

Результаты использования новой медицинской технологии «Система детекции в одной пробирке частых мутаций генов *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3* при спиноцеребеллярных атаксиях» в ДНК-диагностике

Миронович О.Л., Галеева Н.М., Забненкова В.В., Щагина О.А., Поляков А.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр»,
Москва, 115478, ул. Москворечье, д. 1, e-mail: polyakov@med-gen.ru

Спиноцеребеллярные атаксии (СЦА) — группа аутосомно-доминантных наследственных болезней, основные клинические проявления которых определяются поражением различных структур мозжечка. Заболевание может проявляться только мозжечковыми нарушениями или их сочетанием с симптомами поражения других структур ЦНС. Современная классификация СЦА основана на этиологическом принципе: форма болезни определяется на основе гена-причины заболевания. На сегодняшний день известно более 30 генов, мутации которых приводят к доминантным атаксиям. Наиболее частым молекулярным дефектом при СЦА является экспансия тринуклеотидных повторов. Для данной группы болезней описана широкая вариабельность клинической симптоматики, в том числе и у больных членов одной родословной, а, с другой стороны, практически все доминантные атаксии имеют большое сходство клинических проявлений. В работе представлены результаты ДНК-диагностики 335 пробандов с направительным диагнозом «*спиноцеребеллярная атаксия*» и членов их семей с использованием новой медицинской технологии «Система детекции в одной пробирке частых мутаций генов *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3* при спиноцеребеллярных атаксиях».

Ключевые слова: спиноцеребеллярная атаксия, *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3*, ДНК-диагностика, экспансия тринуклеотидных повторов

Введение

Наследственные атаксии могут быть определены как группа генетически обусловленных заболеваний двигательной сферы, ведущей клинической характеристикой которых является эпизодическое или постоянное нарушение координации движений, возникающее в результате поражения мозжечка, его связей и/или соответствующих сенсорных систем [1].

Наследственные атаксии относятся к одному из сложнейших разделов клинической неврологии и нейрогенетики и привлекают пристальное внимание неврологов вот уже более полутора столетий. Ориентировочная средняя распространенность всех форм наследственных атаксий в мире составляет 3—10 случаев на 100 000 населения, что позволяет говорить о них как об одной из наиболее широко распространенных групп наследственных болезней нервной системы [1—3].

Клинические фенотипы наследственных атаксий варьируют от «чистых» (изолированных) церебеллярных дисфункций до тяжелых мультисистемных синдромов с вовлечением не только мозжечковых систем, но и экстрапирамидных структур, ствола и коры головного мозга. Патологоанатомическими «мишенями» при различных формах атаксий являются кора мозжечка (в пер-

вую очередь клетки Пуркинье), зубчатое и другие ядра мозжечка, верхние, средние и нижние ножки мозжечка, нижние оливы, ядра черепных нервов моста, среднего и продолговатого мозга, прямой и перекрещенный спиноцеребеллярные тракты, пирамидный путь, спинномозговые ганглии, периферические нервы, подкорковые ганглии, кора полушарий большого мозга. Поэтому наследственные атаксии могут сопровождаться целым рядом неврологических и психиатрических симптомов: расстройствами движений (дистониями, хореей, миоклониями), полинейропатиями, эпилептиками, когнитивными и личностными нарушениями [1, 3, 4].

Спиноцеребеллярные атаксии — это группа аутосомно-доминантных наследственных атаксий. Современная классификация СЦА основана на этиологическом принципе: форма болезни определяется на основе гена — причины заболевания. На сегодняшний день известно более 30 генов, мутации которых приводят к доминантным атаксиям. Распространенность АД СЦА составляет примерно 1,5 : 100000 [1, 3].

Первыми симптомами заболевания бывает незаметно появляющаяся неловкость, неустойчивость при быстрой ходьбе и беге. Через несколько лет у больного постепенно развивается развернутый атаксический синдром, отмечается неловкость и нарушение координации

в руках, интенционный тремор конечностей, адиadoхокинез (неритмичность, замедленность движений), скандирования речь, характерным образом нарушается почерк (макрография, неровность строк). Характерны симптомы вовлечения пирамидного и экстрапирамидного тракта, офтальмоплегия (паралич мышц глаза), атрофия зрительных нервов, пигментная дегенерация сетчатки, нистагм (непроизвольные ритмические судорожные движения глазного яблока), амиотрофии [3].

Несмотря на существенные успехи молекулярной биологии и нейрогенетики, подавляющее большинство наследственных атаксий, являясь прогрессирующими нейродегенеративными заболеваниями, остаются некурабельными [1, 4].

Новые знания о патогенезе наследственных атаксий позволяют у ряда больных проводить достаточно эффективное поддерживающее симптоматическое лечение СЦА, заключающееся в использовании нейропротекторов.

Наиболее частым молекулярным дефектом при СЦА является экспансия тринуклеотидных CAG повторов. Данная мутация относится к классу динамических мутаций, так как число повторов изменяется при делении клеток в митозе и мейозе. Интересно отметить, что сначала происходит увеличение числа повторов, не приводящее к заболеванию, но увеличивающее нестабильность региона — премутация. Для такого числа повторов вероятность дальнейшего увеличения их числа в последующих мейозах до полной мутации весьма высока. Число повторов обратно пропорционально возрасту манифестации, и прямо пропорционально скорости развития и тяжести заболевания. Характерен феномен антиципации — утяжеление клинических проявлений заболевания из поколения в поколение в пределах одной родословной (более раннее начало и быстрое прогрессирование заболевания, проявление более тяжелых симптомов у потомков). Феномен антиципации обусловлен нарастанием длины повтора при передаче мутантного гена от родителя потомкам. Эффект «отцовской передачи» (манифестация более ранних и более тяжелых случаев болезни у потомков больного отца) — обусловлен преимущественным удлинением мутантного повтора в мужском гаметогенезе, тогда как при передаче гена от матери область повтора обычно остается стабильной [1–3, 5].

Изменение числа CAG повторов при митозе приводит к феномену соматического мозаицизма, т.е. присутствию в одной ткани организма клеток с разным числом повторов. Особенно ярко данный мозаицизм выражен в тканях больных с наибольшим числом повторов.

На сегодняшний день наиболее частыми формами наследственных атаксий считаются СЦА1, СЦА2 и СЦА3 типов. По усредненным мировым данным на долю СЦА1 приходится 6% всех доминантных атаксий, СЦА2 — 15%, СЦА3 — 21% [2]. Однако в работах авторов из разных стран показана широкая вариабельность вклада СЦА1, 2 и 3 [6–9].

СЦА1 (OMIM 164400) обычно начинается в возрасте от 30 до 40 лет (возможный разброс — от 4 до 74 лет).

Основные клинические симптомы — атаксия, офтальмоплегия, пирамидные и экстрапирамидные расстройства. Молекулярно-генетической причиной СЦА1 является увеличение числа тринуклеотидных CAG повторов в гене *ATXN1*, локализованном на хромосоме 6p23. В норме повторов меньше 36; при болезни — больше 39. Нормальные аллели гена обычно содержат в составе тринуклеотидного участка вставки от одного до трех САТ-триплетов, отсутствующие в мутантном гене. Их наличие рассматривается как важный фактор стабилизации нормальных аллелей при мейозе.

СЦА2 (OMIM 183090) манифестирует в возрасте от 20 до 40 лет (возможный разброс — от 6 до 67 лет). Основные клинические симптомы — атаксия, замедление саккадических движений глазных яблок, пирамидные и экстрапирамидные расстройства. Молекулярно-генетической причиной СЦА2 является увеличение числа тринуклеотидных CAG повторов в гене *ATXN2* (12q24). В норме регистрируется 14–31 повтор, у больных — 35–64 (от 33 до 34 повторов на сегодняшний день считается мутацией «с поздним дебютом»). Нормальные аллели гена обычно содержат в составе тринуклеотидного участка отдельные вставки САА-триплетов, стабилизирующих повтор.

СЦА3 (болезнь Мачадо—Джозефа, OMIM 109150) начинается после 25–30 лет (возможный разброс — от 5 до 70 лет). Основные клинические симптомы — атаксия (в первую очередь наблюдается абазия, офтальмоплегия, парез взора вверх, фасцикуляции мышц лица и фасцикуляции мышц языка, феномен «выпученных глаз» (широко раскрытые глазные щели с фиксированными глазными яблоками), пирамидные и экстрапирамидные симптомы. Молекулярно-генетической причиной СЦА3 является увеличение числа тринуклеотидных CAG повторов в гене *ATXN3* (14q24.3-q31). Нормальное число повторов — от 12 до 47, при болезни регистрируется 53–86 повторов [1, 3].

Высокая частота наследственных атаксий, высокий генетический риск в отягощенных семьях и наличие мажорных мутаций делает актуальной задачей разработку диагностических систем поиска экспансии CAG-повторов с целью снижения стоимости ДНК-диагностики и временных затрат на её проведение.

Материалы и методы

В период с 01.02.2008 по 01.02.2016 в лабораторию ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» были направлены образцы биологического материала 335 неродственных больных с направительным диагнозом «*спиноцереbellарная атаксия*», а также членов их семей.

ДНК была выделена из цельной крови, забранной в пробирку с антикоагулянтом ЭДТА с помощью набора реактивов для выделения Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) по протоколу производителя.

Для диагностики СЦА в практику ФГБНУ «МГНЦ» была внедрена медицинская технология «Система детекции в одной пробирке частых мутаций генов *ATXN1*,

ATXN2, *ATXN3* при спиноцеребеллярных атаксиях». В основу данной технологии положена мультиплексная реакция с детекцией результатов методом капиллярного электрофореза. Для поиска причин СЦА 1, 2, 3 типа была разработана система на основе мультиплексной полимеразной цепной реакции. Были выбраны три пары праймеров, фланкирующих CAG-повторы в экзоне 8 гена *ATXN1* (СЦА1), экзоне 1 гена *ATXN2* (СЦА2) и экзоне 10 гена *ATXN3* (СЦА3) (табл. 1). Дизайн праймеров осуществлен в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ», синтез — в ЗАО «Евроген», Москва и НПО «Синтол», Москва. Последовательности праймеров, входящих в реакцию, выбирали согласно базе данных Gene Bank. В каждой из пар праймеров один был помечен флуоресцентным красителем: для *ATXN1* — краситель FAM, *ATXN2* — VIC, *ATXN3* — NED, благодаря этому стало возможным проводить детекцию результатов в одном капилляре с использованием разных светофильтров.

Полимеразную цепную реакцию проводили на программируемом термощиклере Терцик (ДНК-технология, Россия) с использованием ДНК-полимеразы Biotaq («БиоМастер»).

ПЦР проводили под минеральным маслом по следующей схеме: к 23 мкл реакционной смеси, содержащей 1х реакционный буфер (67 mM Tris-HCl, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Twin-20), 0,25 мкМ каждого олигопраймера, 250 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 4 mM MgCl₂, 1,5 единицы термофильной ДНК-полимеразы, 40 мкМ бетаина, добавляли 2 мкл ДНК.

Аmplification проводили по следующим параметрам: предварительная денатурация при 95°C — 12 мин; 94°C — 45 с; температура отжига праймера 65°C — 45 с; элонгация цепи 72°C — 2 минуты — 34 цикла, с последующей окончательной достройкой при 72°C в течение 7 мин. Последовательности праймеров и условия амплификации представлены в табл. 1.

Продукты реакции детектировали методом фрагментного анализа на приборе ABI Prism 3130 («Applied Biosystems»).

Полученная методом фрагментного анализа электрофореграмма представляет собой паттерн сигналов, соответствующих фрагментам, входящим в систему. При визуальной оценке детектируются сигналы, соответствующие длинам CAG-повторов на гомологичных хромосомах локусов СЦА1, СЦА2 и СЦА3 (табл. 2).

Точное число повторов в генотипе пробанда рассчитывалось по формулам:

$$n(ATXN1) = \frac{L - 19}{3},$$

$$n(ATXN2) = \frac{L - 56}{3},$$

$$n(ATXN3) = \frac{L - 48}{3},$$

где:

n — число повторов;

L — длина амплифицированного фрагмента.

Таблица 1

Праймеры и условия амплификации, применявшиеся для ПЦР-реакции детекции экспансии CAG-повтора

Последовательность праймеров, 5' → 3'	t отжига
ATXN1 F* FAM-GCCGGGACACAAGGCTGAGC ATXN1 R CCGGAGCCCTGCTGAGGTGC ATXN2 F* VIC-CCCTCACCATGTCGCTCAGGC ATXN2 R GGGCTTGC GGACATTGGCAGC ATXN3 F* NED-CTTCACTTTTCAGTGTTCAGACAGC ATXN3 R TGTCAGCTCTGTCTGATAGGTC	65°C

Таблица 2

Интерпретация результатов

Ген	Детектируемый фрагмент	Статус	Длина, п.н.
<i>ATXN1</i>	(CAG)n n=6-35/(CAG)n n=6-35	норма/норма	37-124/37-124
	(CAG)n n=39-100/(CAG)n n=6-35	мутация/норма	136-319/37-124
	(CAG)n n=36-38/(CAG)n n=6-35	премутация/норма	127-133/37-124
<i>ATXN2</i>	(CAG)n n=5-31/(CAG)n n=5-31	норма/норма	71-149/71-149
	(CAG)n n=33-200/(CAG)n n=5-31	мутация/норма	155-656/71-149
	(CAG)n n=32/(CAG)n n=5-31	премутация/норма	152/71-149
<i>ATXN3</i>	(CAG)n n=12-44/(CAG)n n=12-44	норма/норма	84-180/84-180
	(CAG)n n=53-87/(CAG)n n=12-44	мутация/норма	207-309/84-180
	(CAG)n n=45-52/(CAG)n n=12-44	премутация/норма	183-204/84-180

В результате анализа можно определить точное число повторов в локусах СЦА1, СЦА2 и СЦА3 на обеих хромосомах в образце пробанда. У больных количество повторов коррелирует с тяжестью течения болезни. Точное определение числа повторов особенно важно для детекции пограничных случаев мутация/премутация, так как при мейозе возможно как увеличение так и уменьшение числа повторов, а значит, точность анализа влияет на прогноз при проведении пресимптоматической и пренатальной диагностики в отягощенных семьях.

Результаты и обсуждение

Всем 335 пробандам была проведена ДНК-диагностика с использованием новой медицинской технологии «Система детекции в одной пробирке частых мутаций генов *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3* при спиноцереbellарных атаксиях». На рис. 1 представлены результаты визуализации мультиплексной реакции с использованием капиллярного электрофореза (рис. 1). Благодаря тому, что один из праймеров, комплементарный последовательности каждого из генов *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3* мечен

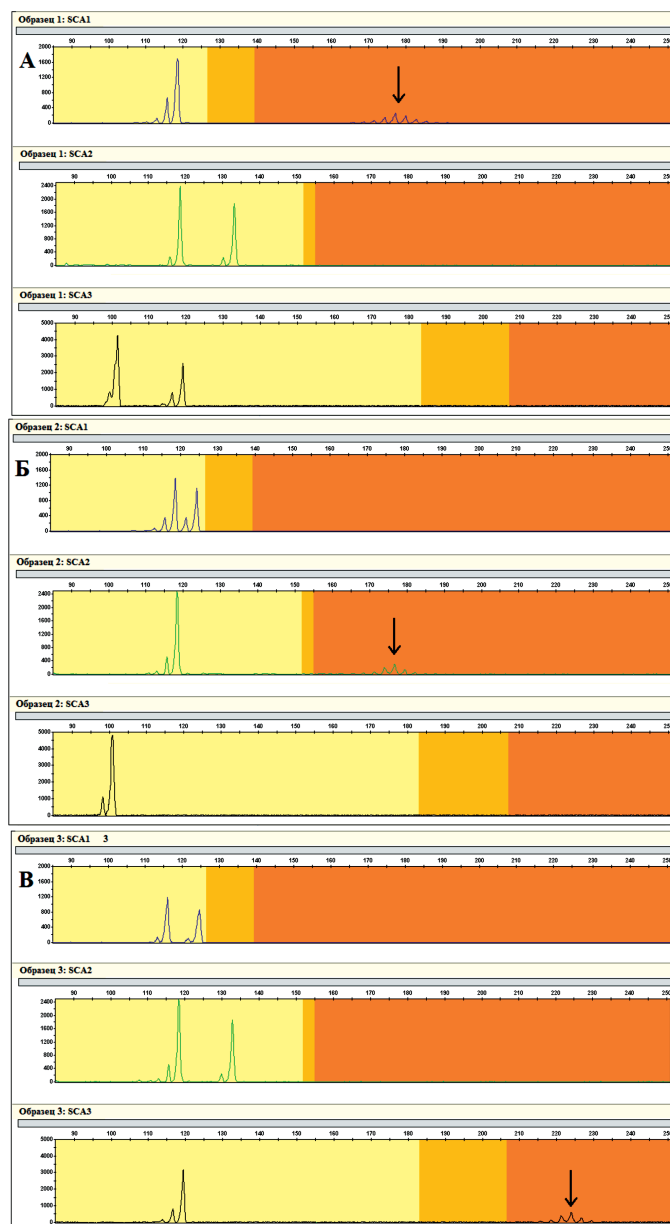


Рис. 1. Визуализация результатов анализа с использованием капиллярного электрофореза.
 А. Образец 1. Зарегистрирована экспансия CAG повтора гена *ATXN1* (аллель с экспансией указан стрелкой).
 Б. Образец 2. Зарегистрирована экспансия CAG повтора гена *ATXN2* (аллель с экспансией указан стрелкой).
 В. Образец 3. Зарегистрирована экспансия CAG повтора гена *ATXN3* (аллель с экспансией указан стрелкой).

Сопоставление встречаемости экспансии различных генов по мировым данным и в когорте российских больных

Тип СЦА	Ген	Данные исследования (%)	Мировые данные (%), по [2]	p (по Фишеру)
СЦА1	<i>ATXN1</i>	64	36	0,00703
СЦА2	<i>ATXN2</i>	27	50	0,00885
СЦА3	<i>ATXN3</i>	9	14	0,1088

своим флуоресцентным красителем: FAM, VIC и NED, возможно проводить детекцию результатов в одном капилляре с использованием разных светофильтров. Основным преимуществом данной технологии, по сравнению со стандартными методами детекции повторов с использованием ПЦР-электрофореза в ПААГ, является возможность точно определить число повторов, что важно для прогнозирования тяжести течения болезни [10]. На рис. 1 видно, что метод позволяет не только подсчитать точное число повторов, но также выявить соматический мозаицизм клеток крови по длине нестабильного экспансионного аллеля.

В результате анализа, экспансия CAG повторов в экзоне 8 гена *ATXN1* была выявлена у 14 неродственных пробандов, в экзоне 1 гена *ATXN2* — у 6, в экзоне 10 гена *ATXN3* — у двух. Таким образом, с использованием новой медицинской технологии удалось установить точный диагноз у 6,5% обратившихся за диагностикой.

Распределение мутаций в этих трех генов оказалась отличным от мировых данных о частотах этих трех форм СЦА. Если исследование ограничивается поиском мутации в генах *ATXN1*, *ATXN2* и *ATXN3*, то, по усредненным мировым данным, на долю экспансии в гене *ATXN1* должно приходиться 36% подтвержденных СЦА, *ATXN2* — 50%, *ATXN3* — 14% [2]. В когорте российских больных с выявленной мутацией, распределение оказалось следующим: *ATXN1* — 64% подтвержденных СЦА, *ATXN2* — 27%, *ATXN3* — 9% (табл. 3).

Как видно из табл. 3, данные по долям CAG-экспансии генов *ATXN1* и *ATXN2* достоверно отличают российскую когорту больных. Среди исследованных форм спи-

ноцеребеллярных атаксий, у российских больных превалирует СЦА1, в то время как в других странах наиболее частой формой является СЦА2. Однако в работах авторов из разных стран показана широкая вариабельность вклада СЦА1, 2 и 3. Например, в Италии, как и в России, самой частой формой является СЦА1 [6], в то время как в Китае 53% случаев приходится на СЦА3 [11].

По данным многих авторов, феномен антиципации, связанный с увеличением числа CAG-повторов, при СЦА наблюдается во время отцовской передачи болезни [5]. Однако нами было зарегистрировано увеличение числа повторов при прохождении через материнский мейоз. На рис. 2 представлена родословная семьи со спиноцеребеллярной атаксией. У пробанда (указан стрелкой) выявлено 73 CAG повтора в экзоне 10 гена *ATXN3*, у дочери больной от первого брака также диагностирована СЦА и число повторов совпадает с материнским. Для совершеннолетних дизиготных близнецов, рожденных во втором браке, проведена пресимптоматическая диагностика СЦА3 и зафиксировано удлинение повтора до 77 CAG мономеров. У детей пробанда с увеличенным числом повторов следует ожидать более раннюю манифестацию болезни, но знание генетического статуса позволяет врачам-неврологам проводить превентивную симптоматическую терапию нейропротекторами.

Доля образцов ДНК с выявленными мутациями оказалась существенно ниже ожидаемой с учетом частот встречаемости СЦА1, СЦА2 и СЦА3. Это может быть обусловлено трудностями дифференциальной диагностики различных форм атаксий, наличием большого числа фенотипов данной патологии. С другой стороны, возможно, что у российских больных мажорной является экспансия в другом гене, ответственном за СЦА. Результаты данной работы доказывают актуальность использования ДНК-диагностики с целью определения точного диагноза и планирования тактики лечения больных и диктуют необходимость создания систем диагностики других форм СЦА.

В результате работы было установлено, что новая медицинская технология «Система детекции в одной пробирке частых мутаций генов *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3* при спиноцеребеллярных атаксиях» обладает высокой специфичностью, точностью и эффективностью.

Впервые в России разработан способ детекции экспансии CAG-повторов генов *ATXN1*, *ATXN2* и *ATXN3* «в одной

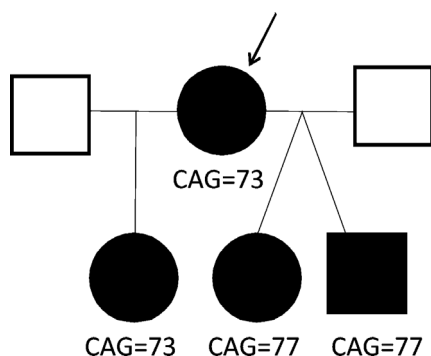


Рис. 2. Родословная семьи с СЦА3. Пробанд указана стрелкой. Подписаны зарегистрированные величины экспансированных CAG-повторов.

пробирке». Разработанный способ детекции экспансии CAG-повторов генов *ATXN1*, *ATXN2* и *ATXN3* повышает эффективность диагностики наследственных атаксий, позволяет оптимизировать финансовые и временные затраты поиска генетического варианта в семьях с атаксией.

Показаниями к использованию данных технологий являются:

1. Поиск молекулярно-генетических причин СЦА1, СЦА2 и СЦА3 в отягощенных семьях;
2. Пресимптоматическая диагностика СЦА;
3. Проведение пренатальной диагностики в отягощенных семьях;
4. Популяционные исследования частот СЦА.

Противопоказания для использования технологии «Система детекции в одной пробирке частых мутаций генов *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3* при спинocerebellарных атаксиях» отсутствуют.

Выявление мутаций у пробанда позволяет подтвердить диагноз на молекулярно-генетическом уровне, провести пресимптоматическую диагностику родственникам больного, провести, в случае необходимости, пренатальную диагностику.

Список литературы

1. Иллариошкин С.Н., Руденская Г.Е., Иванова-Смоленская И.А. и др. Наследственные атаксии и паралигии. М., 2006.
2. Ruano L, Melo C, Silva MC, Coutinho P. The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology*. 2014;42(3):174-83.

3. Margolis, R.L. Dominant spinocerebellar ataxias: a molecular approach to classification, diagnosis, pathogenesis and the future. *Expert Rev. Molec. Diag.* 3: 715-732, 2003.

4. Ключников С.А., Иллариошкин С.Н. Алгоритм диагностики наследственных атаксий. *Нервные болезни*; 2012 (1):7-12

5. Schmitz-Hubsch T, Coudert M, Bauer P et al. Spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: disease severity and nonataxia symptoms. *Neurology*. 2008 Sep 23;71(13):982-9.

6. Brusco A, Gellera C, Cagnoli C et al. Molecular genetics of hereditary spinocerebellar ataxia: mutation analysis of spinocerebellar ataxia genes and CAG/CTG repeat expansion detection in 225 Italian families. *Arch Neurol*. 2004 May;61(5):727-33.

7. Schols L, Amoiridis G, Bytner T, Przuntek H, Epplen JT, Riess O. Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes? *Ann Neurol*. 1997 Dec;42(6):924-32.

8. Takano H, Cancel G, Ikeuchi T et al. Close associations between prevalences of dominantly inherited spinocerebellar ataxias with CAG-repeat expansions and frequencies of large normal CAG alleles in Japanese and Caucasian populations. *Am J Hum Genet*. 1998 Oct;63(4):1060-6.

9. Pujana MA, Corral J, Gratacos M et al. Spinocerebellar ataxias in Spanish patients: genetic analysis of familial and sporadic cases. The Ataxia Study Group. *Hum Genet*. 1999 Jun;104(6):516-22. *Eur J Hum Genet* 1999 Oct;105(4):376.

10. Dorschner MO, Barden D, Stephens K. Diagnosis of five spinocerebellar ataxia disorders by multiplex amplification and capillary electrophoresis. *J Mol Diagn*. 2002 Apr;4(2):108-13.

11. Zhou YX, Qiao WH, Gu WH et al. Spinocerebellar ataxia type 1 in China: molecular analysis and genotype-phenotype correlation in 5 families. *Arch Neurol*. 2001 May;58(5):789-94.

Информация о конфликте интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Results for the use of the new medical technology «The detection system in one tube, the frequent mutations in *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3* genes in spinocerebellar ataxia» in DNA diagnostics

Mironovich O.L., Galeeva N.M., Zabnenkova V.V., Shchagina O.A., Polyakov A.V.

Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics»,
115409, Moscow, Moskvorechie 1, e-mail: polyakov@med-gen.ru

Spinocerebellar ataxias (SCAs) are a group of autosomal dominant inherited disorders characterized by progressive cerebellar ataxia and variable findings. SCAs are classified genetically according to a specific mutation or mapped locus, and also based on the clinical data. There are now more than 30 known genes responsible for spinocerebellar ataxia. SCAs are caused by a polyglutamine trinucleotide repeat CAG expansion. The symptoms of SCA are vary in individual patients and even within the same family. The results of the DNA diagnostics 335 probands with Spinocerebellar ataxia and their families, using of the new medical technology «the detection system in one tube, the frequent mutations in *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3* genes in spinocerebellar ataxia», are presented in the research.

Keywords: spinocerebellar ataxia, *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3*, DNA diagnostics, expansion