - V. 31. № 2. - P. 155-166. doi: 10.1007/s10875-010-9474-6
28. Funakoshi M., Goto K., & Arahata K. Epilepsy and mental retardation in a subset of early onset 4q35-facioscapulohumeral muscular dystrophy. // *Neurology*. - 1998. - V. 50. № 6. - P. 1791-1794. doi: Doi 10.1212/Wnl.50.6.1791
29. Gabellini D., Green M. R., & Tupler R. Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. // *Cell*. - 2002. - V. 110. № 3. - P. 339-348. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00826-7
30. Gabriels J., Beckers M. C., Ding H., De Vriese A., Plaisance S., van der Maarel S. M., Padberg G. W., Frants R. R., Hewitt J. E., Collen D., & Belayew A. Nucleotide sequence of the partially deleted D4Z4 locus in a patient with FSHD identifies a putative gene within each 3.3 kb element. // *Gene*. - 1999. - V. 236. № 1. - P. 25-32.
31. Gendrel A. V., Apedaile A., Coker H., Termanis A., Zvetkova I., Godwin J., Tang Y. A., Huntley D., Montana G., Taylor S., Giannoulatou E., Heard E., Stancheva I., & Brockdorff N. Smchd1-dependent and -independent pathways determine developmental dynamics of CpG island methylation on the inactive X chromosome. // *Dev Cell*. - 2012. - V. 23. № 2. - P. 265-279. doi: 10.1016/j.devcel.2012.06.011
32. Gendrel A. V., Tang Y. A., Suzuki M., Godwin J., Nesterova T. B., Greally J. M., Heard E., & Brockdorff N. Epigenetic functions of smchd1 repress gene clusters on the inactive X chromosome and on autosomes. // *Mol Cell Biol*. - 2013. - V. 33. № 16. - P. 3150-3165. doi: 10.1128/MCB.00145-13

33. Gregory G. D., Vakoc C. R., Rozovskaia T., Zheng X., Patel S., Nakamura T., Canaani E., & Blobel G. A. Mammalian ASH1L is a histone methyltransferase that occupies the transcribed region of active genes. // *Mol Cell Biol.* - 2007. - V. 27. № 24. - P. 8466-8479. doi: 10.1128/MCB.00993-07
34. Hamada H., Seidman M., Howard B. H., & Gorman C. M. Enhanced gene expression by the poly(dT-dG).poly(dC-dA) sequence. // *Mol Cell Biol.* - 1984. - V. 4. № 12. - P. 2622-2630. doi: 10.1128/mcb.4.12.2622
35. Haynes P., Bomsztyk K., & Miller D. G. Sporadic DUX4 expression in FSHD myocytes is associated with incomplete repression by the PRC2 complex and gain of H3K9 acetylation on the contracted D4Z4 allele. // *Epigenetics Chromatin.* - 2018. - V. 11. № 1. - P. 47. doi: 10.1186/s13072-018-0215-z
36. He J. J., Lin X. D., Lin F., Xu G. R., Xu L. Q., Hu W., Wang D. N., Lin H. X., Lin M. T., Wang N., & Wang Z. Q. Clinical and genetic features of patients with facial-sparing facioscapulohumeral muscular dystrophy. // *Eur J Neurol.* - 2018. - V. 25. № 2. - P. 356-364. doi: 10.1111/ene.13509
37. Hewitt J. E., Lyle R., Clark L. N., Valleley E. M., Wright T. J., Wijmenga C., van Deutekom J. C., Francis F., Sharpe P. T., Hofker M., & et al. Analysis of the tandem repeat locus D4Z4 associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. // *Hum Mol Genet.* - 1994. - V. 3. № 8. - P. 1287-1295.
38. Hua-Van A., Le Rouzic A., Boutin T. S., Filee J., & Capy P. The struggle for life of the genome's selfish architects. // *Biol Direct.* - 2011. - V. 6. - P. 19. doi: 10.1186/1745-6150-6-19
39. Ionov Y., Peinado M. A., Malkhosyan S., Shibata D., & Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. // *Nature.* - 1993. - V. 363. № 6429. - P. 558-561. doi: 10.1038/363558a0
40. Jain M., Koren S., Miga K. H., Quick J., Rand A. C., Sasani T. A., Tyson J. R., Beggs A. D., Dilthey A. T., Fiddes I. T., Malla S., Marriott H., Nieto T., O'Grady J., Olsen H. E., Pedersen B. S., Rhie A., Richardson H., Quinlan A. R., Snutch T. P., Tee L., Paten B., Phillippy A. M., Simpson J. T., Loman N. J., & Loose M. Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. // *Nat Biotechnol.* - 2018. - V. 36. № 4. - P. 338-345. doi: 10.1038/nbt.4060

41. Jones T. I., Chen J. C., Rahimov F., Homma S., Arashiro P., Beermann M. L., King O. D., Miller J. B., Kunkel L. M., Emerson C. P., Jr., Wagner K. R., & Jones P. L. Facioscapulohumeral muscular dystrophy family studies of DUX4 expression: evidence for disease modifiers and a quantitative model of pathogenesis. // *Hum Mol Genet.* - 2012. - V. 21. № 20. - P. 4419-4430. doi: 10.1093/hmg/dds284
42. Jones T. I., Yan C., Sapp P. C., McKenna-Yasek D., Kang P. B., Quinn C., Salameh J. S., King O. D., & Jones P. L. Identifying diagnostic DNA methylation profiles for facioscapulohumeral muscular dystrophy in blood and saliva using bisulfite sequencing. // *Clin Epigenetics.* - 2014. - V. 6. № 1. - P. 23. doi: 10.1186/1868-7083-6-23
43. Jorda J., Xue B., Uversky V. N., & Kajava A. V. Protein tandem repeats - the more perfect, the less structured. // *FEBS J.* - 2010. - V. 277. № 12. - P. 2673-2682. doi: 10.1111/j.1742-464X.2010.07684.x
44. Kim J. H., Lee E. J., Hyun J. W., Kim S. H., Mar W., & Kim J. K. Reduction of radiation-induced chromosome aberration and apoptosis by dithiothreitol. // *Arch Pharm Res.* - 1998. - V. 21. № 6. - P. 683-687. doi: 10.1007/bf02976757
45. Klinge L., Eagle M., Haggerty I. D., Roberts C. E., Straub V., & Bushby K. M. Severe phenotype in infantile facioscapulohumeral muscular dystrophy. // *Neuromuscular Disorders.* - 2006. - V. 16. № 9-10. - P. 553-558. doi: 10.1016/j.nmd.2006.06.008
46. Kowaljow V., Marcowycz A., Anseau E., Conde C. B., Sauvage S., Matteotti C., Arias C., Corona E. D., Nunez N. G., Leo O., Wattiez R., Figlewicz D., Laoudj-Chenivresse D., Belayew A., Coppee F., & Rosa A. L. The DUX4 gene at the FSHD1A locus encodes a pro-apoptotic protein. // *Neuromuscul Disord.* - 2007. - V. 17. № 8. - P. 611-623. doi: 10.1016/j.nmd.2007.04.002
47. La Spada A. R., & Taylor J. P. Repeat expansion disease: progress and puzzles in disease pathogenesis. // *Nat Rev Genet.* - 2010. - V. 11. № 4. - P. 247-258. doi: 10.1038/nrg2748
48. Landouzy L., & Dejerine J. De la myopathie atrophique progressive; myopathie héréditaire, sans neuropathie, debutant d'ordinaire dans l'enfance par la face. Paris: F. Alcan. - 1885. - V.
49. Larsen M., Rost S., El Hajj N., Ferbert A., Deschauer M., Walter M. C., Schoser B., Tacik P., Kress W., & Muller C. R. Diagnostic approach for FSHD revisited: SMCHD1

mutations cause FSHD2 and act as modifiers of disease severity in FSHD1. // *Eur J Hum Genet.* - 2015a. - V. 23. № 6. - P. 808-816. doi: 10.1038/ejhg.2014.191

50. Larsen M., Rost S., El Hajj N., Ferbert A., Deschauer M., Walter M. C., Schoser B., Tacik P., Kress W., & Muller C. R. Diagnostic approach for FSHD revisited: SMCHD1 mutations cause FSHD2 and act as modifiers of disease severity in FSHD1. // *European Journal of Human Genetics.* - 2015b. - V. 23. № 6. - P. 808-816. doi: 10.1038/ejhg.2014.191

51. Leidenroth A., & Hewitt J. E. A family history of DUX4: phylogenetic analysis of DUXA, B, C and Duxbl reveals the ancestral DUX gene. // *BMC Evol Biol.* - 2010. - V. 10. - P. 364. doi: 10.1186/1471-2148-10-364

52. Lejeune E., & Allshire R. C. Common ground: small RNA programming and chromatin modifications. // *Curr Opin Cell Biol.* - 2011. - V. 23. № 3. - P. 258-265. doi: 10.1016/j.ceb.2011.03.005

53. Lemmers R., van der Stoep N., Vliet P. J. V., Moore S. A., San Leon Granado D., Johnson K., Topf A., Straub V., Evangelista T., Mozaffar T., Kimonis V., Shaw N. D., Selvatici R., Ferlini A., Voermans N., van Engelen B., Sacconi S., Tawil R., Lamers M., & van der Maarel S. M. SMCHD1 mutation spectrum for facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2 (FSHD2) and Bosma arhinia microphthalmia syndrome (BAMS) reveals disease-specific localisation of variants in the ATPase domain. // *J Med Genet.* - 2019. doi: 10.1136/jmedgenet-2019-106168

54. Lemmers R. J., de Kievit P., Sandkuijl L., Padberg G. W., van Ommen G. J., Frants R. R., & van der Maarel S. M. Facioscapulohumeral muscular dystrophy is uniquely associated with one of the two variants of the 4q subtelomere. // *Nature Genetics.* - 2002. - V. 32. № 2. - P. 235-236. doi: 10.1038/ng999

55. Lemmers R. J., Tawil R., Petek L. M., Balog J., Block G. J., Santen G. W., Amell A. M., van der Vliet P. J., Almomani R., Straasheijm K. R., Krom Y. D., Klooster R., Sun Y., den Dunnen J. T., Helmer Q., Donlin-Smith C. M., Padberg G. W., van Engelen B. G., de Greef J. C., Aartsma-Rus A. M., Frants R. R., de Visser M., Desnuelle C., Sacconi S., Filippova G. N., Bakker B., Bamshad M. J., Tapscott S. J., Miller D. G., & van der Maarel S. M. Digenic inheritance of an SMCHD1 mutation and an FSHD-permissive D4Z4 allele causes facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2. // *Nature Genetics.* - 2012. - V. 44. № 12. - P. 1370-1374. doi: 10.1038/ng.2454

56. Lemmers R. J., van der Maarel S. M., van Deutekom J. C., van der Wielen M. J., Deidda G., Dauwerse H. G., Hewitt J., Hofker M., Bakker E., Padberg G. W., & Frants R. R. Inter- and intrachromosomal sub-telomeric rearrangements on 4q35: implications for facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) aetiology and diagnosis. // *Hum Mol Genet.* - 1998. - V. 7. № 8. - P. 1207-1214.

57. Lemmers R. J., van der Vliet P. J., Klooster R., Sacconi S., Camano P., Dauwerse J. G., Snider L., Straasheijm K. R., van Ommen G. J., Padberg G. W., Miller D. G., Tapscott S. J., Tawil R., Frants R. R., & van der Maarel S. M. A unifying genetic model for facioscapulohumeral muscular dystrophy. // *Science.* - 2010. - V. 329. № 5999. - P. 1650-1653. doi: 10.1126/science.1189044

58. Lemmers R. J., van der Vliet P. J., van der Gaag K. J., Zuniga S., Frants R. R., de Knijff P., & van der Maarel S. M. Worldwide population analysis of the 4q and 10q subtelomeres identifies only four discrete interchromosomal sequence transfers in human evolution. // *Am J Hum Genet.* - 2010. - V. 86. № 3. - P. 364-377. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.01.035

59. Lemmers R. J., Wohlgemuth M., van der Gaag K. J., van der Vliet P. J., van Teijlingen C. M., de Knijff P., Padberg G. W., Frants R. R., & van der Maarel S. M. Specific sequence variations within the 4q35 region are associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. // *Am J Hum Genet.* - 2007. - V. 81. № 5. - P. 884-894. doi: 10.1086/521986

60. Lemmers R. J. L. F., Tawil R., Petek L. M., Balog J., Block G. J., Santen G. W. E., Amell A. M., van der Vliet P. J., Almomani R., Straasheijm K. R., Krom Y. D., Klooster R., Sun Y., den Dunnen J. T., Helmer Q., Donlin-Smith C. M., Padberg G. W., van Engelen B. G. M., de Greef J. C., Aartsma-Rus A. M., Frants R. R., de Visser M., Desnuelle C., Sacconi S., Filippova G. N., Bakker B., Bamshad M. J., Tapscott S. J., Miller D. G., & van der Maarel S. M. Digenic inheritance of an SMCHD1 mutation and an FSHD-permissive D4Z4 allele causes facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2. // *Nature Genetics.* - 2012. - V. 44. № 12. - P. 1370-1374. doi: 10.1038/ng.2454

61. Livak K. J., & Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. // *Methods.* - 2001. - V. 25. № 4. - P. 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262

62. Lunt P. W. 44th ENMC International Workshop: Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy: Molecular Studies 19-21 July 1996, Naarden, The Netherlands. // *Neuromuscul Disord.* - 1998. - V. 8. № 2. - P. 126-130. doi: 10.1016/s0960-8966(98)00012-1
63. Lunt P. W., & Harper P. S. Genetic counselling in facioscapulohumeral muscular dystrophy. // *J Med Genet.* - 1991. - V. 28. № 10. - P. 655-664. doi: 10.1136/jmg.28.10.655
64. Mah J. K., & Chen Y. W. A Pediatric Review of Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. // *J Pediatr Neurol.* - 2018. - V. 16. № 4. - P. 222-231. doi: 10.1055/s-0037-1604197
65. Marra G., & Boland C. R. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. // *J Natl Cancer Inst.* - 1995. - V. 87. № 15. - P. 1114-1125. doi: 10.1093/jnci/87.15.1114
66. Mason A. G., Sliker R. C., Balog J., Lemmers R., Wong C. J., Yao Z., Lim J. W., Filippova G. N., Ne E., Tawil R., Heijmans B. T., Tapscott S. J., & van der Maarel S. M. SMCHD1 regulates a limited set of gene clusters on autosomal chromosomes. // *Skelet Muscle.* - 2017. - V. 7. № 1. - P. 12. doi: 10.1186/s13395-017-0129-7
67. Mathews K. D., Mills K. A., Bosch E. P., Ionasescu V. V., Wiles K. R., Buetow K. H., & Murray J. C. Linkage localization of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) in 4q35. // *Am J Hum Genet.* - 1992. - V. 51. № 2. - P. 428-431.
68. McClintock B. Controlling elements and the gene. // *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* - 1956. - V. 21. - P. 197-216. doi: 10.1101/sqb.1956.021.01.017
69. Mitsuhashi S., Nakagawa S., Takahashi Ueda M., Imanishi T., Frith M. C., & Mitsuhashi H. Nanopore-based single molecule sequencing of the D4Z4 array responsible for facioscapulohumeral muscular dystrophy. // *Sci Rep.* - 2017. - V. 7. № 1. - P. 14789. doi: 10.1038/s41598-017-13712-6
70. Morris E. E., Amria M. Y., Kistner-Griffin E., Svenson J. L., Kamen D. L., Gilkeson G. S., & Nowling T. K. A GA microsatellite in the Fli1 promoter modulates gene expression and is associated with systemic lupus erythematosus patients without nephritis. // *Arthritis Res Ther.* - 2010. - V. 12. № 6. - P. R212. doi: 10.1186/ar3189
71. Mostacciolo M. L., Pastorello E., Vazza G., Miorin M., Angelini C., Tomelleri G., Galluzzi G., & Trevisan C. P. Facioscapulohumeral muscular dystrophy: epidemiological and molecular study in a north-east Italian population sample. // *Clin Genet.* - 2009. - V. 75. № 6. - P. 550-555. doi: 10.1111/j.1399-0004.2009.01158.x

72. Mould A. W., Pang Z., Pakusch M., Tonks I. D., Stark M., Carrie D., Mukhopadhyay P., Seidel A., Ellis J. J., Deakin J., Wakefield M. J., Krause L., Blewitt M. E., & Kay G. F. Smchd1 regulates a subset of autosomal genes subject to monoallelic expression in addition to being critical for X inactivation. // *Epigenetics Chromatin*. - 2013. - V. 6. № 1. - P. 19. doi: 10.1186/1756-8935-6-19
73. Newlands S., Levitt L. K., Robinson C. S., Karpf A. B., Hodgson V. R., Wade R. P., & Hardeman E. C. Transcription occurs in pulses in muscle fibers. // *Genes Dev*. - 1998. - V. 12. № 17. - P. 2748-2758. doi: 10.1101/gad.12.17.2748
74. Nguyen K., Walrafen P., Bernard R., Attarian S., Chaix C., Vovan C., Renard E., Dufrane N., Pouget J., Vannier A., Bensimon A., & Levy N. Molecular combing reveals allelic combinations in facioscapulohumeral dystrophy. // *Ann Neurol*. - 2011. - V. 70. № 4. - P. 627-633. doi: 10.1002/ana.22513
75. Norwood F. L., Harling C., Chinnery P. F., Eagle M., Bushby K., & Straub V. Prevalence of genetic muscle disease in Northern England: in-depth analysis of a muscle clinic population. // *Brain*. - 2009. - V. 132. № Pt 11. - P. 3175-3186. doi: 10.1093/brain/awp236
76. Ohno S. So much "junk" DNA in our genome. // *Brookhaven Symp Biol*. - 1972. - V. 23. - P. 366-370.
77. Padberg G. Facioscapulohumeral disease. (PhD thesis), University of Leiden, Leiden, The Netherlands. - 1982. - P. Pages.
78. Padberg G. W. Facioscapulohumeral disease. (MD Doctoral Thesis), Leiden University. Retrieved from <http://hdl.handle.net/1887/25818> - 1982. - P. Pages.
79. Padberg G. W. Facioscapulohumeral muscular dystrophy: a clinician's experience. In D. Cooper & M. Upadhyaya (Eds.), *Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy (FSHD): Clinical Medicine and Molecular Cell Biology*. London, New York: Garland Science/BIOS Scientific Publishers Limited. - 2004. - V. № Issue, - P. 41-51.
80. Padberg G. W., Brouwer O. F., de Keizer R. J., Dijkman G., Wijmenga C., Grote J. J., & Frants R. R. On the significance of retinal vascular disease and hearing loss in facioscapulohumeral muscular dystrophy. // *Muscle Nerve Suppl*. - 1995. - V. 2. - P. S73-80.
81. Padberg G. W., Brouwer O. F., Dekeizer R. J. W., Dijkman G., Wijmenga C., Grote J. J., & Frants R. R. On the Significance of Retinal Vascular-Disease and Hearing-Loss in Facioscapulohumeral Muscular-Dystrophy. // *Muscle & Nerve*. - 1995. - P. S73-S80.

82. Padberg G. W., Frants R. R., Brouwer O. F., Wijmenga C., Bakker E., & Sandkuijl L. A. Facioscapulohumeral muscular dystrophy in the Dutch population. // *Muscle Nerve Suppl.* - 1995. № 2. - P. S81-84.
83. Pal-Bhadra M., Leibovitch B. A., Gandhi S. G., Chikka M. R., Bhadra U., Birchler J. A., & Elgin S. C. Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. // *Science.* - 2004. - V. 303. № 5658. - P. 669-672. doi: 10.1126/science.1092653
84. Papa S., Guerrieri F., Zanotti F., Capozza G., Fiermonte M., Cocco T., Altendorf K., & Deckers-Hebersteit G. F0 and F1 subunits involved in the gate and coupling function of mitochondrial H⁺ ATP synthase. // *Ann N Y Acad Sci.* - 1992. - V. 671. - P. 345-358.
85. Papanikos F., Skoulatou C., Sakellariou P., Kekou K., Christopoulos T. K., Kanavakis E., Traeger-Synodinos J., & Ioannou P. C. A simplified approach for FSHD molecular testing. // *Clin Chim Acta.* - 2014. - V. 429. - P. 96-103. doi: 10.1016/j.cca.2013.11.032
86. Probst A. V., Okamoto I., Casanova M., El Marjou F., Le Baccon P., & Almouzni G. A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development. // *Dev Cell.* - 2010. - V. 19. № 4. - P. 625-638. doi: 10.1016/j.devcel.2010.09.002
87. Rossi M., Ricci E., Colantoni L., Galluzzi G., Frusciante R., Tonali P. A., & Felicetti L. The Facioscapulohumeral muscular dystrophy region on 4qter and the homologous locus on 10qter evolved independently under different evolutionary pressure. // *BMC Med Genet.* - 2007. - V. 8. - P. 8. doi: 10.1186/1471-2350-8-8
88. Sabin L. R., Delas M. J., & Hannon G. J. Dogma derailed: the many influences of RNA on the genome. // *Mol Cell.* - 2013. - V. 49. № 5. - P. 783-794. doi: 10.1016/j.molcel.2013.02.010
89. Sacconi S., Lemmers R. J. L. F., Balog J., van der Vliet P. J., Lahaut P., van Nieuwenhuizen M. P., Straasheijm K. R., Debipersad R. D., Vos-Versteeg M., Salviati L., Casarin A., Pegoraro E., Tawil R., Bakker E., Tapscott S. J., Desnuelle C., & van der Maarel S. M. The FSHD2 Gene SMCHD1 Is a Modifier of Disease Severity in Families Affected by FSHD1. // *Am J Hum Genet.* - 2013. - V. 93. № 4. - P. 744-751. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.08.004

90. Schaap M., Lemmers R. J., Maassen R., van der Vliet P. J., Hoogerheide L. F., van Dijk H. K., Basturk N., de Knijff P., & van der Maarel S. M. Genome-wide analysis of macrosatellite repeat copy number variation in worldwide populations: evidence for differences and commonalities in size distributions and size restrictions. // *BMC Genomics*. - 2013. - V. 14. - P. 143. doi: 10.1186/1471-2164-14-143
91. Scully M. A., Eichinger K. J., Donlin-Smith C. M., Tawil R., & Statland J. M. Restrictive lung involvement in facioscapulohumeral muscular dystrophy. // *Muscle & Nerve*. - 2014. - V. 50. № 5. - P. 739-743. doi: 10.1002/mus.24218
92. Snider L., Asawachaicharn A., Tyler A. E., Geng L. N., Petek L. M., Maves L., Miller D. G., Lemmers R. J., Winokur S. T., Tawil R., van der Maarel S. M., Filippova G. N., & Tapscott S. J. RNA transcripts, miRNA-sized fragments and proteins produced from D4Z4 units: new candidates for the pathophysiology of facioscapulohumeral dystrophy. // *Hum Mol Genet*. - 2009. - V. 18. № 13. - P. 2414-2430. doi: 10.1093/hmg/ddp180
93. Snider L., Geng L. N., Lemmers R. J., Kyba M., Ware C. B., Nelson A. M., Tawil R., Filippova G. N., van der Maarel S. M., Tapscott S. J., & Miller D. G. Facioscapulohumeral dystrophy: incomplete suppression of a retrotransposed gene. // *PLoS Genet*. - 2010. - V. 6. № 10. - P. e1001181. doi: 10.1371/journal.pgen.1001181
94. Solen G., Edgren M., Scott O. C., & Revesz L. Radioprotection by dithiothreitol (DTT) at varying oxygen concentrations: predictions of a modified competition model and theory evaluation. // *Int J Radiat Biol*. - 1991. - V. 59. № 2. - P. 409-418. doi: 10.1080/09553009114550371
95. Stanton J., Taucher-Scholz G., Schneider M., Heilmann J., & Kraft G. Protection of DNA from high LET radiation by two OH radical scavengers, tris (hydroxymethyl) aminomethane and 2-mercaptoethanol. // *Radiat Environ Biophys*. - 1993. - V. 32. № 1. - P. 21-32.
96. Statland J. M., McDermott M. P., Heatwole C., Martens W. B., Pandya S., van der Kooi E. L., Kissel J. T., Wagner K. R., & Tawil R. Reevaluating measures of disease progression in facioscapulohumeral muscular dystrophy. // *Neuromuscular Disorders*. - 2013. - V. 23. № 4. - P. 306-312. doi: 10.1016/j.nmd.2013.01.008

97. Tanaka Y., Katagiri Z., Kawahashi K., Kioussis D., & Kitajima S. Trithorax-group protein ASH1 methylates histone H3 lysine 36. // *Gene*. - 2007. - V. 397. № 1-2. - P. 161-168. doi: 10.1016/j.gene.2007.04.027
98. Tassin A., Laoudj-Chenivresse D., Vanderplanck C., Barro M., Charron S., Anseau E., Chen Y. W., Mercier J., Coppee F., & Belayew A. DUX4 expression in FSHD muscle cells: how could such a rare protein cause a myopathy? // *J Cell Mol Med*. - 2013. - V. 17. № 1. - P. 76-89. doi: 10.1111/j.1582-4934.2012.01647.x
99. Tawil R. Facioscapulohumeral muscular dystrophy. // *Neurotherapeutics*. - 2008. - V. 5. № 4. - P. 601-606. doi: 10.1016/j.nurt.2008.07.005
100. Tawil R., Forrester J., Griggs R. C., Mendell J., Kissel J., McDermott M., King W., Weiffenbach B., & Figlewicz D. Evidence for anticipation and association of deletion size with severity in facioscapulohumeral muscular dystrophy. The FSH-DY Group. // *Ann Neurol*. - 1996. - V. 39. № 6. - P. 744-748. doi: 10.1002/ana.410390610
101. Tawil R., Storvick D., Feasby T. E., Weiffenbach B., & Griggs R. C. Extreme variability of expression in monozygotic twins with FSH muscular dystrophy. // *Neurology*. - 1993. - V. 43. № 2. - P. 345-348. doi: 10.1212/wnl.43.2.345
102. Tawil R., & Van der Maarel S. M. Facioscapulohumeral muscular dystrophy. // *Muscle & Nerve*. - 2006. - V. 34. № 1. - P. 1-15. doi: 10.1002/mus.20522
103. Thibodeau S. N., Bren G., & Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. // *Science*. - 1993. - V. 260. № 5109. - P. 816-819. doi: 10.1126/science.8484122
104. Tremblay D. C., Alexander G., Jr., Moseley S., & Chadwick B. P. Expression, tandem repeat copy number variation and stability of four macrosatellite arrays in the human genome. // *BMC Genomics*. - 2010. - V. 11. - P. 632. doi: 10.1186/1471-2164-11-632
105. Tremblay D. C., Moseley S., & Chadwick B. P. Variation in array size, monomer composition and expression of the macrosatellite DXZ4. // *PLoS One*. - 2011. - V. 6. № 4. - P. e18969. doi: 10.1371/journal.pone.0018969
106. Tsumagari K., Chen D., Hackman J. R., Bossler A. D., & Ehrlich M. FSH dystrophy and a subtelomeric 4q haplotype: a new assay and associations with disease. // *J Med Genet*. - 2010. - V. 47. № 11. - P. 745-751. doi: 10.1136/jmg.2009.076703

107. Tupler R., Berardinelli A., Barbierato L., Frants R., Hewitt J. E., Lanzi G., Maraschio P., & Tiepolo L. Monosomy of distal 4q does not cause facioscapulohumeral muscular dystrophy. // *J Med Genet.* - 1996. - V. 33. № 5. - P. 366-370.
108. Upadhyaya M., Lunt P., Sarfarazi M., Broadhead W., Farnham J., & Harper P. S. The mapping of chromosome 4q markers in relation to facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). // *Am J Hum Genet.* - 1992. - V. 51. № 2. - P. 404-410.
109. Upadhyaya M., Lunt P. W., Sarfarazi M., Broadhead W., Daniels J., Owen M., & Harper P. S. DNA marker applicable to presymptomatic and prenatal diagnosis of facioscapulohumeral disease. // *Lancet.* - 1990. - V. 336. № 8726. - P. 1320-1321.
110. van Deutekom J. C., Wijmenga C., van Tienhoven E. A., Gruter A. M., Hewitt J. E., Padberg G. W., van Ommen G. J., Hofker M. H., & Frants R. R. FSHD associated DNA rearrangements are due to deletions of integral copies of a 3.2 kb tandemly repeated unit. // *Hum Mol Genet.* - 1993. - V. 2. № 12. - P. 2037-2042.
111. van Geel M., Dickson M. C., Beck A. F., Bolland D. J., Frants R. R., van der Maarel S. M., de Jong P. J., & Hewitt J. E. Genomic analysis of human chromosome 10q and 4q telomeres suggests a common origin. // *Genomics.* - 2002. - V. 79. № 2. - P. 210-217. doi: 10.1006/geno.2002.6690
112. van Overveld P. G., Lemmers R. J., Deidda G., Sandkuijl L., Padberg G. W., Frants R. R., & van der Maarel S. M. Interchromosomal repeat array interactions between chromosomes 4 and 10: a model for subtelomeric plasticity. // *Hum Mol Genet.* - 2000. - V. 9. № 19. - P. 2879-2884. doi: 10.1093/hmg/9.19.2879
113. van Overveld P. G., Lemmers R. J., Sandkuijl L. A., Enthoven L., Winokur S. T., Bakels F., Padberg G. W., van Ommen G. J., Frants R. R., & van der Maarel S. M. Hypomethylation of D4Z4 in 4q-linked and non-4q-linked facioscapulohumeral muscular dystrophy. // *Nature Genetics.* - 2003. - V. 35. № 4. - P. 315-317. doi: 10.1038/ng1262
114. Vasale J., Boyar F., Jocson M., Sulcova V., Chan P., Liaquat K., Hoffman C., Meservey M., Chang I., Tsao D., Hensley K., Liu Y., Owen R., Braastad C., Sun W., Walrafen P., Komatsu J., Wang J. C., Bensimon A., Anguiano A., Jaremko M., Wang Z., Batish S., Strom C., & Higgins J. Molecular combing compared to Southern blot for measuring D4Z4 contractions in FSHD. // *Neuromuscul Disord.* - 2015. - V. 25. № 12. - P. 945-951. doi: 10.1016/j.nmd.2015.08.008

115. Volpe T. A., Kidner C., Hall I. M., Teng G., Grewal S. I., & Martienssen R. A. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. // *Science*. - 2002. - V. 297. № 5588. - P. 1833-1837. doi: 10.1126/science.1074973
116. Wallace L. M., Garwick S. E., Mei W., Belayew A., Coppee F., Ladner K. J., Guttridge D., Yang J., & Harper S. Q. DUX4, a candidate gene for facioscapulohumeral muscular dystrophy, causes p53-dependent myopathy in vivo. // *Ann Neurol*. - 2011. - V. 69. № 3. - P. 540-552. doi: 10.1002/ana.22275
117. Wang B., Ren J., Ooi L. L., Chong S. S., & Lee C. G. Dinucleotide repeats negatively modulate the promoter activity of Cyr61 and is unstable in hepatocellular carcinoma patients. // *Oncogene*. - 2005. - V. 24. № 24. - P. 3999-4008. doi: 10.1038/sj.onc.1208550
118. Warburton P. E., Hasson D., Guillem F., Lescale C., Jin X., & Abrusan G. Analysis of the largest tandemly repeated DNA families in the human genome. // *BMC Genomics*. - 2008. - V. 9. - P. 533. doi: 10.1186/1471-2164-9-533
119. White S. J., & Cantsilieris S. Genotyping : methods and protocols. - V. - P. 107-125.
120. Wijmenga C., Frants R. R., Brouwer O. F., Moerer P., Weber J. L., & Padberg G. W. Location of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene on chromosome 4. // *Lancet*. - 1990. - V. 336. № 8716. - P. 651-653.
121. Wijmenga C., Frants R. R., Hewitt J. E., van Deutekom J. C., van Geel M., Wright T. J., Padberg G. W., Hofker M. H., & van Ommen G. J. Molecular genetics of facioscapulohumeral muscular dystrophy. // *Neuromuscul Disord*. - 1993. - V. 3. № 5-6. - P. 487-491.
122. Wijmenga C., Hewitt J. E., Sandkuijl L. A., Clark L. N., Wright T. J., Dauwerse H. G., Gruter A. M., Hofker M. H., Moerer P., Williamson R., & et al. Chromosome 4q DNA rearrangements associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. // *Nature Genetics*. - 1992. - V. 2. № 1. - P. 26-30. doi: 10.1038/ng0992-26
123. Wijmenga C., Padberg G. W., Moerer P., Wiegant J., Liem L., Brouwer O. F., Milner E. C., Weber J. L., van Ommen G. B., Sandkuyl L. A., & et al. Mapping of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene to chromosome 4q35-qter by multipoint linkage analysis and in situ hybridization. // *Genomics*. - 1991. - V. 9. № 4. - P. 570-575.

124. Winokur S. T., Bengtsson U., Feddersen J., Mathews K. D., Weiffenbach B., Bailey H., Markovich R. P., Murray J. C., Wasmuth J. J., Altherr M. R., & et al. The DNA rearrangement associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy involves a heterochromatin-associated repetitive element: implications for a role of chromatin structure in the pathogenesis of the disease. // *Chromosome Res.* - 1994. - V. 2. № 3. - P. 225-234.

125. Yee W., Kumar J. N., & Muthusamy P. D. Inclusion of 2-Mercaptoethanol in Lysis Buffer Could Interfere with Isolation of High Molecular Weight DNA from Freshwater Microalgae. // *Indian J Microbiol.* - 2018. - V. 58. № 1. - P. 109-113. doi: 10.1007/s12088-017-0698-5

126. Yuan W., Xu M., Huang C., Liu N., Chen S., & Zhu B. H3K36 methylation antagonizes PRC2-mediated H3K27 methylation. // *J Biol Chem.* - 2011. - V. 286. № 10. - P. 7983-7989. doi: 10.1074/jbc.M110.194027

127. Zatz M., Marie S. K., Passos-Bueno M. R., Vainzof M., Campiotto S., Cerqueira A., Wijmenga C., Padberg G., & Frants R. High proportion of new mutations and possible anticipation in Brazilian facioscapulohumeral muscular dystrophy families. // *Am J Hum Genet.* - 1995. - V. 56. № 1. - P. 99-105.

128. Zeng W., de Greef J. C., Chen Y. Y., Chien R., Kong X., Gregson H. C., Winokur S. T., Pyle A., Robertson K. D., Schmiesing J. A., Kimonis V. E., Balog J., Frants R. R., Ball A. R., Jr., Lock L. F., Donovan P. J., van der Maarel S. M., & Yokomori K. Specific loss of histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1gamma/cohesin binding at D4Z4 repeats is associated with facioscapulohumeral dystrophy (FSHD). // *PLoS Genet.* - 2009. - V. 5. № 7. - P. e1000559. doi: 10.1371/journal.pgen.1000559

129. Zheng S. X., Newton G. L., Gonick G., Fahey R. C., & Ward J. F. Radioprotection of DNA by Thiols - Relationship between the Net Charge on a Thiol and Its Ability to Protect DNA. // *Radiation Research.* - 1988. - V. 114. № 1. - P. 11-27. doi: Doi 10.2307/3577140

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Пример клинического случая МЛД1 с ранним вариантом дебюта

Приводим историю болезни. 12-летней девочки К., наблюдавшейся по поводу жалоб родителей на снижение слуха, умственную отсталость, мышечную слабость, нарушение походки. Из анамнеза известно, что девочка единственный ребенок в семье, рождена от молодых и здоровых родителей. Беременность протекала на фоне токсикоза в 1 триместре. Роды 1, стремительные, при рождении вес 3500, длина 54 см, по Апгар 8/8 баллов. На первом месяце жизни отмечалось повышение нейро-рефлекторной возбудимости. В возрасте восьми месяцев привита АКДС, после чего некоторое время наблюдался слабый контроль головы. Однако в дальнейшем моторные навыки набирала по возрасту. Ходит с 1 года 1 месяца. На первом году жизни отмечалась задержка предречевого развития (периоды «гуления» и «бубнения» отсутствовали, обращенную речь понимала плохо). При активном расспросе родителей удалось выяснить, что слабость мимической мускулатуры присутствовала практически с рождения, спала с приоткрытыми глазными щелями, вяло сосала. Задержка психо-речевого развития стала более очевидна к 3 годам, тогда же выявлена двусторонняя нейросенсорная тугоухость 2 степени. По этому поводу в 2009 году проводилось молекулярно-генетическое исследование, направленное на поиск мутаций в гене *GJB2*, ответственного за развитие одного из наиболее распространенных вариантов наследственной тугоухости с аутосомно-рецессивным типом наследования. Однако выявлена лишь гетерозиготная мутация с.35delG в гене коннексина 26. Явное нарушение походки и поясничный гиперлордоз появились в возрасте 6 лет. Заболевание медленно прогрессировало.

При объективном осмотре в 12 лет: контакт затруднен из-за интеллектуального дефицита и тугоухости, обращенную речь понимает на бытовом уровне, подражает выборочно. Одевается при помощи взрослого. Умеет пользоваться ложкой. Навыки опрятности сформированы. Речь дизартрична, слабо модулирована, периодически возникает эхолалия. Отмечается выраженная слабость мимической и жевательной мускулатуры. Глотание не нарушено. Выраженная слабость мышц лопаток, проксимальных отделов рук, плечевого и тазового поясов, перонеальной группы, больше

выраженные справа. Грубый поясничный гиперлордоз, сколиоз грудного отдела позвоночника, «крыловидные лопатки», контрактуры голеностопных суставов, эквинуварусная деформация стоп (**фото**). Походка неустойчивая с широкой базой, изменена по типу «утиной» с опорой на пальцы стоп и элементами ступажа. Отмечалась выраженная слабость тыльного сгибания стоп. При подъеме с кушетки использует приемы Говерса. Мышечная сила рук была снижена в проксимальных отделах до 2,5 баллов, в дистальных отделах не изменена. Руки выше горизонтального уровня не поднимает, манипулирует в основном левой кистью. Мышечная сила в проксимальных отделах ног снижена до 3,5 баллов, в дистальных отделах – до 2,5 баллов. Сухожильные рефлексy с рук резко ослаблены, с ног не вызываются. Расстройств чувствительности и координации не выявлено. Тогда же было выявлено повышение уровня активности КФК в сыворотке крови до 287 ед/л (при норме до 190 ед/л). При проведении мышечной биопсии обнаружены признаки мышечной дистрофии. На ЭМГ выявлены не резко выраженные признаки первично-мышечной патологии. На ЭЭГ (исследование проведено в состоянии активного бодрствования и без гипервентиляции) доминирует высокоамплитудная низкочастотная бета-активность, альфа ритма отсутствует. Отчетливой межполушарной асимметрии и эпилептиформной активности не отмечено. УЗИ брюшной полости и почек от 2014 года: реактивные изменения печени, поджелудочной железы. Относительное уменьшение объема правой почки (относительно левой), правосторонний нефроптоз. При исследовании кариотипа в 2013 году обнаружен нормальный полиморфизм в виде удлинения спутничных нитей хромосомы 15 (46, XX, 15, pstk+). При проведении МРТ головного мозга значимых структурных изменений выявлено не было.

При проведении молекулярно-генетического исследования у ребенка обнаружено укорочение длины массива D4Z4 в результате уменьшения числа макросателлитных повторов до 7-8 в регионе хромосомы 4q35, что позволило диагностировать МЛД 1 типа.

Приложение 2. Пример клинического случая МЛД1 с классическим вариантом дебюта

В качестве демонстрации особенности клинических проявлений этого варианта МЛД, приводим историю болезни 46-летнего мужчины М., наблюдавшегося в течение 10 лет. Из анамнеза известно, что он рос и развивался соответственно возрасту до 7 лет, когда впервые на школьных занятиях физкультурой заметили «крыловидные лопатки» и слабость в мышцах плечевого пояса. К 14 годам патологический процесс распространился на проксимальные отделы верхних конечностей, появилось выраженное ограничение подъема рук выше горизонтального уровня, а еще через 6 лет больной стал отмечать похудание и слабость мышц голеней, нарушение походки в виде степпажа. При неоднократном исследовании уровня активности КФК в сыворотке крови отклонений от нормы выявлено не было. При проведении ЭНМГ регистрировался первично-мышечный уровень поражения. При осмотре больного в возрасте 36 лет отмечена выраженная слабость мимических мышц, (фото) при сохранности функции жевательной мускулатуры и мышц гортани и глотки. Выявляется диффузная мышечная гипотрофия, больше выраженная в мышцах плечевого пояса, проксимальных отделах рук, надостных и подостных мышц, а также дистальных отделах ног. Поясничный гиперлордоз был выражен умеренно. Характерной особенностью клинических проявлений заболевания была значимая асимметрия поражения мышц верхних и нижних конечностей. Так, мышечная сила в проксимальных отделах рук слева составляла 3 балла, в то время как справа не превышала 2,5 баллов. В дистальных группах мышц левой ноги сила составляла 4 балла, в то время как, в правой была снижена до 2,5 баллов. Коленный и ахиллов рефлекс слева был сохранен, а справа не вызывался. Нарушения функции черепно-мозговых нервов, а также расстройств чувствительности и координации выявлено не было.

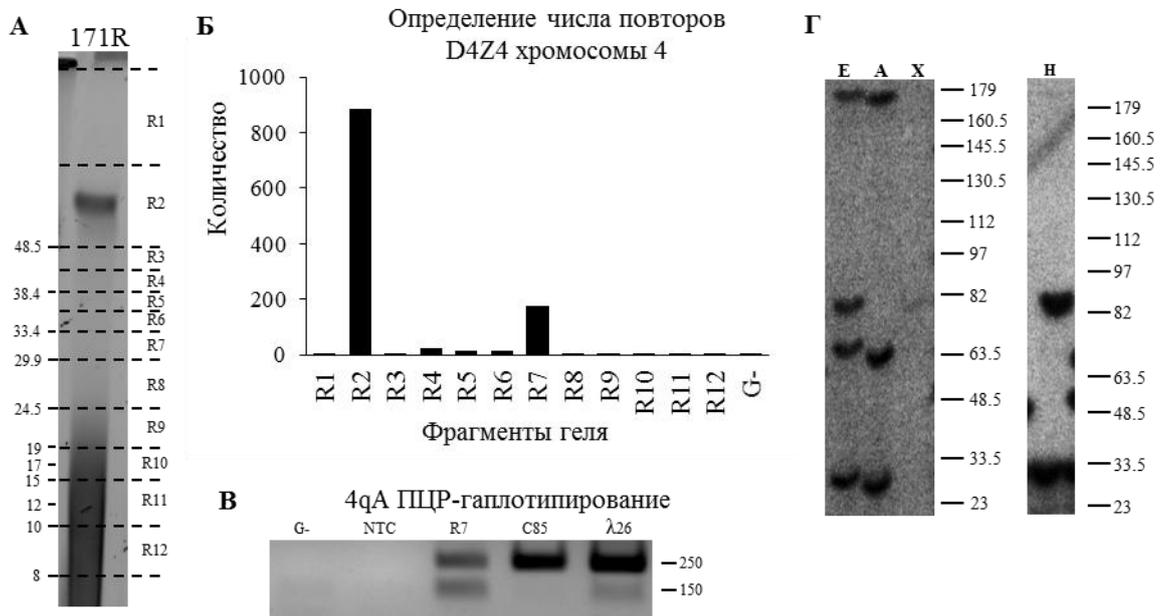
При повторном осмотре больного через 10 лет к ранее описанной клинической картине присоединилась слабость мышц тазового пояса, усилился поясничный гиперлордоз, при подъеме с кушетки стал использовать приемы Говерса, увеличился стептаж. Асимметрия поражения мышц верхних и нижних конечностей сохранялась. При проведении молекулярно-генетического исследования выявлено уменьшения числа макросателлитных повторов в регионе хромосомы 4q35 до 7.

Приложение 3. Пример клинического случая МЛД1 с поздним вариантом дебюта

Пациент обратился с жалобами на слабость и уменьшение объема мышц плеч с обеих сторон, правого бедра и левой голени и болей в поясничном отделе, возникающих при статической нагрузке. Первыми признаками заболевания явилась неловкость в правой ноге и кифотическое нарушение осанки, которые больной отметил 5 лет назад. Несколько месяцев спустя больной отметил уменьшение объема мышц плечевого пояса. Гиперлордоз поясничного отдела отмечал всегда, но связывал его с особенностями фигуры, присущей спортсменам, занимающихся вольной борьбой. При неврологическом осмотре выявлен умеренно выраженный поясничный гиперлордоз, грудной кифосколиоз 1 степени, симметричная гипотрофия проксимальных отделов рук, надостных и подостных мышц, «крыловидные лопатки». Руки вверх поднимал рывком. Несколько затруднена ходьба на пятках. Сила мышц в проксимальных отделах верхних конечностей 3 балла, нижних конечностей 4 балла, в дистальных отделах нижних конечностей 4 балла. Сухожильные рефлексы с рук и ног не вызывались. Расстройств чувствительности и координации, а также поражения ЧМН выявлено не было. Уровень активности КФК в сыворотке крови больного несколько повышен до 273 ед/л (при норме до 195 ед/л). ЭКГ без отклонений от нормы. ЭХО-КГ: размеры полостей сердца в норме, нарушений сократимости не выявлено. Митральная и трикуспидальная регургитация 0-1 степени, уплотнение корня аорты. Недостаточность клапана легочной артерии незначительная. МРТ поясничного отдела позвоночника: МР-картина остеохондроза, деформирующего спондилеза пояснично-крестцового отдела позвоночника. Задняя центральная грыжа межпозвоночного диска L5-S1, протрузии межпозвоночных дисков L4-L5, L2-L3 в составе дискоостеофитных комплексов. Грыжа Шморля L4-L5. МРТ шейного отдела позвоночника: МР-картина остеохондроза. Грыжа диска C5-C6 с латерализацией вправо с размером 3,7 мм с компрессией переднего субарохноидального пространства и сужением правого корешкового отверстия. Задние протрузии межпозвоночных дисков C3-C4, C4-C5. Стимуляционная ЭМГ: признаки аксонопатии разной степени выраженности правого срединного, локтевого и большеберцового нервов. Игольчатая ЭМГ: параметры двигательных единиц изменены по первично-мышечному типу. Регистрируются потенциалы разрушающихся двигательных единиц.

Таким образом, особенностью данного случая было отсутствие слабости лицевой мускулатуры, которая является специфическим признаком МЛД1, позволяющим с высокой долей вероятности предположить наличие этого варианта наследственных мышечных дистрофий при клиническом осмотре. Кроме того, наличие выраженных признаков деформирующего спондилеза и остеохондроза при проведении МРТ спинного мозга, незначительное повышение уровня активности КФК в плазме крови и аксональный уровень поражения при проведении стимуляционной ЭМГ привели к тому, что длительное время диагностика МЛД1 не была проведена. Наиболее вероятным представлялось наличие одного из генетических вариантов скапуло-перонеальной мышечной дистрофии. В связи с этим, с диагностической целью больному было проведено секвенирование экзона в клинике «Геномед», в результате которого мутаций в известных к настоящему времени генах, ответственных за возникновение моногенных вариантов прогрессирующих мышечных дистрофий, выявлено не было. Количество макросателлитных повторов было снижено до 5.

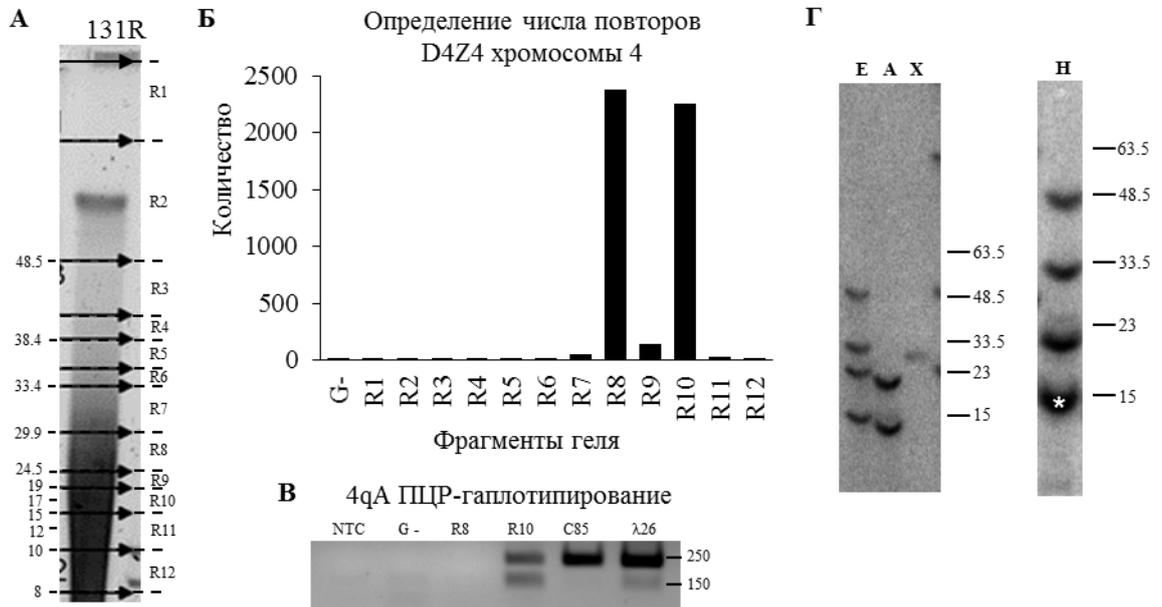
Приложение 4. Результаты диагностики МЛД1 для пациента с одним укороченным аллелем массива повторов D4Z4 четвертой хромосомы



А – Результат пульс-электрофореза образца ДНК пациента №171. Дорожка геля 171R – образец ДНК после обработки эндонуклеазой EcoRI. Дорожка геля 171R фрагментировалась вручную, границы фрагментов геля отмечены горизонтальными пунктирными линиями. Порядковые номера фрагментов геля обозначены справа. Шкала длин (т.п.н.) маркера молекулярного веса обозначена справа. **Б** – Данные количественной ПЦР, полученные с использованием фрагментов геля в качестве матриц. “G-” отрицательный контроль – фрагмент агарозного геля из зоны вне дорожки геля; R1-R12 данные содержания таргетного локуса во фрагментах геля R1-R12. На основании данных количественной ПЦР, пациент №171 имеет два аллеля массивов D4Z4 четвертой хромосомы, обнаруженные во фрагментах R2(неукороченный аллель >11 единиц D4Z4) и R7(укороченный аллель с 7 единицами D4Z4). **В** – Результаты ПЦР-гаплотипирования, NTC – негативный контроль; G- – контроль контаминации агарозного геля; C85 – результаты, полученные с использованием 10 pg космиды C85(гаплотип 10qA) в качестве матрицы; λ26 – результаты, полученные с использованием 10 pg космиды λ260201(гаплотип 4qA) в качестве матрицы. R7 – результаты, полученные с использованием фрагмента геля R7 в качестве матрицы. **Г** – Результаты гибридизации по Саузерну образца ДНК пациента №171; слева – результаты определения длин и хромосомной принадлежности массивов D4Z4. Е – результат после обработки ДНК

эндонуклеазой EcoRI. А – результат после обработки ДНК эндонуклеазами EcoRI и AvrII. X – результат после обработки ДНК эндонуклеазой XapI. Справа – результаты гаплотипирования массивов D4Z4. Н – результат после обработки ДНК эндонуклеазой HindIII. Шкала длин (т.п.н.) маркера молекулярного веса обозначена справа.

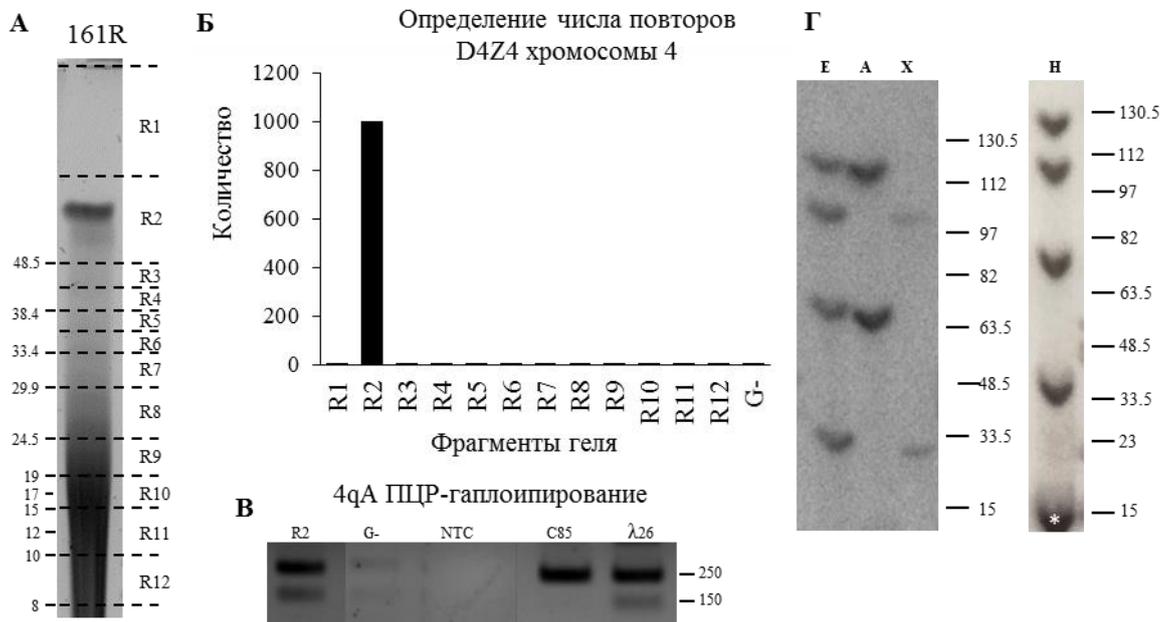
Приложение 5. Результаты диагностики МЛД1 для пациента с двумя укороченными аллелями массива повторов D4Z4 четвертой хромосомы



А – Результат пульс-электрофореза образца ДНК пациента №131. Дорожка геля 131R – образец ДНК после обработки эндонуклеазой EcoRI. Дорожка геля 131R фрагментировалась вручную, границы фрагментов геля отмечены горизонтальными пунктирными линиями. Порядковые номера фрагментов геля обозначены справа. Шкала длин (т.п.н.) маркера молекулярного веса обозначена справа. **Б** – Данные количественной ПЦР, полученные с использованием фрагментов геля в качестве матриц. “G-” отрицательный контроль – фрагмент агарозного геля из зоны вне дорожки геля; R1-R12 данные содержания таргетного локуса во фрагментах геля R1-R12. На основании данных количественной ПЦР, пациент №171 имеет два аллеля массива D4Z4 четвертой хромосомы, обнаруженные во фрагменте R8(укороченный аллель, 6 единиц D4Z4) и R10(укороченный аллель с 3 единицами D4Z4). **В** – Результаты ПЦР-гаплотипирования, NTC – негативный контроль; G- – контроль контаминации агарозного геля; C85 – результаты, полученные с использованием 10 pg космиды C85(гаплотип 10qA) в качестве матрицы; λ26 – результаты, полученные с использованием 10 pg космиды λ260201(гаплотип 4qA) в качестве матрицы. R8 – результаты полученные с использованием фрагмента геля R8 в качестве матрицы; R10 – результаты полученные с использованием фрагмента геля R10 в качестве матрицы. **Г** – Результаты гибридизации по Саузерну образца ДНК пациента №131; слева – результаты определения длин и

хромосомной принадлежности массивов D4Z4. E – результат после обработки ДНК эндонуклеазой EcoRI. A – результат после обработки ДНК эндонуклеазами EcoRI и AvrII. X – результат после обработки ДНК эндонуклеазой XapI. Справа – результаты гаплотипирования массивов D4Z4. H – результат после обработки ДНК эндонуклеазой HindIII. Шкала длин (т.п.н.) маркера молекулярного веса обозначена справа. Белая звездочка – неспецифичная гибридизация.

Приложение 6. Результаты диагностики МЛД1 у пациента без укороченных аллелей



А – Результат пульс-электрофореза образца ДНК пациента №161. Дорожка геля 161R – образец ДНК после обработки эндонуклеазой *EcoRI*. Дорожка геля 161R фрагментировалась вручную, границы фрагментов геля отмечены горизонтальными пунктирными линиями. Порядковые номера фрагментов геля обозначены справа. Шкала длин (т.п.н.) маркера молекулярного веса обозначена справа. **Б** – Данные количественной ПЦР, полученные с использованием фрагментов геля в качестве матриц. “G-” отрицательный контроль – фрагмент агарозного геля из зоны вне дорожки геля; R1-R12 данные содержания таргетного локуса во фрагментах геля R1-R12. На основании данных количественной ПЦР, пациент №161 не имеет укороченных аллелей массивов D4Z4 четвертой хромосомы, неукороченный аллель обнаружен во фрагменте R2(>11 единиц D4Z4). **В** – Результаты ПЦР-гаплотипирования, NTC – негативный контроль; G- – контроль контаминации агарозного геля; C85 – результаты полученные с использованием 10 pg космиды C85(гаплотип 10qA) в качестве матрицы; λ26 – результаты полученные с использованием 10 pg космиды λ260201(гаплотип 4qA) в качестве матрицы. R2 – результаты полученные с использованием фрагмента геля R2 в качестве матрицы. **Г** – Результаты гибридизации по Саузерну образца ДНК пациента №161; слева – результаты определения длин и хромосомной принадлежности массивов D4Z4. E – результат после обработки ДНК эндонуклеазой *EcoRI*. A – результат после обработки ДНК

эндонуклеазами EcoRI и AvrII. X – результат после обработки ДНК эндонуклеазой XapI. Справа – результаты гаплотипирования массивов D4Z4. H – результат после обработки ДНК эндонуклеазой HindIII. Шкала длин (т.п.н.) маркера молекулярного веса обозначена справа. Белая звездочка – неспецифичная гибридизация.

Приложение 7. Таблица с результатами диагностики МЛД1 методиками гибридизации по Саузерну, молекулярного комбинга и количественной ПЦР с агарозным гелем

RU - число повторов D4Z4 на аллеле четвертой хромосомы; U - результат невозможно интерпретировать; P - пермиссивный (патогенный) аллель; NP - непермиссивный (непатогенный) аллель. Аллели с числом повторов >11 не патогенные. Красным выделены случаи несовпадения результатов между методиками. Желтым выделен случай спорных результатов. Пунктир - данные отсутствуют либо исследование не проведено.

