

Экспансия CAG-повтора в экзоне 1 гена *AR* у больных спинальной амиотрофией

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

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр»

Спинально-бульбарная мышечная амиотрофия (СБМА), или болезнь Кеннеди (OMIM 313200), — X-сцепленное рецессивное заболевание, обусловленное мутациями гена *AR*. Частоту СБМА оценивают, как 1 на 400 000 населения в год. В России молекулярно-генетические исследования СБМА на репрезентативных выборках больных из различных регионов до настоящего времени не проводилось. Целью настоящей работы явилось исследование протяженности CAG-повтора в экзоне 1 гена *AR* у больных. Материалом для работы послужили образцы ДНК, выделенные из крови 111 неродственных пробандов мужского пола с направляющим диагнозом «СБМА Кеннеди», 5 родственниц больных с подтвержденной СБМА, и 41 пробанда мужского пола старше 30 лет с направляющим диагнозом «спинальная мышечная амиотрофия», возраст которых на момент обращения для ДНК-диагностики СМА превышал 30 лет и не было выявлено делеций гена *SMN1*. Для исследования протяженности CAG-повтора в экзоне 1 гена *AR* использовалась медицинская технология «Система детекции частой мутации при спинальной атрофии Кеннеди», внедренная в практическую деятельность ФГБНУ «МГНЦ». В результате работы повторы числом 38 и более были выявлены у 38 больных с диагнозом «СБМА Кеннеди». Среди 41 неродственных больных мужского пола с входящим диагнозом СМА, но без делеций гена *SMN1*, было выявлено два больных СБМА. При исследовании родственников больных показан эффект увеличения числа CAG-повторов при прохождении через мужской мейоз. При исследовании распределения длин CAG-повторов установлено, что более чем у 80% российских больных длина полиглутаминового тракта составляет от 43 до 50 единиц, что соответствует классической форме СБМА с манифестацией на 4 декаде жизни и достаточно мягкими клиническими проявлениями.

Ключевые слова: спинальная и бульбарная амиотрофия Кеннеди, ген *AR*, экспансия CAG-повторов, антиципация.

Информация о конфликте интересов: Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов.

Благодарности: Авторы выражают признательность доктору медицинских наук Руденской Галине Евгеньевне за помощь в формулировании клинических аспектов описываемой патологии и ценные советы по оформлению статьи.

CAG expansion in exon 1 of the *AR* gene in Russian spinal atrophy patients

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

Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), or Kennedy's disease is a X-linked recessive neuromuscular disease. Its frequency is 1/400 000 inhabitants/year. In Russia, surveys of SBMA Kennedy on representative sets of patients have not been conducted to date. There are descriptions of only individual patients or family cases. The purpose of this research was to study the extent of CAG repeat in exon 1 of the *AR* gene in Russian patients. Material for this work was DNA samples isolated from the blood of 111 unrelated male with the incoming diagnosis «SBMA Kennedy's», 5 relatives of patients, and 41 male with incoming diagnoses «Spinal muscular atrophy», whose age at the time of application was more than 30 years old and no deletions of the *SMN1* gene were detected. The medical technology «System for detecting frequent mutation in Kennedy's spinal atrophy» was introduced into the practical activity of the Research Centre for Medical Genetics. Expansion of 38 or more CAG-repeats was detected in 38 SBMA Kennedy's patients and two patients among 41 unrelated male from SMA group. The effect of increasing the number of CAG repeats during male meiosis was shown. It was found that more than 80% of Russian patients have a poly-Q tract of 43 to 50 units, which corresponds to the classical form of SBMA with manifestation on fourth decades of lifeline rather mild progression.

Key words: SBMA, *AR*, CAG-expansion, anticipation.

Введение

Спинально-бульбарная мышечная амиотрофия или болезнь Кеннеди (СБМА) — X-сцепленная рецессивная форма спинальной атрофии. Особенности данной формы являются манифестация на 3—5 декаде жизни, медленное прогрессирование, сочетание атрофии мышц, бульбарной симптоматики и

признаков андрогенной резистентности. Частоту СБМА оценивают, как 1 на 400 000 населения в год [1]. В России молекулярно-генетические исследования СБМА на репрезентативных выборках больных до настоящего времени не проводилось. Существуют описания лишь отдельных больных или семейных случаев [2—6].

Болезнь чаще дебютирует на 3–5-м десятилетиях (диапазон 15–60 лет). Более ранними мышечными симптомами могут быть крампи, миалгия, утомляемость. Постепенно развиваются проксимальная слабость (больше ног, нередко асимметричная), выражены фасцикуляции; характерны амиотрофия и слабость мышц языка, жевательных, иногда мимических мышц, дисфагия, дизартрия; наблюдается фасцикулярный тремор рук, у части больных нарушена чувствительность. Симптомов поражения корковых мотонейронов нет. Бульбарные расстройства практически никогда не достигают жизнеугрожающей степени, но возможны асфиксия, аспирация. Типична повышенная активность КФК, что важно учитывать в диагностике и не считать этот признак указанием только на мышечную дистрофию. При электронейромиографии (ЭНМГ) выявляют признаки поражения мотонейронов, иногда также негрубые вторичные денервационные изменения. Однако даже квалифицированно проведенная ЭНМГ не всегда диагностически информативна и может давать ложноотрицательные результаты. У некоторых женщин — гетерозиготных носительниц во 2-й половине жизни появляются крампи, редкие фасцикуляции, после 60 лет — амиотрофия мышц языка, но выраженных проявлений гетерозиготности нет. Ранний, диагностически важный симптом, имеющийся у 50–70% больных, — гинекомастия, нередко асимметричная. Некоторые авторы описывают семейные случаи СБМА, когда кроме признаков спинальной атрофии в сочетании с гинекомастией имелись атрофия яичек и бесплодие у пораженных членов семьи [1, 3, 7, 8]. Исследования эндокринной функции у больных СБМА выявили признаки частичной резистентности к андрогенным гормонам у 80% носителей мутации. Наиболее частым признаком являлась гинекомастия, у некоторых больных наблюдалось изменение экссудативной функции яичек. Гормональный профиль частичной андрогенной резистентности наблюдался у 86% пациентов, при этом уровень тестостерона повышался на 68%. Исследователи отмечают, что резистентность к андрогенам не является врожденным признаком, а нарастает в течении жизни параллельно с прогрессированием неврологической симптоматики [9].

Причиной СБМА является экспансия тринуклеотидного CAG повтора в первом экзоне гена андрогенового рецептора (*AR*). CAG повтор гена кодирует полиглутаминовый тракт, расположенный в части рецептора, не задействованной в связывании гормонов и ДНК. В норме длина тракта полиморфна и составляет от 19 до 25 единиц. У больных СБМА число триплетов варьирует от 38 до 62 [7, 10]. В опытах *in vitro* не показано изменений способности рецептора с длинным полиглутаминовым трактом к связыванию половых гормонов [11]. Однако множество работ показало корреляцию между длиной полиглутаминового тракта, возрастом манифестации и тяжестью СБМА [12, 13]. При иммуногистохимическом анализе аутопсийного материала

ЦНС больных СБМА было установлено, что экспрессия мутантного *AR* выражена в ядрах клеток передних рогов спинного мозга и базальных ядрах головного мозга. Накопление мутантного белка ведет к дегенерации и потере мотонейронов, что нарушает иннервацию периферической мускулатуры и приводит к фенотипу спинальной атрофии. Сегодня широкое распространение получила теория, что ключевым звеном фенотипа СБМА является не поражение мотонейронов, а поражение мышц, что подтверждается высоким уровнем КФК у больных и наличием первично-мышечных изменений на биопсийном материале. Таким образом, фенотип СБМА обусловлен крайней важностью андрогенового рецептора в регуляции различных функций организма и складывается из поражения проксимальной мускулатуры вследствие разрушения клеток мышечных волокон, сенсорной нейропатии и атрофии дистальных мышц из-за поражения мотонейронов спинного мозга, синдрома поражения ядер головного мозга (бульбарный синдром) — дизартрия, дисфагия, парез мышц языка и нёба, глотки, гортани в сочетании с симптомами андрогеновой резистентности: гинекомастией, атрофией яичек, бесплодием [14].

Эффективной патогенетической терапии СБМА на сегодняшний день не разработано. Существующая симптоматическая терапия направлена на поддержание мышц, устранение бульбарной симптоматики. Прогрессирование медленное, через 20 лет после начала заболевания лишь треть больных утрачивает ходьбу; продолжительность жизни обычная [15].

Диагностика СБМА основана на исследовании числа CAG повторов экзона 1 гена *AR* [15]. Важную роль играет дифференциальная диагностика СБМА и бокового амиотрофического склероза, особенно на ранних этапах манифестации болезней, так как имеются кардинальные различия в терапии и прогнозе этих двух форм поражения спинного мозга [14]. Следует отметить, что молекулярно-генетическая диагностика СБМА, как и других болезней экспансии, является целенаправленной. Выявить увеличение числа триплетов, характерное для больных, невозможно ни прямым автоматическим секвенированием по Сенгеру, ни с использованием методов массового параллельного секвенирования.

Материалы и методы

В период с 24.03.2014 по 13.04.2017 с использованием внедренной в практическую деятельность МГНЦ медицинской технологии «Система детекции частой мутации при спинальной атрофии Кеннеди» в лабораториях молекулярно-генетической диагностики №1 и ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» было обследовано 111 неродственных пробандов мужского пола с направляющим диагнозом *СБМА Кеннеди*, 5 родственниц больных с подтвержденной СБМА, и 41 пробанд мужского пола старше 30 лет с направляющим диагнозом *спинальная*

мышечная амиотрофия (СМА), возраст которых на момент обращения за диагностикой СМА превышал 30 лет и не было выявлено делеций гена *SMN1*. От всех больных было получено информированное согласие на использование образцов ДНК в научных целях.

ДНК выделена из лимфоцитов периферической крови, забранной в пробирку с антикоагулянтом ЭДТА или на бумажный фильтр.

Экстракцию ДНК проводили с использованием наборов реактивов для выделения из цельной крови Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) и для выделения из образцов сухой крови DNAAtom DNAprep 100 (Галарт Диагностикум, Россия) по протоколам производителей.

Для диагностики СБМА в практику ФГБНУ «МГНЦ» была внедрена медицинская технология: «Система детекции частой мутации при спинальной атрофии Кеннеди». Данная технология представляет собой ПЦР-ПДАФ анализ, позволяющий быстро и эффективно выявлять экспансию.

Дизайн праймеров осуществлен в лаборатории ДНК — диагностики ФГБНУ «МГНЦ», синтез — в НПК «Синтол» (Москва), ЗАО «Евроген» (Москва).

Последовательности праймеров, входящих в реакцию, выбирали согласно базе данных GeneBank. Использована последовательность гена *AR* (NM_000044), фланкирующая CAG повтор в экзоне 1 (табл. 1).

Аmplification всех исследуемых фрагментов ДНК проводили методом ПЦР на программируемом термоциклере МС2 фирмы «ДНК-технология» (Россия) с использованием ДНК-полимеразы Biotaq («Биомастер») в объеме 25µl реакционной смеси следующего состава: 20–100 нг геномной ДНК; по 0,25 µM каждого оригинального олигопраймера; по 200 µM каждого нуклеозидтрифосфата; 2 mM MgCl₂; 1,0 единица активности ДНК-полимеразы Biotaq («БиоМастер»); 1x реакционный буфер (67 mM Tris-HCl, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween-20); 20–30 µl минерального масла.

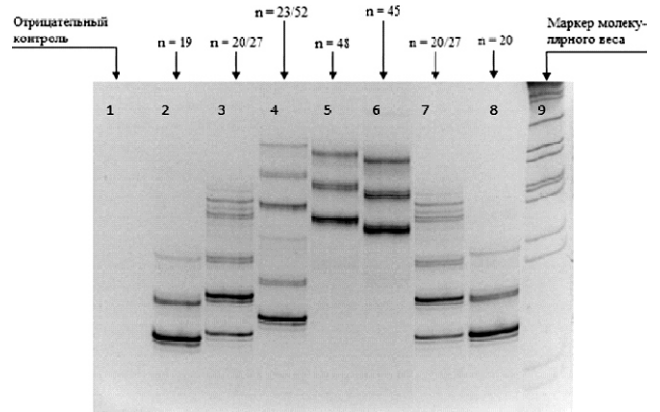


Рис. 1. Визуализация результатов анализа с использованием вертикального гель-электрофореза в полиакриламидном геле. Электрофореграмма результатов детекции числа CAG-повторов экзона 1 гена *AR*; n — число повторов.

Дорожка 1 — отрицательный контроль.
Дорожка 9 — маркер молекулярного веса.
Дорожки 2, 4, 5, 6, 8 — исследуемые образцы ДНК (число повторов указано над стрелкой).
Дорожки 3, 7 — контрольный образец ДНК женщины с числом повторов 20 и 27.

Аmplification проводили в следующих условиях: предварительная денатурация при 95°C — 5 минут; 94°C — 45 секунд; температура отжига праймера 65°C — 45 секунд; элонгация цепи 72°C — 2 минуты — 30 циклов, с последующей окончательной достройкой при 72°C в течение 7 минут.

Продукт реакции детектировался методом вертикального электрофореза в 8% ПААГ (соотношение акриламида/бисакриламида 29/1,3) с последующим окрашиванием геля раствором бромистого этидия и регистрацией в УФ-излучении (длина волны 312 нм) на документирующей системе GelDoc фирмы «BIO-RAD» (США).

Интерпретацию результатов проводили на основании длин фрагментов, идентифицируемых на электрофорезе, относительно контрольных образцов с извест-

Таблица 1
Праймеры и условия амплификации, применявшиеся для ПЦР-реакции при детекции экспансии CAG-повтора

| | |
|---|----------|
| Последовательность праймеров, 5'→3' | t отжига |
| ARF AGCGCAGCACCTCCCGGCGC ARRN GCCTGGGGCTAGTCTCTTGC | 65°C |

Таблица 2
Интерпретация результатов

| Ген | Исследуемый фрагмент | Статус | Длина, п.н. |
|-----|---------------------------|-----------------------|-------------|
| AR | Аллель: (CAG)n, n = 9-35 | Норма | 82-160 |
| | Аллель: (CAG)n, n = 36-37 | Неопределенный статус | 163-166 |
| | Аллель: (CAG)n, n = 38-72 | Мутация | 169-271 |

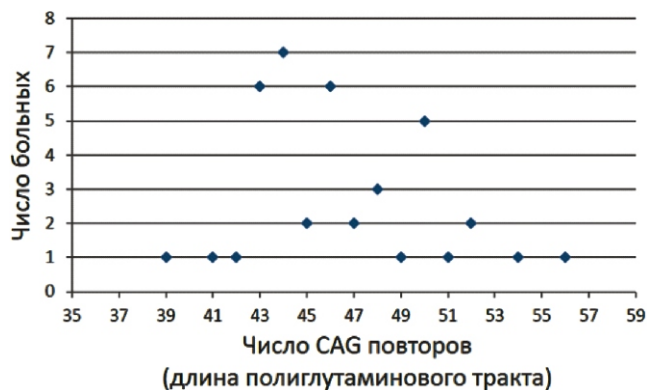


Рис. 2. Частота встречаемости экспансии различных длин полиглутаминового тракта у российских больных СБМА

ным генотипом (табл. 2, рис. 1). Для определения генотипов контрольных образцов предварительно несколько мужчин с экспансией были протипированы с использованием FAM-меченного праймера, и относительно числа повторов, выявленных у них, определялось число повторов у женщин-контролей.

Результаты и обсуждение

Из 111 неродственных пробандов с направляющим диагнозом «Спинальная и бульбарная амиотрофия Кеннеди» экспансия 38 и более повторов была выявлена у 38 больных. Таким образом, диагноз СБМА был подтвержден молекулярно-генетическими методами в 34% случаев, что доказывает сложность дифференциальной диагностики различных форм спинальных атрофий на клиническом этапе обследования и необходимость использования ДНК-диагностики для окончательной постановки диагноза.

Из выборки СМА, состоящей из 1800 пробандов (861 женщины и 1029 мужчин), были отобраны больные обратившиеся за ДНК-диагностикой СМА в возрасте старше 30 лет, среди них было 37 женщин и 56 мужчин. Делеция экзонов 7/8 гена *SMN1* в гомозиготном состоянии была выявлена у 7 и 15 женщин и мужчин соответ-

ственно. Всем мужчинам (41) без делеций гена *SMN1* было проведено исследование числа CAG повторов в экзоне 1 гена *AR*. Среди 41 неродственных больных мужского пола с входящим диагнозом СМА, но без делеций гена *SMN1*, было выявлено два больных СБМА.

Распределение частот встречаемости различных длин CAG-повтора у больных СБМА представлено на рис. 2.

Как видно из рис. 2, более чем у 80% больных длина полиглутаминового тракта составляет от 43 до 50 единиц, что соответствует классической форме СБМА с манифестацией на 4 декаде жизни и достаточно мягкими клиническими проявлениями. Интересно отметить, что число повторов менее 40 встретилось лишь у одного из обратившихся за диагностикой СБМА, что может быть связано с неполной пенетрантностью у носителей полиглутаминового тракта длиной 38–40 единиц и очень поздним возрастом манифестации заболевания. Возможно, основное число таких носителей просто не попадает в поле зрения врачей-генетиков.

Кроме больных, для исследования были доступны образцы ДНК родственниц больных: четырех дочерей и одной племянницы больного. У всех женщин носительство СБМА было подтверждено. Родословные семей с указанием числа CAG-повторов приведены на рис. 3.

Как видно из рис. 3, при передаче аллеля с экспансией может наблюдаться феномен антиципации — удлинения полиглутаминового тракта андрогенового рецептора. Данный феномен хорошо известен и описан при болезнях экспансии и является следствием нестабильности данного региона, приводящей к мейотическим ошибкам, связанным с наращиванием числа повторов [16].

Семья 39 (рис. 3) интересна тем, что при передаче аллеля через женский мейоз, число повторов осталось неизменным, а при передаче через мужской — увеличилось до 66. Кроме того, больной из семьи 39 имеет самое высокое число повторов среди обследованных нами больных мужчин, поэтому в качестве клинического примера СБМА приведем его историю болезни.

Больной П., на момент обращения 42 года. Жалобы на нарастающую общую слабость, трудности подъема по лестнице, подергивания в различных мышцах. Считает себя больным в течение трёх лет, когда вскоре после перенесенной стрессовой ситуации появилась слабость в конечностях, спустя несколько месяцев присоединились похудание мышц и мышечные подергивания. Семейный анамнез не отягощен, родители больного не обследованы, жалоб не предъявляют, больной имеет здоровую дочь. Старшая сестра здорова, имеет здоровых дочь и сына (рис. 3).

При осмотре: правильного телосложения, умеренно-го питания, грудные железы увеличены в размере (со слов пациента, с детского возраста). Диффузные симметричные гипотрофии мышц плечевого пояса, верхних

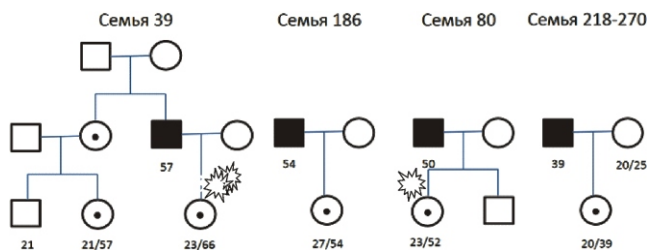


Рис. 3. Черными квадратами обозначены больные мужчины. Кругами с точкой обозначены здоровые женщины-носительницы СБМА. Генотипы протипированных людей приведены под рисунком. Мейозы, приводящие к увеличению экспансии CAG-повтора, обозначены звездочкой.

конечностей, межкостных мышц на кистях. Движения глазных яблок в полном объеме, язык по средней линии с гипотрофиями, голос звучный, мандибулярный рефлекс оживлен. Мышечный тонус в руках снижен, в ногах немного повышен. Легкий парез рук до 3 баллов. Из положения сидя без помощи рук встает с трудом, на носки встать не может, на пятки с трудом. При осмотре наблюдаются единичные фасцикуляции мышц плечевого пояса, туловища. Сухожильные рефлексы с рук симметрично снижены, с ног не вызываются. Брюшные рефлексы живые. Симптома Бабинского нет. Глубокая и поверхностная чувствительность не изменены. При выполнении пальцевого пробы наблюдается интенционный тремор.

Проведены исследования: МРТ головного мозга — без патологии, МРТ грудного и поясничного отделов позвоночника — задняя протрузия диска L5-S1 до 3 мм. Игольчатая ЭНМГ: снижение амплитуд М-ответов, регистрируется спонтанная активность в виде фасцикуляций, имеющих тенденцию к синхронизации. СПИ по двигательным волокнам большеберцовых нервов значительно снижены. длительности ПДЕ значительно увеличены. ОАК без патологии, б/х анализ крови — увеличение АЛТ до 36 ед/л (N до 20), общий билирубин — 23,3 (N до 17,1), увеличение КФК до 201 (N<171).

На основании данных клинического и электронейромиографического обследования больной был направлен на ДНК-диагностику СБМА. При проведении ДНК диагностики выявлена экспансия CAG-повтора в экзоне 1 гена *AR* длиной 57 единиц. Диагноз СБМА молекулярно-генетическими методами подтвержден. Интересно отметить, что, несмотря на носительство аллеля со столь длинным повтором, у больного наблюдалась типичная клиническая картина СБМА и достаточно мягкое течение болезни.

При обследовании родственников больного у дочери зарегистрировано 23 и 66 повторов гена *AR*, у племянницы 21 и 57, таким образом, они являются носительницами СБМА. У племянника больного зарегистрирован нормальный аллель с 21 CAG-повторами.

Таким образом, результаты исследования молекулярно-генетических причин СБМА у российских больных полностью соответствуют результатам, полученным в других европейских популяциях и при обследовании больных, проживающих на территории РФ, на меньших выборках. Показана необходимость поиска экспансии CAG-повтора у мужчин с диагнозом *спинальная мышечная амиотрофия* с манифестацией болезни в третьей-четвертой декаде жизни. В данной работе на репрезентативной выборке неродственных больных с экспансией CAG-повтора в экзоне 1 гена *AR* удалось установить распределение мутантных аллелей. На основе анализа материнской и отцовской передачи экспансии тринуклеотидных повторов выявлена тенденция к увеличению экспансии. Новая медицинская техно-

логия «Система детекции частой мутации при спинальной атрофии Кеннеди» показала свою диагностическую эффективность.

Показаниями к использованию данной технологии являются:

1. ДНК-диагностика СБМА.
2. Диагностика гетерозиготного носительства СБМА.
3. Проведение пренатальной диагностики в отягощенных семьях.
4. Исследование генетических причин андрогенной резистентности у бесплодных мужчин.
5. Популяционные исследования частот носительства экспансии CAG-повтора в экзоне 1 гена *AR*.

Противопоказания для использования технологии отсутствуют.

Данная медицинская технология «Система детекции частой мутации при спинальной атрофии Кеннеди» эффективна для детекции экспансии CAG-повтора гена *AR*, являющегося причиной СБМА Кеннеди. Использование данной технологии позволяет выявлять экспансию, не прибегая к специальному дорогостоящим методам детекции, что позволяет снизить финансовые и временные затраты на проведение ДНК-диагностики данного заболевания.

Выявление мутаций у пробанда позволяет подтвердить диагноз на молекулярно-генетическом уровне, проводить диагностику носительства родственникам больного и пренатальную/предимплантационную диагностику.

Список литературы

1. Fischbeck KH. Kennedy disease. *J Inherit Metab Dis*. 1997;(20):152.
2. Исайкин АИ, Черненко ОА, Самхаева НД, Шагбазян АЭ Бульбоспинальная амиотрофия Кеннеди с синдромом патологической мышечной утомляемости. *Неврологический журнал*. 2015; 20 (2):32-37
3. Ключников СА, Иллариошкин СН, Иванова-Смоленская ИА Семейный случай спинально-бульбарной амиотрофии Кеннеди. *Нервные болезни*. 2008 (1):32-35
4. Мальмберг СА, Заваденко НН, Петрухин АА, Евграфов ОВ, Маслова ОИ Нейрофизиологические исследования в семье больных спинальной и бульбарной амиотрофией Кеннеди: диагностика доклинических стадий заболевания у детей. *Педиатрия. Журнал Н.Г. Сперанского* 1997; 76(2):8
5. Максимова Н.Р. Клинико-генеалогическая и молекулярно-генетическая характеристика этноспецифических форм наследственной патологии у якутов. Дисс. д.м.н. Томск. 2009.
6. Дубчак Л.В. Бульбо-спинальная амиотрофия Кеннеди. *Неврологический журнал* 1996; 3: 28-32.
7. Amato AA, Prior TW, Varohn RJ et al. Kennedy's disease: a clinicopathologic correlation with mutations in the androgen receptor gene. *Neurology*. 1993 Apr;43(4):791-4.
8. La Spada A. Spinal and Bulbar Muscular Atrophy. 1999 Feb 26 [Updated 2017 Jan 26]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017.
9. Dejager S, Bry-Gauillard H, Bruckert E et al. A comprehensive endocrine description of Kennedy's disease revealing androgen

insensitivity linked to CAG repeat length. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Aug;87(8):3893-901.

10. Neuschmid-Kaspar F, Gast A, Peterziel H et al. CAG-repeat expansion in androgen receptor in Kennedy's disease is not a loss of function mutation. *Mol Cell Endocrinol.* 1996 Mar 25;117(2):149-56.

11. Mhatre AN, Trifiro MA, Kaufman M et al. Reduced transcriptional regulatory competence of the androgen receptor in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat Genet.* 1993 Oct;5(2):184-8.

12. Igarashi S, Tanno Y, Onodera O et al. Strong correlation between the number of CAG repeats in androgen receptor genes and the clinical onset of features of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neurology.* 1992 Dec;42(12):2300-2.

13. La Spada AR, Roling DB, Harding AE et al. Meiotic stability and genotype-phenotype correlation of the trinucleotide repeat in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat Genet.* 1992 Dec;2(4):301-4. PubMed

14. Querin G, Soraru G, Pradat PF. Kennedy disease (X-linked recessive bulbospinalneuronopathy): A comprehensive review from pathophysiology to therapy. *Rev Neurol (Paris).* 2017 May;173(5):326-337.

15. Choi WT, MacLean HE, Chu S et al. Kennedy's disease: genetic diagnosis of an inherited form of motor neuron disease. *Aust N Z J Med.* 1993 Apr;23(2):187-92.

16. Zhang L, Fischbeck KH, Arnheim N. CAG repeat length variation in sperm from a patient with Kennedy's disease. *Hum Mol Genet.* 1995 Feb;4(2):303-5.