

Новый подход к диагностике миодистрофии Ландузи–Дежерина, основанный на полимеразной цепной реакции

Зернов Н.В., Гуськова А.А., Скоблов М.Ю.

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д.1

Актуальность. Миодистрофия Ландузи–Дежерина (МЛД) является одной из наиболее часто встречающихся мышечных дистрофий. В 95% случаев заболевание связано с частичной делецией массива повторов D4Z4 на одном из аллелей 4-й хромосомы. Существующие диагностические методики гибридизации по Саузерну и молекулярного комбинга являются ресурсо- и времязатратными. В настоящее время в Российской Федерации молекулярно-генетическая диагностика МЛД не проводится.

Цель. Поиск новых подходов к диагностике МЛД для использования в молекулярно-генетических лабораториях.

Методы. ДНК выделялась в агарозных блоках и подвергалась обработке эндонуклеазой *EcoRI*. Полученные фрагменты ДНК разделялись методом пульс-электрофореза в агарозном геле, после этого агарозный гель фрагментировался согласно маркеру молекулярного веса и использовался в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции (ПЦР). Принадлежность полученных ПЦР-продуктов к последовательностям повторов D4Z4 4-й хромосомы подтверждалась секвенированием по Сэнгеру.

Результаты. Протокол пульс-электрофореза оптимизирован таким образом, что после всех этапов ДНК в агарозном геле пригодна для использования в качестве матрицы для ПЦР. Разработана ПЦР-система специфичной амплификации контрольных ДНК-матриц 4-й хромосомы и подтверждена секвенированием принадлежность получаемых ПЦР-продуктов к последовательности повторов D4Z4 4-й хромосомы.

Выводы. Показана возможность использования ДНК в агарозном геле после пульс-электрофореза в качестве матрицы для детекции повторов D4Z4 методом ПЦР. Представленная ПЦР-система специфично амплифицирует последовательности D4Z4 4-й хромосомы. Используя данную ПЦР-систему и геномную ДНК пациента с известной длиной массива повторов D4Z4 проведена успешная диагностика МЛД. Таким образом разработан новый подход к диагностике МЛД для использования в молекулярно-генетических лабораториях.

Ключевые слова: миодистрофия Ландузи–Дежерина, повторы D4Z4, ПЦР, диагностика.

Для цитирования: Зернов Н.В., Гуськова А.А., Скоблов М.Ю. Новый подход к диагностике миодистрофии Ландузи–Дежерина, основанный на полимеразной цепной реакции. *Медицинская генетика* 2019; 18(7): 3–9.

DOI: 10.25557/2073-7998.2019.07.3-9

Автор для корреспонденции: Зернов Николай Владимирович, e-mail: nzernov01@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования России на выполнение НИР.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила: 16.07.2019

New approach for diagnostic of Facioscapulohumeral muscular dystrophy based on PCR

Zernov N.V., Guskova A.A., Skoblov M.Yu.

Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Centre for Medical Genetics»,
Moskvorechie st., 1, 115522, Moscow, Russia.

Relevance. Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) is one of the most common muscular dystrophies. In 95% of cases, the disease is associated with partial deletion of the array of the D4Z4 repeats on one of the alleles of the 4th chromosome. The existing diagnostic methods of Southern blotting and molecular combing are quite resource- and time-consuming. At the moment, molecular genetic diagnostic of FSHD is not provided on the territory of the Russian Federation.

Aim: to find new approaches for molecular genetic diagnostic of FSHD acceptable for use in standard molecular genetic laboratories

Materials and methods: DNA isolated in agarose plugs and treated by the *EcoRI* restriction enzyme. DNA fragments then were separated by pulse field gel electrophoresis (PFGE) in agarose gel. After PFGE, the agarose gel was fragmented and used as a matrix for PCR. The identity of the obtained PCR products to the sequence of the D4Z4 repeats of the 4th chromosome was confirmed by sequencing by Sanger.

Results. The PFGE protocol is optimized in such a way that, after all stages, DNA in agarose gel is suitable for use as a matrix for PCR. We achieve a specific amplification of the control DNA matrices of the 4th chromosome and confirm belonging of the PCR products to the sequence of D4Z4 repeats of the 4th chromosome by the Sanger sequencing.

Conclusions. This paper shows the possibility of using DNA in agarose gel after PFGE as a matrix for detection of D4Z4 repeats by PCR. The presented PCR system specifically amplify sequence of the 4th chromosome D4Z4 repeats. Using this PCR system and genomic DNA of a patient with a known length of the D4Z4 repeats array, a successful diagnosis of FSHD was performed. Thus, we propose a new approach for FSHD diagnostic, acceptable for use in standard molecular genetic laboratories.

Key words: Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD), D4Z4 repeats, PCR, diagnostic.

For citation: Zernov N.V., Guskova A.A., Skoblov M.Yu. New approach for diagnostic of Facioscapulohumeral muscular dystrophy based on PCR. *Medical genetics* 2019; 18(7): 3-9. [In Rus].

DOI: 10.25557/2073-7998.2019.07.3-9

Corresponding author. Zernov Nikolay Vladimirovich, e-mail: nzernov01@gmail.com

Funding. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 16.07.2019

Введение

Лице-плече-лопаточная миодистрофия Ландузи-Дежерина (МЛД) — наследственная прогрессирующая миопатия, поражающая все возрастные категории. По своей распространенности МЛД занимает третье место среди всех наследственных мышечных дистрофий, согласно литературным данным в различных популяциях её частота находится в пределах от 1:20000 до 1:7000 человек [1–4]. В принятой в настоящее время молекулярно-генетической модели развития МЛД основная роль отводится эктопичной экспрессии транскрипционного фактора DUX4 в мышечной ткани [5]. Ген *DUX4* кодируется макросателлитными повторами D4Z4 хромосомы 4, причем считается, что зрелые РНК-транскрипты образуются только с дистального повтора D4Z4 [6]. В зависимости от того, что послужило причиной активации экспрессии DUX4 выделяют два типа МЛД с идентичными фенотипическими проявлениями [7]. МЛД 1-го типа (МЛД1, MIM #158900) обусловлена частичной делецией массива повторов D4Z4 на одном из аллелей хромосомы 4 [8, 9]. При данном типе МЛД остаточное количество повторов D4Z4 находится в пределах от 1 до 10; большая часть (>95%) всех случаев МЛД обусловлена именно частичной делецией массива повторов D4Z4 [10]. МЛД1 наследуется аутосомно-доминантно с неполной пенетрантностью и вариабельной экспрессивностью. МЛД 2-го типа (МЛД2) встречается в ~5% и носит дигенный характер, так как заболевание развивается при наличии патогенной мутации в гене-регуляторе статуса метилирования *SMCHD1* [10]. При этом нарушаются статус метилирования и декомпактизация хроматина массива повторов D4Z4, что инициирует начало экспрессии гена *DUX4*. Вторым обязательным условием для развития обоих типов МЛД является наличие сигнала полиаденилирования транскрипта DUX4, так называемый гаплотип А (пермиссивный аллель) [11].

Молекулярно-генетическая диагностика МЛД осложнена в виду следующих обстоятельств: во-первых, для анализа пригодна только высокомолекулярная геномная ДНК, чаще всего это ДНК, выделенная в агарозных блоках из лимфоцитов свежей крови; во-вторых, необходимо дифференцировать высокомолекулярные (97%) аллели массивов D4Z4 4-й и 10-й хромосом; в-третьих, используемые методики диагностики являются довольно узко ориентированными, трудоемкими и дорогостоящими.

Гибридизация по Саузерну [12] и молекулярный комбинг [13] — это стандарты молекулярно-генетической диагностики МЛД, но следует отметить, что это косвенные методы диагностики, так как при их использовании не детектируется экспрессия DUX4 с пермиссивного аллеля — ключевое событие для развития МЛД. Попытки прямого определения экспрессии DUX4 в мышечной ткани для диагностики заболевания не увенчались успехом по следующим причинам: в мышечном биоптате могут отсутствовать ядра, экспрессирующие DUX4; на момент взятия биоптата экспрессия DUX4 может отсутствовать, как это описано для других транскрипционных факторов [14]; количество ядер, экспрессирующих DUX4 (~1/1000), довольно низкое, что может быть причиной ложноотрицательных результатов [15].

Подводя итог, можно заключить, что молекулярно-генетическая диагностика МЛД основана на двух обязательных критериях: определении длин массивов повторов D4Z4 на аллелях хромосомы 4 и дистальных гаплотипов данных аллелей. Несмотря на то, что гибридизация по Саузерну и молекулярный комбинг предоставляют всю необходимую информацию для постановки диагноза МЛД, данные методики сложны в реализации в условиях клинической молекулярно-генетической лаборатории. Учитывая то, что МЛД1 встречается составляет >95% всех случаев МЛД, а также высокую потребность в приемлемом методе диагно-

стики данной патологии, в этой работе мы представили новый подход к диагностике МЛД1 и показали возможность его применения для молекулярно-генетической диагностики.

Материалы и методы

Образцы ДНК

Геномная ДНК получена от пациента с клиническим диагнозом МЛД. От пациента получено информированное согласие на использование его биологического материала в исследовании. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ». Методом гибридизации по Саузерну у обследованного пациента было определено 7 повторов D4Z4 на пермиссивном аллеле. Космида C85 и фагида λ 260201 [16] любезно предоставлены доктором Леммерсом (LUMC, Нидерланды). Секвенированием по Сэнгеру было подтверждено, что данные образцы содержат последовательности повторов D4Z4 хромосом 10q26 и 4q35 соответственно.

Для проведения пульс-электрофореза геномная ДНК из крови выделялась в агарозных блоках по ранее описанной методике [12]. Выделенная геномная ДНК в агарозных блоках обрабатывалась эндонуклеазой рестрикции *EcoRI* (Thermo Scientific, Waltham, U.S.A.) из расчета 30 единиц фермента на 3 мкг геномной ДНК. Для отработки условий полимеразной цепной реакции (ПЦР) геномная ДНК выделялась стандартной фенол-хлороформной экстракцией. Образцы ДНК C85 и λ 260201 обрабатывались ферментом *EcoRI* (Thermo Scientific, Waltham, U.S.A.) из расчета 1 единица фермента на 1 мкг ДНК.

Анализ последовательностей повтора D4Z4

Референсные нуклеотидные последовательности AF117653.3 (относится к хромосоме 4q35) и AY028079.1 (относится к хромосоме 10q26) были взяты из базы данных GeneBank. Выравнивание данных последовательностей друг против друга производилось с использованием программ Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) и Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). По данным выравнивания выбирались негомлогичные участки для подбора уникальных праймеров. Дизайн праймеров осуществлялся с помощью программы Oligo 7.

ПЦР

ПЦР проводилась в приборе «DNA Engine Tetrad 2» (Bio-Rad Laboratories, Veenendaal, The Netherlands). Использовались 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); бетаин безводный (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan), раствор MgCl₂ (Диалат ЛТД, Москва, Россия); дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (Диалат ЛТД, Москва, Россия). Праймеры для специфичной амплификации последовательностей D4Z4 хромосомы 4: Rep1F 5'-TCCCACCCTCAGGCTCCTC-3', Rep1R 5'-GCCGCGCGGAGGCGGAG-3'. Конечные концентрации реагентов: ПЦР-буфер 1x; MgCl₂ 2,5mM; дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) по 0,2 mM каждого; бетаин 1,2 M; форвардный праймер 0,4 mM; реверсный праймер 0,4 mM; ДНК-полимераза Smar^{NG}Taq 1,25 единиц на реакцию; матрица 1–10 мкл фрагмента геля после пульс-фореза. Температурный профиль: горячий старт при 95°C – 3 мин.; далее 35 циклов: 95°C – 30 сек., 64°C – 8 сек., 72°C – 4 сек.

ПЦР-продукты были отсекуены на приборе ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.). Полученные данные анализировались с использованием программы FinchTV v.1.5.

Пульс-электрофорез в агарозном геле

Пульс-электрофорез производился с использованием следующего оборудования: электрофорезная камера и рексогональный электрод «Gene Navigator» (Pharmacia Biotech, Sweden), источник питания «2301 MacroDrive 1 Power Supply» (LKB Bromma, Stockholm, Sweden). Пульсация задавалась с блока управления «2015 Pulsaphor Plus Control Unit» (LKB Bromma, Stockholm, Sweden). Температура в электрофорезной камере поддерживалась с использованием «2219-001 Multitemp II Thermostatic Circulator» (LKB Bromma, Stockholm, Sweden). При электрофорезе использовались следующие маркеры молекулярного веса: «Lambda Mix Marker, 19» (Fermentas, Warsaw, Poland), «ДНК-маркер 1 Kb» (СибЭнзим, Новосибирск, Россия). Состав электрофорезного буфера: трис 49,5 mM; борная кислота 49,5 mM; дитиотрейтол 10 mM. Использована агароза «Agarose, universal, peqGOLD» (VWR Chemicals, Vienna, Austria), концентрация агарозы в геле – 0,8%. Условия электрофореза: напряжение 450V; интервал пульсации 0,5 сек; продолжительность электрофореза 3,5–4 часа, температура электрофорезного буфера +4°C. Окраска агарозного геля производилась в электрофорезном буфере с добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Отмывка агарозного геля производилась в бидистиллированной воде 3 раза по 20 мин.

Фотографирование агарозных гелей и обработка изображений производилась прибором «ChemIDoc XRS+» (Bio-Rad Laboratories, Veenendaal, The Netherlands). Агарозный гель фрагментировался вручную в

ультрафиолетовом свете согласно длинам маркера молекулярного веса. Схема фрагментирования геля документировалась на фото с использованием программы Image Lab v4.1 (Bio-Rad Laboratories, Veenendaal, The Netherlands).

Результаты

Разработка системы ПЦР для специфической амплификации повторов D4Z4 с хромосомы 4q35

Повтор D4Z4 (3,295 т.п.н.) в последовательности AF117653.3 (хромосома 4q35), был выравнен против референсной сборки генома Homo sapiens GRCh38.p12 [GCF_000001405.38] с использованием алгоритма Blast. В результате максимальные длина перекрытия (100%) и степень гомологии (98,88%) наблюдались только для последовательности повторов D4Z4 хромосомы 10. Для подбора праймеров выбран перекрывающийся участок, уникальный для последовательностей D4Z4 хромосом 4 и 10. Места несовпадений последовательностей в данном участке были исполь-

зованы для подбора праймеров, уникальных для последовательности хромосомы 4.

Для оценки специфичности тестируемых пар праймеров использовались матрицы геномной ДНК, космиды C85 и фагмиды λ260201. Критериями отбора служили наличие ПЦР-продуктов при амплификации матрицы λ260201 (последовательность хромосомы 4) и геномной ДНК при отсутствии ПЦР-продуктов с матрицы C85 (последовательность хромосомы 10). В результате, выбрана пара праймеров Rep1F и Rep1R. (рис. 1 А). Принадлежность ПЦР-продукта последовательности повторов хромосомы 4 при амплификации матрицы геномной ДНК подтверждена секвенированием по Сэнгеру (рис.1 Б).

Специфичность ПЦР-системы была достигнута за счёт того, что реверсный праймер Rep1R располагался в области двух шестинуклеотидных повторов на последовательности хромосомы 4, тогда как последовательность хромосомы 10 имеет только один такой шестинуклеотидный повтор (рис.1 Б). При отжиге реверсного праймера Rep1R на последовательность хромосомы 10 три нуклеотида с 3' конца праймера ока-

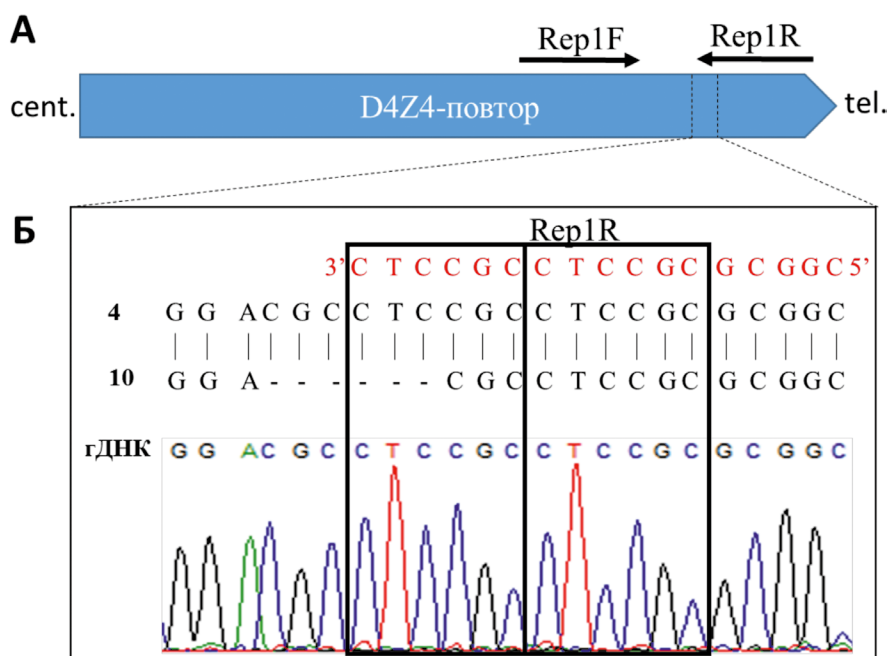


Рис. 1. Схема расположения пары праймеров Rep1F, Rep1R и хроматограмма сиквенса ПЦР-продукта, полученного с использованием данной пары праймеров. А – Сайты посадки пары праймеров Rep1F и Rep1R расположены ближе к теломерному концу (tel) каждого из повторов D4Z4. Пунктирными линиями выделен участок посадки реверсного праймера Rep1R. Б – Фрагмент выравнивания последовательности D4Z4 хромосомы 4 (AF117653.3) против референсной последовательности хромосомы 10 (GRCh38.p12). 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 хромосомы 4 с матрицы геномной ДНК (гДНК). Прямоугольниками выделены шестинуклеотидные повторы.

зываются неспаренными, блокируя возможность амплификации последовательности хромосомы 10.

Для определения гаплотипа интересующего аллеля нами использовалась ранее описанная трехпраймерная ПЦР-система [17]. Один форвардный и два реверсных праймера (внешний неспецифичный и внутренний специфичный) используются для амплификации дистального к последнему повтору D4Z4 региона. При наличии в данном регионе сигнала полиаденилирования белка DUX4 амплифицируются два ПЦР-продукта, в то время как отсутствие сигнала полиаденилирования приводит к образованию только одного ПЦР-продукта (характерно для хромосомы 10), либо отсутствию ПЦР-продукта, если образец не содержит последовательности гаплотипа А.

Оптимизация условий пульс-электрофореза

Для определения количества повторов D4Z4 на каждом из аллелей хромосомы 4 перед проведением пульс-электрофореза проводилась предварительная рестрикция образцов ДНК с использованием эндонуклеазы рестрикции *EcoRI*. Сайты рестрикции данного фермента фланкируют массив повторов D4Z4. По-

сле рестрикции образцов λ 260201 и С85 проводилось их разделение в 0,8% агарозном геле методом пульс-электрофореза. Дорожки агарозного геля фрагментировались согласно маркеру молекулярного веса (рис. 2 А), полученные фрагменты использовались в качестве ДНК-матриц для ПЦР с парой праймеров Rep1F и Rep1R. В ходе амплификации наблюдалось ингибирующее влияние таких матриц на прохождение ПЦР, выражающееся в уменьшении количества ПЦР-продукта. Для уменьшения данного эффекта были оптимизированы условия пульс-электрофореза (продолжительность электрофореза, состав и температура электрофорезного буфера, напряжённость электрического поля), окраски и отмывки агарозного геля. Таким образом, были подобраны оптимальные условия при которых наблюдалось уверенная амплификация таргетного ПЦР-продукта.

Диагностика МЛД

Для проверки возможности применения разработанного подхода для ДНК-диагностики МЛД, был проведён анализ образца геномной ДНК пациента с клиническим диагнозом МЛД. Ранее методом

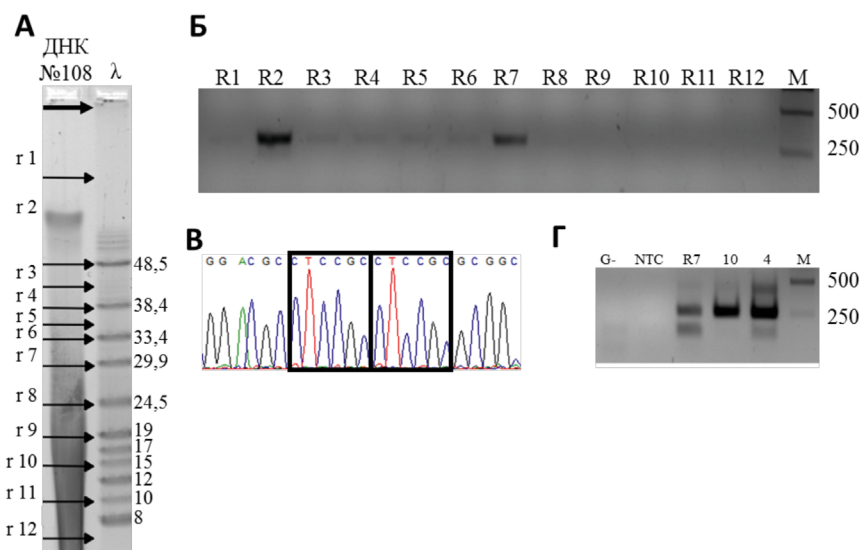


Рис. 2. Схема фрагментации агарозного геля после пульс-электрофореза и результаты ПЦР с полученными фрагментами геля в качестве матрицы. А – электрофореграмма разделения ДНК №108 пациента с МЛД после обработки эндонуклеазой рестрикции *EcoRI*. Горизонтальными черными стрелками указаны границы фрагментов геля. Слева указаны номера фрагментов по порядку, справа – длины фрагментов маркера молекулярного веса (т.п.н.). Б – электрофореграмма продуктов ПЦР. На дорожки R1 – R12 нанесены ПЦР-продукты, полученные с использованием фрагментов с r 1 по r 12 агарозного геля после пульс-электрофореза в качестве матрицы для ПЦР. Дорожки R2 и R7 демонстрируют максимальное количество ПЦР-продуктов (283 п.н.), следовательно, пациент имеет два аллеля 4-й хромосомы: непатогенный >48 т.п.н. (> 11 D4Z4 повторов) и пермиссивный 29,9-33,4 т.п.н. (7-8 повторов). В – хроматограмма сиквенса ПЦР-продукта R7, прямоугольниками выделены два шестинуклеотидных повтора, специфичных для D4Z4 повторов хромосомы 4. Г – использование трехпраймерной ПЦР-системы для гаплотипирования: G- контроль с гелем после всех этапов пульс-электрофореза в качестве матрицы для ПЦР, использован для проверки контаминации агарозного геля; NTC – отрицательный контроль; R7, 4, 10 – ПЦР с матрицами r 7, λ 260201 и С85, соответственно. Два бэнды на дорожках R7 и 4 показывают принадлежность пермиссивного аллеля к гаплотипу А.

гибридизации по Саузерну у данного пациента было определено 7 повторов D4Z4 на пермиссивном аллеле.

После пульс-электрофореза схема фрагментации геля документировалась (рис. 2А). Полученные фрагменты были использованы в качестве матрицы для постановки ПЦР (рис. 2 Б). После соотнесения схемы фрагментации геля с результатами ПЦР были сделаны выводы о том, что в данном образце один из аллелей массива повторов D4Z4 (29,9-33,4 т.п.н.) содержит 7-8 повторов (наличие амплификации в образце R7). Второй аллель (наличие амплификации в образце R2) содержал более 11 повторов (>48 т.п.н.) и являлся аллелем дикого типа. Полученные результаты совпадают с результатами гибридизации по Саузерну.

Кроме того, полученный ПЦР-продукт был отсекален для контроля специфичности амплификации. Хроматограмма подтверждает принадлежность ПЦР-продукта последовательности повторов D4Z4 хромосомы 4 (рис. 2 В). Также установлено что исследуемый аллель имеет гаплотип А (рис. 2 Г).

Обсуждение

В настоящее время диагностика МЛД осложнена множеством факторов, основными из которых являются необходимость использования большого количества высокомолекулярной геномной ДНК, трудность дифференцировки последовательностей D4Z4 между аллелями 4-й и 10-й хромосом, высокая стоимость оборудования и реагентов для существующих методик. Кроме этого, используемые стандарты диагностики МЛД (гибридизация по Саузерну и молекулярный комбинг), являются относительно трудоемкими и времязатратными, а невозможность применения данных методов для диагностики других заболеваний еще больше сужает число лабораторий, использующих данные методики.

Поэтому разработка новых методик ДНК-диагностики МЛД для использования в молекулярно-генетических диагностических лабораториях актуальна. Представленный в данной статье подход к диагностике МЛД основан на использовании ПЦР со специфичной к повторам D4Z4 хромосомы 4 парой праймеров. Продемонстрировав использование данной пары праймеров и фрагментов агарозного геля после пульс-электрофореза в качестве матриц для ПЦР, мы представили новый подход к детекции числа повторов D4Z4 на аллелях хромосомы 4.

Ранее в литературе была описана ПЦР-система для детекции сигнала полиаденилирования транскрипта DUX4 [17]. Авторы данной статьи также использовали геномную ДНК после разделения методом пульс-электрофореза в качестве матрицы для ПЦР. Нами бы-

ли предприняты попытки оптимизации данной системы, в результате которых удалось добиться корректной работы ПЦР-системы в присутствии агарозного геля (неопубликованные данные).

Использование этой ПЦР-системы в сочетании с описанным нами подходом позволило определять как длину массива повторов D4Z4, так и гаплотип интересующего аллеля.

Данный подход может быть реализован в большинстве молекулярно-генетических лабораторий, обходя сложности, связанные с использованием методик гибридизации по Саузерну и молекулярного комбинга. Кроме того, возможна оптимизация данной ПЦР-системы для количественной ПЦР, что снизит время выполнения и трудоемкость анализа.

Выводы

При выполнении данной работы мы сфокусировались на возможности специфичной амплификации последовательностей повторов D4Z4 хромосомы 4 после пульс-электрофоретического разделения ДНК, обработанной эндонуклеазой *EcoRI*. В ходе биоинформатического анализа выявлены нуклеотидные последовательности, специфичные для хромосомы 4, которые можно использовать для дифференцировки между повторами D4Z4 4-й и 10-й хромосом. Нам удалось добиться специфичной амплификации последовательности повторов D4Z4 хромосомы 4. В представленной ПЦР-системе реверсный праймер ответственен за специфичность, т.к. на своем 3' конце несет последовательность из 3-х нуклеотидов, отсутствующую в последовательностях повторов D4Z4 хромосомы 10. Кроме того, подобранные условия пульс-электрофореза, позволяющие сохранить качество ДНК, пригодное для последующего ее использования в ходе ПЦР, а также сократить продолжительность этого этапа до 3,5 часов в отличие от стандартных 16-18 часов, являются уникальными. Оптимизация условий ПЦР позволила использовать в качестве матрицы непосредственно фрагменты пульс-электрофорезного агарозного геля, избегая стадии выделения ДНК из геля. Секвенирование ПЦР-продуктов подтверждает специфическую амплификацию.

Благодарности

Авторы выражают благодарность доктору Р. Леммерсу (LUMC, Лейден, Нидерланды) за любезно предоставленные генетические конструкции λ260201 и C85, а также за проведение молекулярно-генетического исследования образца ДНК №108 пациента с МЛД методом гибридизации по Саузерну.

Список литературы/References

1. Padberg G.W., Frants R.R., Brouwer O.F. et al. Facioscapulohumeral muscular dystrophy in the Dutch population. *Muscle & nerve Supplement* 1995; 2:S81-84.
2. Flanigan K.M., Coffeen C.M., Sexton L. et al. Genetic characterization of a large, historically significant Utah kindred with facioscapulohumeral dystrophy. *Neuromuscular disorders: NMD* 2001; 11(6-7):525-529.
3. Mostacciolo M.L., Pastorello E., Vazza G. et al. Facioscapulohumeral muscular dystrophy: epidemiological and molecular study in a north-east Italian population sample. *Clinical genetics* 2009; 75(6): 550-555.
4. Norwood F.L., Harling C., Chinnery P.F. et al. Prevalence of genetic muscle disease in Northern England: in-depth analysis of a muscle clinic population. *Brain : a journal of neurology* 2009; 132(Pt 11):3175-3186.
5. Tawil R., van der Maarel S.M., Tapscott S.J. Facioscapulohumeral dystrophy: the path to consensus on pathophysiology. *Skeletal muscle* 2014; 4:12.
6. Dixit M., Ansseau E., Tassin A. et al. DUX4, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy, encodes a transcriptional activator of PITX1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104(46):18157-18162.
7. Zernov N., Skoblov M. Genotype-phenotype correlations in FSHD. *BMC medical genomics* 2019; 12(Suppl 2):43.
8. Wijmenga C., Hewitt J.E., Sandkuijl L.A. et al. Chromosome 4q DNA rearrangements associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nature genetics* 1992; 2(1):26-30.
9. Hewitt J.E., Lyle R., Clark L.N. et al. Analysis of the tandem repeat locus D4Z4 associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Human molecular genetics* 1994; 3(8):1287-1295.
10. Lemmers R.J., O'Shea S., Padberg G.W. et al. Best practice guidelines on genetic diagnostics of Facioscapulohumeral muscular dystrophy: workshop 9th June 2010, LUMC, Leiden, The Netherlands. *Neuromuscular disorders : NMD* 2012; 22(5):463-470.
11. Lemmers R.J., Wohlgemuth M., van der Gaag K.J. et al. Specific sequence variations within the 4q35 region are associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *American journal of human genetics* 2007; 81(5):884-894.
12. Lemmers R.J. Analyzing Copy Number Variation Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Providing a Genetic Diagnosis for FSHD1. *Methods in molecular biology* 2017; 1492:107-125.
13. Vasale J., Boyar F., Jocsion M. et al. Molecular combing compared to Southern blot for measuring D4Z4 contractions in FSHD. *Neuromuscular disorders : NMD* 2015; 25(12):945-951.
14. Newlands S., Levitt L.K., Robinson C.S. et al. Transcription occurs in pulses in muscle fibers. *Genes & development* 1998; 12(17):2748-2758.
15. Snider L., Geng L.N., Lemmers R.J. et al. Facioscapulohumeral dystrophy: incomplete suppression of a retrotransposed gene. *PLoS genetics* 2010; 6(10):e1001181.
16. van Deutekom J.C., Wijmenga C., van Tienhoven E.A. et al. FSHD associated DNA rearrangements are due to deletions of integral copies of a 3.2 kb tandemly repeated unit. *Human molecular genetics* 1993; 2(12):2037-2042.
17. Papanikos F., Skoulatou C., Sakellariou P. et al. A simplified approach for FSHD molecular testing. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2014; 429:96-103.