



МЕТОДОЛОГИЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ЭКСПАНСИИ ПРОСТЫХ ПОВТОРОВ У БОЛЬНЫХ МИОТОНИЧЕСКОЙ ДИСТРОФИЕЙ

Чемерис Д.А., Мурзабаев М.Р.

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики
Уфимского научного центра РАН, Уфа, chemeris@gmail.com

Резюме

Миотоническая дистрофия бывает двух типов (МД1 и МД2) и вызывается нарушением двух генов DMPK и ZNF9, в которых наблюдается экспансия GC-богатых простых повторов. В 3'-нетранслируемой области гена протеинкиназы мышечной дистрофии обнаруживаются множественные CTG/CAG-повторы, а в первом интроне гена, кодирующего ДНК-связывающий белок (ZNF9) имеются множественные CCTG/CAGG-повторы. Из-за возникающих в этих местах сложных вторичных структур затруднена диагностика числа данных повторов и необходимо использовать весьма трудоемкую и длительную процедуру блот-гибридизации по Саузерну. Однако для проведения более быстрой и дешевой диагностики с помощью ПЦР предлагаются различные вариации этого метода, способствующие установлению у пациентов заболевания на генетическом уровне или риска его развития с возрастом.

Ключевые слова: миотоническая дистрофия, наследственные болезни, экспансия простых повторов, CTG/CAG повторы, CCTG/CAGG-повторы, ПЦР

Около 30 наследственных заболеваний человека обусловлены так называемыми динамическими мутациями в виде увеличивающегося числа копий простых повторов в геномной ДНК типа CTG/CAG, CCTG/CAGG, CGG/CCG и др. [Mirkin, 2007]. Среди болезней подобного рода есть такое серьезное нарушение здоровья как миотоническая дистрофия, являющаяся одним из самых распространенных наследственных нервно-мышечных заболеваний человека с частотой встречаемости более чем 1:8000. Это аутосомно-доминантное, мультистемное расстройство, в основном характеризующееся миотонией и прогрессирующей мышечной слабостью [Mankodi, 2008]. Для миотонической дистрофии известно два генетических типа, получивших обозначение МД1 и МД2 и имеющих в целом сходные проявления, но несколько отличающиеся тяжестью заболевания. Предполагается, что патогенные механизмы и для МД1 и МД2 опосредованы ненормальным функционированием мутантных мРНК,

содержащих увеличенное число повторов CUG и CCUG соответственно [Ashizawa, Sarkar, 2011].

Первоначально у пациентов страдающих этим заболеванием было обнаружено увеличение количества тринуклеотидных CTG/CAG-повторов около 3' нетранслируемой области гена DMPK (dystrophia myotonica - protein kinase) — протеинкиназа мышечной дистрофии [Brook et al., 1992; Fu et al., 1992; Mahadevan et al., 1992]. Функция этого белка точно не выяснена, считается, что он необходим для нормального функционирования мышечных и нервных клеток. Вероятно он принимает участие в некоторых важных процессах, происходящих внутри клеток [Kaliman, Lagostera, 2008]. Например, показано ингибирование протеинкиназой мышечной дистрофии специфической субъединицы мышечного белка - миозинфосфатазы, участвующей в процессах мышечного сокращения и расслабления. Обнаружена корреляция между тяжестью заболевания и числом тринуклеотидных повторов. Чем больше повторов, тем раньше

наступает манифестация и болезнь протекает тяжелее. Пациенты с классическими признаками заболевания, проявляющимися во взрослом состоянии, такими как, например, мышечная слабость, имеют от 100 до 1000 CTG/CAG-повторов. У больных, родившихся с более тяжелой врожденной формой заболевания, отмечается повышенное количество CTG/CAG-повторов, часто более 2000. Люди с количеством повторов от 35 до 49 не проявляют признаков болезни, в то время как их дети находятся в группе риска - в случае увеличения числа повторов до критической отметки у них могут проявиться признаки заболевания [Hunter et al., 1992]. В другой работе

отмечается корреляция между количеством повторов и возрастом, при котором проявляются первые симптомы заболевания, показано, что зависимость начинает наблюдаться при наличии как минимум 250 CTG/CAG-повторов [Savic et al., 2002].

Ген DMPK расположен на 19 хромосоме в регионе 19q13.3 и имеет протяженность около 13 т.п.н., в которой содержатся 15 экзонов, кодирующих белок, состоящий из 624 аминокислоты [Shaw et al., 1993]. На рис. 1 приведен фрагмент дистальной части данного гена с областью CTG-повторов.

CCCATGCCGGGTGTTGACCTCGCCCTCTCCCCGCAGGTCCCTAGGCCTGGCCTATCGGAG
V P R P G L S E

GCGCTTTCCCTGCTCCTGTTTCGCCGTTGTTCTGTCTCGTGCCGCCGCCCTGGGCTGCATT
A L S L L L F A V V L S R A A A L G C I

GGGTTGGTGGCCCACGCCGGCCAACTCACCGCAGTCTGGCGCCGCCAGGAGCCGCCCGC
G L V A H A G Q L T A V W R R P G A A R

GCTCCCTGAACCCTAGAACTGCTGTCTTCGACTCCGGGGCCCCGTTGGAAGACTGAGTGC
A P Ter

CCGGGGCACGGCACAGAAGCCGCGCCACCAGCTGCCAGTTTACAACCGCTCCGAGCGTG

GGTCTCCGCCAGCTCCAGTCTGTGATCCGGGGCCGCCCCCTAGCGGCCGGGGAGGGAG

GGGCCGGGTCCGCGGCCGGCGAACGGGGCTCGAAGGGTCTTTGTAGCCGGGAATGCTGCT

GCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG...CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGGGGATCACA

GACCATTTCTTTCTTTTCGGCCAGGCTGAGGCCCTGACGTGGATGGGCAAACCTGCAGGCC

Рис. 1. Нуклеотидная последовательность фрагмента гена протеинкиназы DMPK, включающая часть 14 интрона (показан курсивом), 15 экзон с выведенной аминокислотной последовательностью для него и часть 3'-нетранслируемой области. Варибельная по размеру область CTG повторов выделена подчеркиванием.

Позднее был обнаружен и другой ген, вызывающий миотоническую дистрофию, получивший сокращенное наименование как МД2 [Rapum et al., 1998]. Этот ген, расположенный на 3 хромосоме в регионе 3q21.3, кодирует ДНК-связывающий белок (ZNF9), характеризующийся наличием в первом интроне множественных CCTG/CAGG-повторов [Liquori et al., 2001]. Особенностью этого повторяющегося участка является присутствие в одном блоке сразу трех типов простых повторов (TG)_n(TCTG)_n(CCTG)_n. Причем экспансия характерна только для третьего типа повторов. На рис. 2 приведена

последовательность первого интрона гена ZNF9, где видны разные типы повторов. Признаки заболевания для МД2 проявляются при увеличении количества повторов с 50 до 5000. Установлено, что образующаяся в этом случае измененная версия мРНК, взаимодействует с определенными белками, формируя внутри клетки агрегаты, которые в свою очередь препятствуют производству других белков. Эти нарушения не позволяют клеткам в мышцах и других тканях правильно функционировать, вызывая у пациента симптомы заболевания [Fardaei et al., 2002].

```
1  ggccttataacocatgcaaatgtgtccattaagtggacttggaaatgagtgaatgagatt  
61  actgccagtggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtctgtctgtctgtctgtctgt  
121 tctgtctgtctgtctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctg  
181 cctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctg  
241 cctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctg  
301 cctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctg  
361 cctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctg  
421 cctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctg  
481 cctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctg  
541 cctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctg
```

Рис. 2. Фрагмент гена ZNF9 с интроном 1 человека и участком простых повторов (GenBank: AF388526.1). В положении 69..100 расположены tg-повторы, от 101 до 136 нуклеотида содержатся tctg-повторы и ответственные за манифестацию МД2 cctg-повторы находятся в участке от 137 до 576 нуклеотида

Установлено, что участки ДНК с такими простыми GC-богатыми повторами имеют структурную организацию, препятствующую нормальному протеканию процессов репликации, репарации и рекомбинации. Проведенный анализ методом электронной микроскопии показал наличие изгибов и петель, локализованных в местах, содержащих множественные повторы [Pearson et al., 1997]. В другой работе детально исследовано формирование стабильных петель и шпилек в участках с повторами тринуклеотидов, связанных с различными наследственными заболеваниями, в том числе и с миотонической дистрофией [Mitas, 1997]. Недавно показано, что генетическая нестабильность CCTG-повторов связана с образованием метастабильных шпилек и колокол-подобных структур [Lam et al., 2011]. Причем ранее было показано, что CCTG/CAGG-повторы более склонны к экспансии, чем CTG/CAG-повторы при воспроизводстве таких рекомбинантных молекул в клетках *E.coli* [Dere, Wells, 2006], что, впрочем, наблюдается и у человека, если сравнить экспансию тех и других повторов в соответствующих генах. Считается, что основным механизмом увеличения числа повторов в ДНК служит так называемое проскальзывание цепей при репликации *in vivo* [Samadashwilly et al., 1997; Mirkin, 2007]. Пожалуй, стоит упомянуть работу, в которой авторами в модельном эксперименте с синтетическими матрицами с более чем 2000 копий CTG повторов с помощью высоко процессивной ДНК полимеразы фага phi 29 удалось нарабатывать значительные количества амплифицированной ДНК [Osborne, Thornton, 2008]. Здесь видимо главную роль играет то, что

данная полимераза обладает сильной цепь-смещающей активностью. При этом в качестве диагностической процедуры данный подход служить не может ввиду огромной гетерогенности получаемых продуктов в такой изотермической реакции амплификации по типу катящегося кольца и невозможности их достоверного анализа.

При диагностике других заболеваний, связанных с множественной экспансией простых повторов исследователи не сталкиваются с проблемами, характерными для выявления CTG- или CCTG-повторов при миотонической дистрофии, ввиду того, что длины участков с повторами, например при болезни Хантингтона, не так велики [Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993], и они легко амплифицируются при обычной ПЦР, не требуя введения дополнительных и трудоемких стадий в процесс анализа.

Как уже отмечалось выше тяжесть заболевания, вызванная нарушениями в обоих генах зависит от числа таких повторов и поэтому для диагностики заболевания и, в особенности, для предсказания времени начала проявления симптомов, а также степени их тяжести необходимо достаточно точно знать количество CTG- или CCTG-повторов, однако это представляет собой серьезную проблему ввиду того, что в участках с такими повторами могут возникать различные вторичные структуры, в том числе изображенные на рис.3, и при обычной ПЦР ДНК-полимераза зачастую оказывается неспособна провести построение новой цепи ДНК большой протяженности.

экспансией простых повторов их количества у одного индивида могут сильно отличаться, что хорошо видно на радиоавтографах гелей после блот-гибридизации по Саузерну, где вместо отдельных полос наблюдается целый шлейф гибридационных сигналов, которые фактически отличаются друг от друга по размеру на длину самих триплетных или тетраплетных повторов. Желая детектировать варианты анализируемых генов только с мажорными количествами повторов прибегли к ПЦР, где стартовое количество амплифицируемого материала было сильно занижено, вплоть до единичных копий генома [Monckton et al., 1995]. Этим авторам удалось детектировать мажорные варианты размером в несколько сотен повторов путем последующего выявления фрагментов в геле с помощью блот-гибридизации. Еще в целом ряде работ отмечается улучшенная детекция с помощью ПЦР фрагментов ДНК большей длины (с увеличенными количествами повторов) как для МД1 так и для МД2, если стартовые количества ДНК были сильно снижены [Wong et al., 1995; Gennarelli et al., 1998; Bonifazi et al., 2004; Vachinski et al., 2009]. Определенного увеличения чувствительности ДНК-диагностики миотонической дистрофии с помощью ПЦР удалось добиться при использовании флуоресцентно-меченных праймеров [Sermon et al., 1998; Skrzypczak-Zielinska et al., 2009]. Разработан оригинальный метод, в ходе которого количество повторов СТГ и СGG при обнаружении миотонической дистрофии первого типа и синдрома ломкой хромосомы соответственно детектируется не с помощью разделения ампликонов гель-электрофорезом, а посредством циклической вольтамперометрии, с использованием эффекта электрохимического окисления входящего в состав данных повторов гуанина $Ru(bpy)_3^{3+}$ ($bpy = 2,2'$ -дипиридил), при этом обнаруживается прямая корреляция с их числом, причем продукты ПЦР иммобилизованы на поверхности индий-оловянных электродов [Yang, Thorp, 2001].

Не определение точного числа копий повторов, а наличие генетических условий возникновения миотонической дистрофии ставили перед собой авторы, предложившие вариант трехпраймерной ПЦР с праймерами обозначенными как P1, P3¹ и P4, где

¹ Под праймером P2 в цитируемой работе подразумевался праймер, отжигающийся на участке гена DMPK, фланкирующем СТГ-повторы с противоположной стороны от места отжига праймера P1.

специфичность амплификации нужного участка генома достигается использованием одного из праймеров (P1), отжигающемся на фланкирующей повторы последовательности гена DMPK, второй быстро истощающийся праймер (P3 - берущийся к остальным в соотношении 1:10) основной своей частью комплементарный анализируемым триплетам, а на комплементарной последовательности второй части данного праймера через цикл будет отжигаться праймер P4 [Warner et al., 1996]. Таким образом, в результате такой амплификации, получивший название триплетной ПЦР (т-ПЦР) формируется набор ампликонов разной протяженности, неперекрывающих полностью весь участок повторов, а только позволяющий экспериментатору оценить, что их довольно много и следовательно есть основания для заключения о наличии миотонической дистрофии на генетическом уровне. В дальнейшем рядом авторов произведены некоторые улучшения данного метода как для обнаружения экспансии СТГ-повторов [Falk et al., 2006; Kakourou et al., 2010], так и для ССТГ-повторов [Catalli et al., 2010; Radvansky et al., 2011] и в последнем случае метод получил название тетраплетной ПЦР. Недавно для обнаружения на генетическом уровне одновременно МД1 или МД2 предложено проводить т-ПЦР (триплетную и тетраплетную) как мультиплексную [Radvansky et al., 2011a]. Помимо экспансии повторов у больных обеими типами миотонической дистрофией подобный подход с т-ПЦР использован и для детекции увеличивающегося числа GAA-повторов у больных атаксией Фридриха [Ciotti et al., 2004].

С учетом невозможности с помощью метода т-ПЦР определить истинное число копий простых повторов у больных миотонической дистрофией стандартной процедурой определения сильно увеличенного числа СТГ повторов до сих пор служит очень длительная и весьма трудоемкая блот-гибридизация по Саузерну, не требующая этапа амплификации с помощью ПЦР [Mahadevan et al., 1992; Harley et al., 1993; Gennarelli et al., 1998; Carson, 2009]. Серьезным недостатком метода, помимо длительности и сложности процедуры, является требуемое довольно большое количество анализируемой ДНК, подвергаемой расщеплению подходящими рестрикционными эндонуклеазами – обычно расщепляющими гексануклеотидные участки узнавания. Использование для лучшего разделения фрагментов ДНК, несущих в своем составе ССТГ-повторы, при диагностике МД2 пульсирующего гель-электрофореза дало заметный эффект [Jakubiczka et al., 2004]. Определенного улучшения диагностической процедуры в виде

уменьшения длины разделяемых фрагментов ДНК удалось достичь благодаря использованию для расщепления ферментов, узнающих встречающиеся гораздо чаще в ДНК тетра-нуклеотидные участки узнавания, при обнаружении ДМ1 [Erginel-Unaltuna, Akbas, 2004] и ДМ1 и ДМ2 [Nakamori et al., 2009]. В последней работе авторы, в том числе, прибегли к амплификации по типу катящегося кольца участка с CTG-повторами для наработки нужного количества продукта для его расщепления подходящей рестрикционной эндонуклеазой для последующей блот-гибридизации по Саузерну.

Заслуживает некоторого внимания и другой метод выявления количества простых повторов, названный Repeat Expansion Detection - RED [Schalling et al., 1993; Jarjanazi, Ozcelik, 2002], заключающийся в многократно повторяющейся (до 400 – 600 циклов) процедуре лигирования термостабильной ДНК лигазой олигонуклеотидов, представляющих собой обычно 24 звена (8 повторов по 3 нуклеотида), даже с учетом предложенных авторами различных его усовершенствований, также имеет следующие недостатки: низкое количество продукта реакции, необходимость использования в реакции большого количества геномной ДНК, при том что зачастую образцы тканей, берущихся для анализа бывают очень малы по объему и содержат крайне мало генетического материала, особенно при пренатальной диагностике.

Несмотря на существование разнообразных методов и их модификаций в современных диагностических исследованиях по-прежнему используется трудоемкий и длительный метод блот-гибридизацией по Саузерну [Kim et al., 2008; Carson, 2009; Radvansky et al., 2010], в связи с чем следует признать, что в настоящее время нет хорошего и удобного способа уверенной и быстрой оценки числа копий CTG- и CCTG-повторов, которые крайне необходимы для современной ДНК-диагностики нейрогенеративных заболеваний.

Литература

1. Ashizawa T., Sarkar P.S. Myotonic dystrophy types 1 and 2 // *Handb. Clin. Neurol.* 2011.V.101. P.193-237.
2. Bachinski L.L., Czernuszewicz T., Ramagli L.S., Suominen T., Shriver M.D., Udd B., Siciliano M.J., Krahe R. Premutation allele pool in myotonic dystrophy type 2 // *Neurology.* 2009. V.72. P.490-497.
3. Bonifazi E., Vallo L., Giardina E., Botta A., Novelli G. A long PCR-based molecular protocol for detecting normal and expanded ZNF9 alleles in myotonic dystrophy type 2 // *Diagn. Mol. Pathol.* 2004. V.13. P.164-166.
4. Brook J.D., McCurrach M.E., Harley H.G., Buckler A.J., Church D., Aburatani H., Hunter K., Stanton V.P., Thirion J.P., Hudson T. et al. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member // *Cell.* 1992. V. 68. P. 799-808.
5. Brugnoli R., Morandi L., Brambati B., Briscioli V., Cornelio F., and Mantegazza R. A new non-radioactive method for the screening and prenatal diagnosis of myotonic dystrophy patients. // *J.Neurol.* – 1998. – V. 245. – P.289-293.
6. Carson N.L. Analysis of repetitive regions in myotonic dystrophy type 1 and 2 // *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 2009. Chart.9. Units 9.6
7. Catalli C., Morgante A., Iraci R., Rinaldi F., Botta A., Novelli G. Validation of sensitivity and specificity of tetraplet-primed PCR (TP-PCR) in the molecular diagnosis of myotonic dystrophy type 2 (DM2) // *J. Mol. Diagn.* 2010. V.12. P.601-606.
8. Cheng S., Barcelo J.M., and Korneluk R.G. Characterization of large CTG repeat expansions in myotonic dystrophy alleles using PCR. // *Hum.Mutat.* – 1996. –V. 7. –P. 304-310.
9. Ciotti P., Di Maria E., Bellone E., Ajmar F., Mandich P. Triplet repeat primed PCR (TP PCR) in molecular diagnostic testing for Friedreich ataxia // *J. Mol. Diagn.* 2004. V.6. P.285-289.
10. Dere R., Wells R.D. DM2 CCTG**CAGG* repeats are crossover hotspots that are more prone to expansions than the DM1 CTG**CAG* repeats in *Escherichia coli* // *J. Mol. Biol.* 2006. V.360. P.21-36.
11. Erginel-Unaltuna N., Akbas F. Improved method for molecular diagnosis of myotonic dystrophy type 1 (DM1) // *J. Clin. Lab. Anal.* 2004. V.18. P.50-54.
12. Eriksson M. Real-time RT-PCR for CTG repeat-containing genes. // *Methods Mol.Biol.* – 2004 – V. 277. – P. 77-84.
13. Falk M., Vojtiskova M., Lukas Z., Kroupova I., and Froster U. Simple procedure for automatic detection of unstable alleles in the myotonic dystrophy and Huntington's disease loci. // *Genet.Test.* – 2006. – V. 10. – P. 85-97.
14. Fardaei M., Rogers M.T., Thorpe H.M., Larkin K., Hamshere M.G., Harper P.S., and Brook J.D. Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. // *Hum.Mol.Genet.* – 2002. – V. 11. – P. 805-814.

15. Frey UH, Bachmann HS, Peters J, Siffert W. PCR-amplification of GC-rich regions: 'slowdown PCR' // *Nat Protoc.* 2008;3(8):1312-7.
16. Fu Y-H., Pizzuti A., Fenwick R.G., Jr., King J., Rajnarayan S., Dunne P.W., Dubel J., Nasser G.A., Ashizawa T., de Jong P., Wieringa B., Korneluk R., Perryman M.B., Epstein H.F., Caskey C.T. An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy // *Science.* 1992. V.255. P.1256-1258.
17. Gennarelli M., Pavoni M., Amicucci P., Novelli G., and Dallapiccola B. A single polymerase chain reaction-based protocol for detecting normal and expanded alleles in myotonic dystrophy. // *Diagn.Mol.Pathol.* – 1998. – V. 7. – P. 135-137.
18. Hamzi K., Bellayou H., Slassi I., Nadifi S. A rapid polymerase chain reaction-based test for screening Steinert's disease (DM1) // *Neurol. India.* 2010. V.58. P.99-102.
19. Harley H.G., Rundle S.A., MacMillan J.C., Myring J., Brook J.D., Crow S., Reardon W., Fenton I., Shaw D.J., Harper P.S. Size of the unstable CTG repeat sequence in relation to phenotype and parental transmission in myotonic dystrophy // *Am. J. Hum. Genet.* 1993. V.52. P.1164-1174.
20. Houdayer C., Lemonnier A., Gerard M., Chauve C., Tredano M., de Villemeur T.B., Aymard P., Bonnefont J.P., and Feldmann D. Improved fluorescent PCR-based assay for sizing CGG repeats at the FRAXA locus. // *Clin.Chem.Lab Med.* – 1999. – V. 37. – P. 397-402.
21. Hsiao K.M., Lin H.M., Pan H., Li T.C., Chen S.S., Jou S.B., Chiu Y.L., Wu M.F., Lin C.C., Li S.Y. Application of FTA sample collection and DNA purification system on the determination of CTG trinucleotide repeat size by PCR-based Southern blotting // *J. Clin. Lab. Anal.* 1999. V.13. P.188-193.
22. Hummerich H., Lehrach H. Trinucleotide repeat expansion and human disease. // *Electrophoresis.* – 1995. – V. 16. – P. 1698-1704.
23. Hunter A., Tsilfidis C., Mettler G., Jacob P., Mahadevan M., Surh L., and Korneluk R. The correlation of age of onset with CTG trinucleotide repeat amplification in myotonic dystrophy. // *J.Med.Genet.* – 1992. – V. 29. – P. 774-779.
24. Jakubiczka S., Vielhaber S., Kress W., Kupferling P., Reuner U., Kunath B., Wieacker P. Improvement of the diagnostic procedure in proximal myotonic myopathy/myotonic dystrophy type 2 // *Nerogenet.* 2004. V.5. P.55-59.
25. Kakourou G, Dhanjal S, Mamas T, Serhal P, Delhanty JD, Sengupta SB. Modification of the triplet repeat primed polymerase chain reaction method for detection of the CTG repeat expansion in myotonic dystrophy type 1: application in preimplantation genetic diagnosis // *Fertil. Steril.* 2010. V.94. P.1674-1679.
26. Kaliman P., Llagostera E. Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and its role in the pathogenesis of myotonic dystrophy 1. // *Cell Signal.* – 2008. – V. 20. – P. 1935-1941.
27. Kim S.Y., Kim J.Y., Kim G.P., Sung J.J., Lim K.S., Lee K.W., Chae J.H., Hong Y.H., Seong M.W., and Park S.S. Molecular and clinical characteristics of myotonic dystrophy type 1 in Koreans. // *Korean J.Lab Med.* –2008. – V. 28. – P. 483-492.
28. Lam S.L., Wu F., Yang H., Chi L.M. The origin of genetic instability in CCTG repeats // *Nucl. Acids Res.* 2011. V.39. P.6260-6268.
29. Lee J.E., Cooper T.A. Pathogenic mechanisms of myotonic dystrophy. *Biochem.Soc.Trans.* – 2009. – V. 37. – P. 1281-1286.
30. Liquori C.L., Ricker K., Moseley M.L., Jacobsen J.F., Kress W., Naylor S.L., Day J.W., Ranum L.P. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9 // *Science.* 2001. V.293. P.864-867.
31. Mahadevan M., Tsilfidis C., Sabourin L., Shutler G., Amemiya C., Jansen G., Neville C., Narang M., Barcelo J., O'Hoy K. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. // *Science.* – 1992. – V. 255. – P. 1253-1255.
32. Mankodi A. Myotonic disorders. // *Neurol.India.* – 2008. – V. 56. – P. 298-304.
33. Mirkin S.M. Expandable DNA repeats and human disease. // *Nature.* – 2007. – V. 447. – P. 932-940.
34. Mitas M. Trinucleotide repeats associated with human disease. // *Nucleic Acids Res.* – 1997. – V. 25. – P. 2245-2254.
35. Monckton D.G., Wong L.J., Ashizawa T., Caskey C.T. Somatic mosaicism, germline expansions, germline reversions and intergenerational reductions in myotonic dystrophy males: small pool PCR analyses // *Hum. Mol. Genet.* 1995. V.4. P.1-8.
36. Nakamori M., Sobczak K., Moxley R.T. III, Thornton C.A. Scaled-down genetic analysis of myotonic dystrophy type 1 and 2 // *Neuromusc. Disord.* 2009. V.19. P.759-762.
37. Osborne R.J., Thornton C.A. Cell-free cloning of highly expanded CTG repeats by amplification

- of dimerized expanded repeats. // *Nucleic Acids Res.* – 2008. – V. 36. – e24.
38. Pearson C.E., Ewel A., Acharya S., Fishel R.A., Sinden R.R. Human MSH2 binds to trinucleotide repeat DNA structures associated with neurodegenerative diseases // *Hum. Mol. Genet.* 1997. V.6. P.1117-1123.
 39. Pearson C.E., Wang Y.H., Griffith J.D., and Sinden R.R. Structural analysis of slipped-strand DNA (S-DNA) formed in (CTG)_n. (CAG)_n repeats from the myotonic dystrophy locus. // *Nucleic Acids Res.* – 1998. – V. 26. – P. 816-823.
 40. Radvansky J., Ficek A., Kadasi L. Upgrading molecular diagnostics of myotonic dystrophies: Multiplexing for simultaneous characterization of the DMPK and ZNF9 repeat motifs // *Mol. Cell. Probes.* 2011. V.25. P.182-185.
 41. Radvansky J., Ficek A., Kadasi L. Repeat-primed polymerase chain reaction in myotonic dystrophy type 2 testing // *Genet. Test. Mol. Biomark.* 2011. V.15. P.133-136.
 42. Radvansky J., Kadasi L. The expanding world of myotonic dystrophies: How can they be detected? // *Genet. Test. Mol. Biomark.* 2010. V.14. P.733-741.
 43. Salvatori S., Fanin M., Trevisan C.P., Furlan S., Ranum L.P., Rasmussen P.F., Benzow K.A., Koob M.D., Day J.W. Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus // *Nat. Genet.* 1998. V.19. P.196-198.
 44. Reddy S., Nagy J.I., and Angelini C. Decreased expression of DMPK: correlation with CTG repeat expansion and fibre type composition in myotonic dystrophy type 1. // *Neurol.Sci.* – 2005. – V. 26. – P. 235-242.
 45. Samadashwily G.M., Raca G., Mirkin S.M. Trinucleotide repeats affect DNA replication in vivo // *Nat. Genet.* 1997. V.17. P.298-304.
 46. Savic D., Rakocvic-Stojanovic V., Keckarevic D., Culjkovic B., Stojkovic O., Mladenovic J., Todorovic S., Apostolski S., and Romac S. 250 CTG repeats in DMPK is a threshold for correlation of expansion size and age at onset of juvenile-adult DM1. // *Hum.Mutat.* – 2002. – V. 19. – P. 131-139.
 47. Schalling M., Hudson T.J., Buetow K.H., and Housman D.E. Direct detection of novel expanded trinucleotide repeats in the human genome. // *Nat.Genet.* – 1993. – V. 4. – P. 135-139.
 48. Sermon K., De Vos A., Van de Velde H., Seneca S., Lissens W., Joris H., Vandervorst M., Van Steirteghem A., Liebaers I. Fluorescent PCR and automated fragment analysis for the clinical application of preimplantation genetic diagnosis of myotonic dystrophy (Steinert's disease) // *Mol. Hum. Reprod.* 1998. V.4. P.791-796.
 49. Shaw D.J., McCurrach M., Rundle S.A., Harley H.G., Crow S.R., Sohn R., Thirion J.P., Hamshere M.G., Buckler A.J., Harper P.S., et al. Genomic organization and transcriptional units at the myotonic dystrophy locus // *Genomics.* 1993. V.18. P.673-679.
 50. Skrzypczak-Zielinska M., Sulek-Piatkowska A., Mierzejewski M., and Froster U.G. New analysis method of myotonic dystrophy 1 based on quantitative fluorescent polymerase chain reaction. // *Genet.Test.Mol.Biomarkers.* – 2009. – V. 13. – P. 651-655.
 51. Spits C., Seneca S., Hilven P., Liebaers I., Sermon K. Methylation of the CpG sites in the myotonic dystrophy locus does not correlate with CTG expansion size or with the congenital form of disease // *J. Med. Genet.* 2010. V.47. P.700-703.
 52. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. // *Cell.* – 1993. – V. 72. – P. 971-983.
 53. Ueda H., Ohno S., and Kobayashi T. Myotonic dystrophy and myotonic dystrophy protein kinase. // *Prog.Histochem.Cytochem.* –2000. – V. 35. – P. 187-251.
 54. Warner J.P., Barron L.H., Goudie D., Kelly K., Dow D., Fitzpatrick D.R., Brock D.J. A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR // *J. Med. Genet.* 1996. V.33. P.1022-1026.
 55. Wong L.J., Ashizawa T., Monckton D.G., Caskey C.T., Richards C.S. Somatic heterogeneity of the CTG repeat in myotonic dystrophy is age and size dependent // *Am. J. Hum. Genet.* 1995. V.56. P.114-122.

METHODOLOGY FOR DETECTION OF SIMPLE REPEATS IN MYOTONIC DYSTROPHY PATIENTS

Chemeris D.A., Murzabaev M.R.

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre of the Russian Academy of Sciences,
Russia, Republic of Bashkortostan, Ufa, chemeris@gmail.com

Resume

There are two types of myotonic dystrophy. It is caused by malfunction of DMPK or ZNF9 genes, in with an expansion of CG-rich repeats occur. In a 3'-site of DMPK gene multiple CTG/CAG-repeats, and in a first intron of ZNF9 gene CCTG/CAGG-repeats are observed. Because of strong secondary structures at these sites it is hard to determine the number of repeats, laborious and long Southern blotting is used. Faster and cheaper PCR-based methods are being proposed to determine this disease on genetic level or the risk of its development with age.

Keywords: Myotonic dystrophy, hereditary diseases, expansion of simple repeats, CTG/CAG, CCTG/CAGG, PCR