

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи

Юдкин Дмитрий Владимирович

**Молекулярно-биологические основы синдрома ломкой X-
хромосомы**

1.5.3 – молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант: член.-корр. РАН,
д.б.н., профессор Графодатский А.С.

Кольцово – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	8
Актуальность работы	8
Цели и задачи.....	13
Научная новизна.....	13
Теоретическая и практическая значимость исследований	14
Основные положения, выносимые на защиту.....	15
Апробация работы.....	15
Публикации по теме диссертации	16
Личный вклад автора	16
Структура и объем диссертационной работы	18
ГЛАВА 1. ЗАБОЛЕВАНИЯ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ЛОМКОЙ X-ХРОМОСОМОЙ: ХАРАКТЕРИСТИКА, ДИАГНОСТИКА И ТЕРАПИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	19
1.1. Введение.....	19
1.2. Понятие фраксопатий	19
1.3. Эпигенетические изменения в гене <i>FMRI</i> при экспансии повторов.....	26
1.4. Участие микроРНК в развитии фраксопатий.....	31
1.5. Соматическая нестабильность повторов CGG и методы ее оценки	33
1.6. Вероятные механизмы нестабильности CGG повторов.....	40
1.6.1. Общая характеристика нестабильности повторов.....	40
1.6.2. Вероятный механизм экспансии повторов.....	41
1.6.3. Вероятный механизм сокращения повторов	47
1.7. RAN-трансляция в локусе <i>FMRI</i>	51
1.8. Ломкие сайты хромосом.....	53
1.8.1. Общая характеристика ломких сайтов хромосом.....	53
1.8.2. Обычные ломкие сайты хромосом	58
1.8.3. Редкие ломкие сайты хромосом и фолатный стресс	65

1.9. Молекулярно-генетическая диагностика фраксопатий	69
1.10. Терапия фраксопатий.....	74
1.10.1. Общие подходы к терапии фраксопатий	74
1.10.2. Фармакологическая реактивация экспрессии гена <i>FMR1</i>	78
1.10.3. Терапия синдрома ломкой X-хромосомы с помощью некодирующих РНК	79
1.10.4. Генотерапия в лечении синдрома ломкой X-хромосомы	81
1.11. Заключение по обзору литературы.....	84
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	86
2.1. Материалы.....	86
2.1.1. Модельные лабораторные мыши.....	86
2.1.2. Биологический материал пациентов с фраксопатиями.....	86
2.1.3. Пациенты с фраксопатиями	86
2.1.4. Линии клеток	87
2.1.5. Зонды для FISH.....	89
2.1.6. Праймеры, использованные в работе.....	89
2.2. Методы	92
2.2.1. Получение клеток семенников лабораторных мышей	92
2.2.2. Выделение отделов головного мозга лабораторных мышей.....	94
2.2.3. Культивирование иммортализованных клеточных линий В-лимфоцитов ...	94
2.2.4. Иммортализация В-лимфоцитов пациентов.....	95
2.2.5. Индукция ломких сайтов FRAXA и приготовление препаратов метафазных хромосом	95
2.2.6. Флуоресцентная <i>in situ</i> гибридизация	96
2.2.7. Исследование ломкости хромосом и митотического индекса	98
2.2.8. Обработка клеток ингибиторами деацетилаз гистонов и оценка жизнеспособности клеточной культуры.....	99
2.2.9. Количественный анализ мРНК	100
2.2.10. Определение длины CGG повтора	101
2.2.11. Анализ метилирования промоторной области гена <i>FMR1</i>	102
2.2.12. Анализ репликативной активности в районе повтора CGG	103

2.2.13. Исследование ориджинов репликации <i>in silico</i>	104
2.2.14. Анализ времени репликации.....	104
2.2.15. Вестерн-блот анализ	105
2.2.16. Функциональная МРТ головного мозга.....	106
ГЛАВА 3. СОМАТИЧЕСКАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ПОВТОРА CGG И ЕЕ ВЛИЯНИЕ НА ПРОЯВЛЕНИЕ ФРАКСОПАТИЙ	108
3.1. Введение.....	108
3.2. Соматическая экспансия в различных органах мышей с премутацией по гену <i>fmr1</i>	109
3.3. Экспансия (CGG) _n повтора в несоматических клетках семенников.....	114
3.4. Соматическая экспансия и метаболизм ДНК.....	116
3.5. Соматическая экспансия в культурах В-лимфоцитов и головном мозге человека.....	119
3.6. Влияние соматической экспансии CGG повторов на изменения в головном мозге человека и нарушение когнитивных функций	123
3.7. Биологический смысл корреляций между индексом соматической нестабильности и функциональной коннективностью между отделами головного мозга.....	132
3.8. Заключение по главе 3	135
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ПОДХОДА ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЛОМКОГО САЙТА FRAXA НА ПРЕПАРАТАХ МЕТАФАЗНЫХ ХРОМОСОМ	141
4.1. Введение.....	141
4.2. Паттерны локализации сигналов генов <i>FMRI</i> и <i>GPR50</i>	141
4.3. Распределения паттернов локализации в зависимости от клеточной линии и наличия или отсутствия 5-фтордезоксисуридина.....	146
4.4. Пример исследования клинического случая умственной отсталости с использованием разработанного подхода визуализации ломких сайтов FRAXA	149
4.5. Заключение по главе 4	152
ГЛАВА 5. МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ ЛОМКОГО САЙТА FRAXA ПРИ СИНДРОМЕ ЛОМКОЙ X-ХРОМОСОМЫ.....	154
5.1. Введение.....	154
5.2. Влияние камптотецина на частоту образования ломких сайтов FRAXA	155

5.3. Активность ориджинов репликации, локализованных в районе CGG повтора, в различных типах клеток	158
5.4. Активация репликации в районе гена <i>FMR1</i> в линиях immortalized В-лимфоцитов.....	162
5.5. Особенности репликации фолатчувствительных ломких сайтов хромосом .	171
5.6. Анализ причин ломкости сайта FRAXA.....	174
ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ДЕАЦЕТИЛАЗ ГИСТОНОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА <i>FMR1</i>	180
6.1. Необходимость разработки подходов для реактивации гена <i>FMR1</i>	180
6.2. Влияние 5-азадезоксцитидина на экспрессию гена <i>FMR1</i>	181
6.3. Влияние ромидепсина и вориностата на экспрессию гена <i>FMR1</i>	182
6.4. Перспективы использования ингибиторов деацетилаз гистонов в качестве потенциальных терапевтических препаратов для борьбы с фраксопатиями	186
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	188
ВЫВОДЫ	191
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	193
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	246

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДМСО – диметилсульфоксид

ДТТ – дитиотреитол

е.а. – единицы активности

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

м.п.н. – миллион пар нуклеотидов

МРТ – магнитно-резонансная томография

п.н. – пара нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

т.п.н. – тысяча пар нуклеотидов

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

AAV – (англ. adeno-associated virus) аденоассоциированный вирус

BAC – (англ. bacterial artificial chromosome) искусственная бактериальная хромосома

BSA – (англ. bovine serum albumin) бычий сывороточный альбумин

ChIP – (англ. chromatin immunoprecipitation) иммунопреципитация хроматина

CpG – участок ДНК, обогащенный последовательно связанным дезоксицитидинмонофосфатом и дезоксигуанозинмонофосфатом

CRISPR – (англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats) короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами

DAPI – (англ. 4',6-diamidino-2-phenylindole) 4',6-диамидино-2-фенилиндол

DIG – (англ. digoxigenin) дигоксигенин

DOP-ПЦР – (англ. degenerate oligonucleotide primed) ПЦР с вырожденным олигонуклеотидным праймером

FBS – (англ. fetal bovine serum) фетальная бычья сыворотка

FDA – (англ. Food and Drug Administration) Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США

FdU – 5-фтордезоксисуридин

FISH – (англ. fluorescence *in situ* hybridization) флуоресцентная гибридизация *in situ*

FITC – (англ. fluorescein isothiocyanate) флуоресцеина изотиоцианат

FMRI – (англ. functional magnetic resonance imaging) функциональная магнитно-резонансная томография

GFP – (англ. green fluorescent protein) зеленый флуоресцентный белок

HDAC – (англ. histone deacetylases) деацетилазы гистонов

LINE – (англ. long interspersed nuclear elements) длинные диспергированные повторы

LTR – (англ. long terminal repeats) длинные концевые повторы

MMEJ – (англ. microhomology mediated end joining) соединение концов, опосредованное микрогомологиями

RFU – (англ. relative fluorescence units) относительные единицы флуоресценции

ROI – (англ. regions of interest) области интереса

SNP – (англ. single-nucleotide polymorphism) однонуклеотидный полиморфизм

UTR – (англ. untranslated region) нетранслируемая область

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Заболевания, ассоциированные с ломкой X-хромосомой, так называемые фраксопатии, развиваются из-за экспансии повтора CGG, локализованного в промоторной области гена *FMR1* перед первым экзоном. В зависимости от размера повтора различают три основных аллеля этого гена: норма, премутация и полная мутация. К фраксопатиям относятся три заболевания: синдром ломкой X-хромосомы, синдром атаксии/тремора, ассоциированный с ломкой X-хромосомой, и синдром первичной овариальной недостаточности, ассоциированный с ломкой X-хромосомой. Синдром ломкой X-хромосомы, также называемый синдромом Мартина-Белл, является самой распространенной причиной наследственной умственной отсталости у человека после синдрома Дауна и встречается с частотой 1/4000-1/6000 (D'Hulst, Kooy, 2009). Природа развития синдрома связана с гетерохроматинизацией промоторной области гена *FMR1* из-за экспансии при полной мутации и, следовательно, прекращением экспрессии. Это приводит к полному отсутствию РНК-связывающего белка FMRP, который принимает важное участие в развитии нейронов в эмбриональном периоде. При синдромах, ассоциированных с премутацией, ген продолжает работать, но нарушается баланс мРНК и белка FMRP. Клинические симптомы в этом случае развиваются, как правило, с возрастом пациента. Премутация встречается с частотой 1/200-1/400 (Tassone et al., 2007). Наибольшее значение при премутации имеет риск передачи увеличенного повтора следующим поколениям, причем при такой передаче экспансия может увеличиться, и премутантный аллель перейдет в полную мутацию (D'Hulst, Kooy, 2009).

По данным Всемирной организации здравоохранения, умственная отсталость имеет высокое социальное значение, так как в среднем в мире на каждого человека с данной патологией затрачивается порядка 1 миллиона долларов в течение его жизни. На сегодня методов лечения синдрома ломкой X-хромосомы не существует.

Более того, профилактика данной патологии заключается лишь в анализе размера повтора у матери и прогнозе вероятной экспансии у ребенка.

Высокая распространенность фраксопатий, их социальное значение и сложная молекулярно-генетическая природа развития требуют значительных усилий научного сообщества для понимания механизмов развития патологий при этих заболеваниях и понимания связи этих патологий с молекулярно-генетическими нарушениями. Эффективность таких исследований позволит подойти к разработке как методов эффективной диагностики, так и методов профилактики и лечения этих заболеваний. Однако такие исследования сталкиваются с определенными трудностями, обусловленными сложностью развития заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой. Молекулярные изменения при развитии фраксопатий влекут за собой целый ряд изменений в организме пациента как на биохимическом, так и на молекулярно-генетическом и организменном уровнях. Поэтому исследование природы развития данных патологий подразумевает комплексный подход, который в себя включает как исследование мутации экспансии самой по себе, так и исследование ее влияния на остроту симптомов, а также разработку средств диагностики и лечения, с учетом знаний о природе развития фраксопатий.

Три аллеля гена *FMRI* охарактеризованы на уровне ДНК и на уровне транскрипции и трансляции. Однако такие характеристики касаются работы данного гена в единичной клетке или в однородной клеточной культуре. На уровне организма происходят более сложные изменения, которые зависят от типа ткани. Существует такое явление как соматическая экспансия (Telenius et al., 1994; Chong et al., 1995; Manley et al., 1999; Tanaka et al., 1999; De Biase et al., 2007). Т.е. повтор CGG по природе своей нестабильности может меняться в течение жизни индивидуума, причем в разной степени и в разных направлениях в разных тканях. Это зависит от молекулярной причины самой мутации, которая связана с метаболизмом ДНК. В результате это приводит к соматическому мозаицизму. Понимание природы и механизмов соматической экспансии и соматического мозаицизма имеет важное прогностическое значение при работе с пациентами с

фраксопатиями. Так, молекулярно-генетическая диагностика этих патологий проводится по образцам периферической венозной крови пациентов, при этом там выявляется один или несколько аллелей гена *FMRI* в зависимости от размера повтора.

Известно, что размер повтора CGG влияет непосредственно на уровень экспрессии гена *FMRI*, наличие белка FMRP и соотношение мРНК/белок, что особенно важно при премутантных и пограничных состояниях, а также небольших или неметилированных полных мутациях. Но размер повтора в клетках крови совсем не обязательно соответствует таковому в других клетках организма, в частности в нейронах, что определяет остроту симптомов, или в генеративных клетках, что определяет передачу фраксопатий следующим поколениям. Поскольку нестабильность CGG повторов может быть различна хотя бы потому, что у разных пациентов в образцах крови присутствует разное количество аллелей, необходимо разработать оптимальный критерий количественной оценки этого явления (Nolin et al., 1994; Pretto et al., 2014; Jiraanont et al., 2017). Понимание картины и вероятных причин соматической нестабильности, а также ее количественная оценка позволят значительно повысить прогностическое значение определения размеров повторов у пациентов.

Влияние соматической нестабильности на остроту симптомов может быть связано с тем, что в случае полной мутации в популяции клеток могут присутствовать также премутантные и даже нормальные аллели, которые обеспечивают синтез определенного количества белка FMRP. Это в свою очередь приводит к смягчению симптомов (Tabolacci et al., 2008a; Manor et al., 2017). Клиническое обследование пациентов, как правило, проводят психиатры, неврологи и клинические психологи, и результаты этого обследования не являются количественными признаками. В последнее время при исследовании пациентов с неврологическими или психиатрическими заболеваниями широко используют функциональную магнитно-резонансную томографию головного мозга, которая позволяет выявлять низкочастотные флуктуации сигналов на основе гемодинамических параметров. Функциональная МРТ в покое позволяет

определить базальную активность головного мозга и функциональную взаимосвязь между его отделами (Hohenfeld et al., 2018). Исследование корреляции количественных параметров функциональной взаимосвязи отделов головного мозга и количественных параметров соматической нестабильности у носителей разных аллелей гена *FMR1* позволит определить вклад молекулярно-генетических изменений в развитие симптомов фраксопатий, что крайне важно для прогноза развития течения заболеваний.

Одной из характеристик синдрома ломкой X-хромосомы является образование ломкого сайта FRAXA. Этот сайт характеризуется перетяжкой или разрывом и может приводить к потере дистального фрагмента хромосомы. Зачастую у женщин, гетерозиготных по гену *FMR1*, происходит потеря X-хромосомы, несущей полную мутацию и ломкий сайт FRAXA, при этом развивается мозаичный синдром Шерешевского-Тернера (Dobkin et al., 2009). Ломкий сайт FRAXA относится к фолатчувствительным ломким сайтам и экспрессируется при определенных условиях, например, при фолатном стрессе (Lukusa, Fryns, 2008). Понимание природы образования этого ломкого сайта также позволит охарактеризовать еще один из аспектов развития патологии.

Наличие ломкого сайта FRAXA является одним из диагностических признаков синдрома ломкой X-хромосомы. В целом, молекулярно-генетическая диагностика фраксопатий является достаточно трудоемкой задачей. Изначально, подходом для диагностики являлся Саузерн-блот анализ, основанный на выявлении фрагмента, соответствующего повтору CGG большой длины (Rousseau et al. 1991; Monaghan et al., 2013). Этот метод требует значительных количеств геномной ДНК, что зачастую невозможно, так как большинство пациентов – это дети, у которых забирают незначительное количество крови. К тому же Саузерн-блот анализ позволяет лишь примерно определить размер повтора, что не применимо для пограничных размеров аллелей. Другой подход для диагностики – амплификация и определение размера ПЦР продукта – максимально информативен, однако требует высокого уровня подготовки персонала, способного проводить очень сложную амплификацию крайне GC-богатых матриц (Hayward et al., 2016). Кроме

того, при этом подходе требуется использование дорогих реактивов для фрагментного анализа и оборудования – генетических анализаторов. По этим причинам использование описанных выше методик диагностики фраксопатий затруднено во многих медико-генетических консультациях. В этом случае оптимальным может быть использование молекулярно-цитогенетического подхода, основанного на визуализации ломкого сайта FRAXA. Кариотипирование и цитогенетический анализ успешно применяются во многих медико-генетических лабораториях, например, при скрининговых анализах. Однако в случае ломкого сайта FRAXA его теломерная локализация затрудняет использования такого подхода. Перетяжка или разрыв находятся на самом конце q-плеча X-хромосомы, что трудно визуализировать (D’Hulst, Kooy, 2009). Оптимизация методики визуализации ломкого сайта FRAXA позволит получить удобный и недорогой инструментарий диагностики синдрома ломкой X-хромосомы.

Одна из основных целей исследования природы фраксопатий – это разработка методов их лечения. Такая работа ведется по разным направлениям, одним из которых является исследование эффекта веществ, снижающих гетерохроматинизацию участка увеличенного CGG повтора. Как правило, это ингибиторы ферментов участвующих в гетерохроматинизации. Наиболее перспективными считаются ингибиторы ДНК-метилтрансфераз и ингибиторы деацетилаз гистонов (Tabolacci, Chiurazzi, 2013). Основная идея использования таких веществ – это реактивация подавленной экспрессии гена *FMRI*, вследствие чего будет появляться определенное количество белка FMRP, что должно привести к смягчению симптомов либо вообще к восстановлению нормального фенотипа. Некоторые из таких ингибиторов являются одобренными медицинскими препаратами для борьбы с другими заболеваниями. Исследование их реактивирующей способности в отношении подавленной экспрессии гена *FMRI* позволит оценить возможность их использования как препаратов для борьбы с фраксопатиями.

Цели и задачи

Целью работы является комплексное исследование заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой как на молекулярно-генетическом уровне, так и на уровне функциональных изменений головного мозга, а также оптимизация диагностических и терапевтических подходов для борьбы с этими патологиями.

Задачи:

1. Выявить особенности соматической экспансии повторов (CGG)_n у человека и модельных мышей, носителей премутации по гену *FMRI*.

2. Установить зависимость функциональных изменений в головном мозге у пациентов с фраксопатиями от степени соматической нестабильности повтора CGG в промоторной области гена *FMRI*.

3. Построить молекулярную модель формирования ломких сайтов FRAXA на основе исследования механизма их образования у пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы.

4. Разработать подход для молекулярной визуализации ломкого сайта FRAXA на хромосомах пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы.

5. Оценить эффективность использования ингибиторов гистоновых деацетилаз, одобренных для применения в клинической практике, как потенциальных терапевтических агентов для лечения фраксопатий.

Научная новизна

В работе впервые показано, что соматическая экспансия повтора CGG у модельных мышей различна в различных органах и зависит от возраста. Предложена схема расчёта индекса соматической нестабильности для повтора CGG.

Впервые предложен подход молекулярно-цитогенетической визуализации ломкого сайта FRAXA с использованием двух зондов для флуоресцентной гибридизации *in situ*. Достоверность этого подхода подтверждена статистической значимостью отличий между пациентами и носителями нормального аллеля.

Подход использован для исследования большой выборки пациентов с подозрением на синдром ломкой X-хромосомы.

На основе данных локализации ориджинов репликации и выявленной недорепликации промоторной области гена *FMRI* предложена и обоснована модель, описывающая образование редких ломких сайтов хромосом, на примере сайта FRAXA,

Впервые исследовано влияние ромидепсина и вориностата, ингибиторов деацетилаз гистонов, на реактивацию гена *FMRI* в культуре клеток человека.

Теоретическая и практическая значимость исследований

Представленная работа имеет как теоретическую, так и практическую значимость.

Полученные данные о соматической нестабильности и природе ломкого сайта FRAXA значительно расширяют понимание механизмов развития заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, и могут быть использованы при разработке новых методов для диагностики и терапии этих заболеваний. Индекс соматической нестабильности может быть использован при клиническом обследовании пациентов для прогнозирования остроты симптомов и риска передачи увеличенного аллеля.

Разработанный подход для визуализации ломкого сайта FRAXA был успешно применен для диагностики пациентов, обратившихся в ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница №1». Всего обследовано более 200 пациентов из Новосибирской области.

Данные по влиянию ингибиторов деацетилаз гистонов на реактивацию гена *FMRI* вносят вклад в разработку методов лечения заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, и позволяют исключить неперспективные мишени при поиске подходящего препарата.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Соматическая экспансия повтора CGG наблюдается как у мышей, носителей премутации по гену *fmr1*, так и у пациентов с фраксопатиями. Уровень соматической экспансии отличается в различных органах и тканях и не зависит от уровня репликации и транскрипции локуса.

2. Визуализация ломкого сайта FRAXA с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации с последовательностями генов *FMR1* и *GPR50* после обработки клеток 5-фтордезоксидурином позволяет достоверно выявлять этот ломкий сайт и может быть использована для диагностики синдрома ломкой X-хромосомы.

3. В промоторной области гена *FMR1* В-лимфоцитов человека расположена зона активации репликации, представленная тремя ориджинами репликации. В клетках с полной мутацией подавлена активность основного ориджина, что является причиной ломкости хромосом в сайте FRAXA. Таким образом, этот ломкий сайт не является артефактом, а представляет собой результат недорепликации участка хромосомы.

4. Ингибиторы деацетилаз гистонов не могут являться реактиваторами экспрессии гена *FMR1* и рассматриваться как потенциальные терапевтические агенты для борьбы с синдромом ломкой X-хромосомы.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на следующих конференциях:

1. 13-я Международная конференция по ломкой X-хромосоме (13th International Fragile X Conference), 25-29 июля, 2012 (Майами, США).

2. Научная конференция «Фундаментальные науки – медицине: Актуальные проблемы молекулярной медицины», 16-20 сентября, 2013 (Новосибирск).

3. Международная конференция «Хромосома 2015», 24-28 августа, 2015 (Новосибирск).

4. Международная конференция Европейской молекулярно-биологической лаборатории: Персонализированная медицина (EMBL/Stanford Conference: Personalized Health), 16-19 ноября, 2015 (Гейдельберг, Германия).

5. 12-й Международный конгресс по клеточной биологии (12th International Congress of Cell Biology), 21-25 июля, 2016 (Прага, Чехия).

6. 50-я конференция Европейского общества генетики человека (50th European Society of Human Genetics Conference), 27-30 мая, 2017 (Копенгаген, Дания).

7. Международная конференция «Хромосома 2018», 20-24 августа, 2018 (Новосибирск).

8. 52-я конференция Европейского общества генетики человека (52th European Society of Human Genetics Conference), 15-18 июня, 2019 (Гётеборг, Швеция).

9. 53-я конференция Европейского общества генетики человека (53th European Society of Human Genetics Conference), 6-9 июня, 2019 (виртуальная).

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертационной работы опубликовано 20 статей в изданиях, включенных в перечень ВАК ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук.

Личный вклад автора

Постановка задач, планирование экспериментов, написание научных трудов выполнено автором лично. Большая часть молекулярно-генетических исследований проведена автором лично, либо в составе коллектива. Исследования соматической нестабильности повтора CGG в промоторной области гена *FMRI* в тканях лабораторных мышей, культурах клеток и головном мозге человека, разработка подхода для визуализации ломкого сайта FRAXA и исследование

механизма образования этого сайта проведены в секторе хромосомных патологий ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН совместно с сотрудниками секции структуры гена и заболеваний Национального института диабета и заболеваний пищеварительной системы и почек Национальных институтов здоровья (NIDDK, NIH, США) д-р. К. Асдин, д-р. Д. Кумари и Р.А. Локанга. В работе по анализу ориджинов репликации *in silico* принимала участие д-р. М.И. Аладжем.

Работы по сбору и анализу образцов пациентов с фраксопатиями проведены совместно с ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница №1». Клинический осмотр и отбор пациентов проведен врачами медицинскими генетиками д.м.н., проф. Максимовой Ю.В. и Шориной А.Р. Работы по фМРТ головного мозга пациентов проведены д.м.н., проф., член.-корр. РАН Тулуповым А.А. (ФГБУН Институт «Международный томографический центр» СО РАН). Все остальные молекулярно-генетические исследования проведены в секторе хромосомных патологий ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН и отделе геномных исследований ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора.

Представленное исследование на разных этапах поддержано грантами Российского научного фонда № 15-15-10001 и № 18-15-00099, а также грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 18-29-07033.

Автор выражает благодарность к.б.н. Дольскому А.А., к.б.н. Грищенко И.В., к.б.н. Лемской Н.А., Шитик Е.М. и всем сотрудникам сектора хромосомных патологий ФГБУН ИМКБ СО РАН и отдела геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора за неоценимую помощь в проведении молекулярно-биологических работ. Автор благодарен д.м.н., проф. Максимовой Ю.В., Шориной А.Р. (ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница №1») и д.м.н., проф., член.-корр. РАН Тулупову А.А. (ФГБУН Институт «Международный томографический центр» СО РАН) за плодотворное сотрудничество.

Также автор выражает благодарность д.б.н. Кочневой Г.В., д.б.н. Карпенко Л.И. (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) и д.б.н., проф. Дымшицу Г.М. (Структурное подразделение Новосибирского государственного университета – СУНЦ НГУ) за ценные советы и замечания при подготовке рукописи.

Автор выражает благодарность своему научному консультанту, чл.-корр. РАН, д.б.н., проф. Графодатскому А.С. за неоценимую помощь и советы при написании этой работы.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертация изложена на 249 страницах машинописного текста, включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение собственных исследований, заключение, выводы, список литературы, содержащий 466 работ отечественных и зарубежных авторов, приложения. Диссертация иллюстрирована 8 таблицами и 38 рисунками.

ГЛАВА 1. ЗАБОЛЕВАНИЯ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ЛОМКОЙ X-ХРОМОСОМОЙ: ХАРАКТЕРИСТИКА, ДИАГНОСТИКА И ТЕРАПИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Введение

В начале 90-х годов XX века был открыт особый тип мутаций, вызывающих ряд генетических заболеваний человека – экспансия повторенных микросателлитных последовательностей. На сегодняшний день известно более 30 заболеваний, причиной которых является экспансия повторов. Примерами таких заболеваний являются синдром ломкой X-хромосомы (синдром Мартина-Белл), миотоническая дистрофия, болезнь Хантингтона и др. При синдроме ломкой X-хромосомы происходит экспансия повторов CGG в 5' промоторную область гена *FMR1* и метилирование промотора, тем самым, нарушается экспрессия гена (Budworth, McMurray, 2013; Grishchenko et al., 2020). Этот синдром является самой распространенной причиной наследственной умственной отсталости у человека после синдрома Дауна и имеет множественные проявления, т.е. относится к системным заболеваниям. Высокая распространенность и социальная значимость синдрома Мартина-Белл делает актуальным комплексное изучение механизмов его развития и подходов для борьбы с этой патологией.

Далее в данной главе будут подробно рассмотрены: природа развития заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, методы их диагностики и исследования, направленные на поиск путей терапии.

1.2. Понятие фраксопатий

Заболевания, ассоциированные с ломкой X-хромосомой, также называемые фраксопатиями, – это три нейродегенеративных патологии: синдром ломкой X-хромосомы, синдром атаксии/тремора, ассоциированный с ломкой X-хромосомой и синдром первичной овариальной недостаточности, ассоциированный с ломкой X-хромосомой. Название «фраксопатии» происходит от английского термина

FRagile X (FRAX), обозначающего ломкий сайт, который образуется в некоторых случаях на X-хромосоме у носителей описываемых заболеваний (Pirozzi et al., 2011).

Причиной развития фраксопатий является экспансия повторов – быстрое и значительное увеличение тринуклеотидного tandemного повтора CGG в 5'-нетранслируемой промоторной области гена *FMRI* (Fragile X Mental Retardation 1), локализованного в X-хромосоме в районе Xq27.3 (D'Hulst, Kooy, 2009). В норме размер повтора не превышает 55 триплетов, при этом наиболее часто встречается повтор размером от 26 до 31 триплета (Толмачева, Назаренко, 2002; D'Hulst, Kooy, 2009). При таком размере повтора ген *FMRI* экспрессируется на нормальном уровне и синтезируется нормальное количество белка FMRP (рисунок 1).

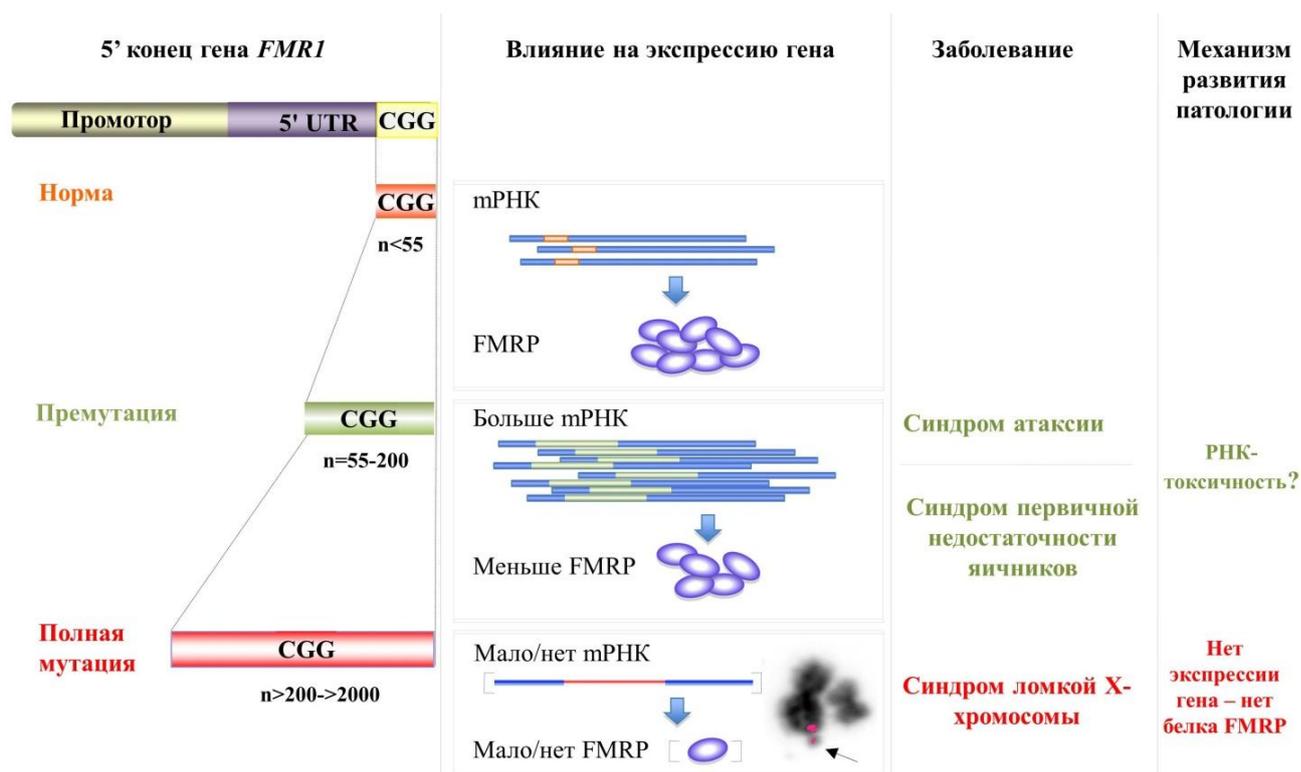


Рисунок 1. Аллели гена *FMRI* и их характеристики (по Kumari et al., 2012).

В норме в CGG повторе в качестве десятого, одиннадцатого, двадцатого и двадцать первого триплетов располагаются AGG вставки, которые присутствуют в 94% нормальных аллелей популяции. Отмечено, что при экспансии происходит

потеря этих вставок и, вероятно, это является одним из факторов, обуславливающих увеличение повтора. Важным свойством повтора CGG является его способность формировать нестандартные вторичные структуры, которые затем мешают метаболизму ДНК: транскрипции, трансляции и репликации. Вероятно, триплет AGG служит стабилизатором, ограничивающим формирование этих структур (Nolin et al., 2015). Пороговая длина повтора без прерываний, при котором он может сохранять стабильность, составляет 34 триплета CGG (Eichler et al., 1994). На рисунке 2 приведена диаграмма, показывающая риск экспансии при передаче в ряду поколений в зависимости от возраста матери и наличия AGG вставок.

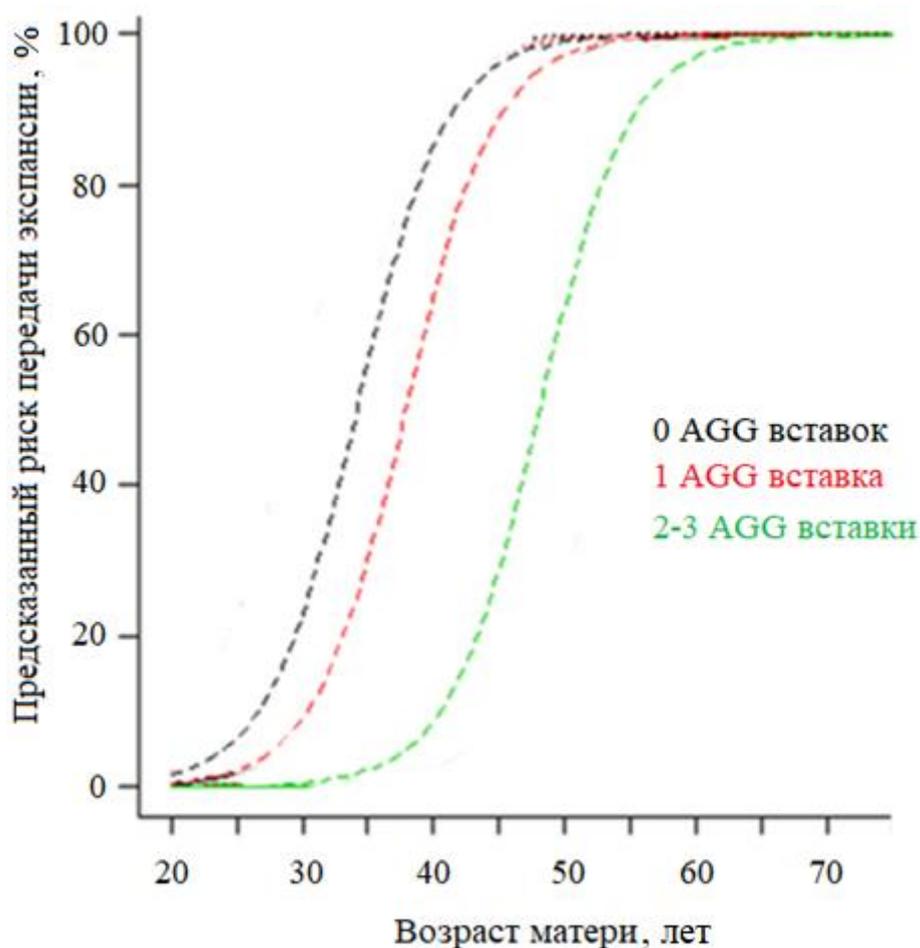


Рисунок 2. Предсказанные закономерности появления экспансии в ряду поколений. Наибольший риск передачи обнаружен у женщин в возрасте старше 40 лет, аллели которых не содержат AGG-вставок (по Yrigollen et al., 2014).

Результаты этих исследований предоставляют необходимую информацию для генетического консультирования женщин-носительниц премутантного аллеля и улучшения текущей методики прогнозирования передачи заболевания в ряду поколений.

Некоторые исследователи особо выделяют аллель, содержащий 45-55 повторов и называют его «серая зона», подразумевая, что при таком количестве повторов значительно повышается риск экспансии и вероятность перехода аллеля в премутацию при нормальной работе гена (Saldarriaga et al., 2014).

При увеличении размера повтора более 55 триплетов и до 200 формируется аллель, называемый премутацией (см. рисунок 1). Частота встречаемости такого аллеля составляет приблизительно 1/200 среди женщин и 1/400 среди мужчин (Tassone et al., 2007a). При этом в области увеличения повтора отсутствуют AGG вставки. При премутации часто происходит увеличение уровня экспрессии гена *FMRI*, но уровень белка FMRP снижается (см. рисунок 1). Причины такого изменения уровней экспрессии до сих пор не ясны, предполагается, что это может быть обусловлено РНК-интерференцией или РНК-токсичностью матричной РНК с увеличенным повтором (Saldarriaga et al., 2014).

При увеличении размера повтора более 200 триплетов формируется полная мутация. В случае полной мутации продолжается дальнейшая экспансия и размер аллеля может достигать нескольких тысяч повторенных единиц. В этом случае происходит гетерохроматинизация промоторной области гена *FMRI*, в которой локализован повтор, что в результате приводит к полному прекращению экспрессии (D'Hulst, Кооу, 2009) (см. рисунок 1).

При премутации развиваются два типа фраксопатий: синдром атаксии/тремора и синдром первичной недостаточности яичников (Pirozzi et al., 2011). У носителей премутации соответствующие синдромы формируются примерно в 20-25% случаев (Hagerman et al., 2004). Синдром атаксии/тремора характерен в основном для мужчин. У них с возрастом могут развиваться паркинсонизм и деменция, кроме

того, после 50 лет появляется мозжечковая атаксия, характеризующаяся нарушением координации движений. У женщин с синдромом атаксии/тремора когнитивные нарушения и деменция, как правило, не развиваются. В случае размера повтора от 90 триплетов и более в нервных клетках пациентов обнаруживаются включения, содержание мРНК гена *FMRI* и ряд РНК-связывающих белков. Вероятно, такие включения оказывают токсический эффект, при том, что сама мРНК гена даже в стократной концентрации таким эффектом не обладает. При крупных премутациях у мужчин также формируются внешние признаки, характерные для синдрома ломкой X-хромосомы (см. ниже в этом же разделе) при нормальном уровне IQ (Hagerman et al., 2004; Hoem et al., 2011).

У женщин при премутации и развитии синдрома первичной недостаточности яичников проявляется гипогонадотропный гипогонадизм и развивается ранняя менопауза до достижения 40 лет (Sullivan et al., 2011). Снижение функций яичников приводит к снижению фертильности (Allen et al., 2007). Дефицит эстрогена приводит к дополнительным клиническим проявлениям, таким как нарушениям функций эндотелия (Kalantaridou et al., 2004) и раннему началу ишемической болезни сердца (Atsma et al., 2006), раннему остеопорозу, а также повышенному риску уменьшения плотности костной ткани, что ведет к переломам костей (Gallagher, 2007). В результате этого увеличивается общая смертность, в частности от сердечно-сосудистых заболеваний (Mondul et al., 2005). Кроме того, женщины с нарушениями функций яичников чаще, чем в среднем по популяции, страдают тревогой, депрессией, чувствительностью, психологическими расстройствами (Stege et al., 2008).

Также при премутации у пациентов встречается ряд психиатрических проблем, которые не являются специфичными именно для этого аллеля и поэтому их ранее не относили к заболеваниям, ассоциированным с ломкой X-хромосомой. Тем не менее для их детального описания было предложено использовать термин нейропсихиатрические расстройства, ассоциированные с ломкой X-хромосомой (Fragile X-associated Neuropsychiatric Disorders) (Hagerman et al., 2018). Такие нарушения, как правило, развиваются в более раннем возрасте, чем синдром

атаксии/тремора и включает в себя ряд проблем, встречающихся на протяжении жизни. В первую очередь это синдром дефицита внимания и гиперактивность (Farzin et al., 2006), а также расстройства аутистического спектра, которые встречаются в том числе у детей, носителей премутации с частотой от 5 до 14% (Clifford et al., 2007; Chonchaiya et al., 2010). К нейропсихиатрическим нарушениям, ассоциированным с ломкой X-хромосомой, предложено отнести также тревожные расстройства (Cordeiro et al., 2015), депрессию (Roberts et al., 2009; Bourgeois et al., 2011; Seritan et al., 2013; Kenna et al., 2013), склонность к злоупотреблению психоактивными веществами (Loesch et al., 2012; Schneider et al., 2013; Muzar et al., 2014), хронические боли и фибромиалгия (Lyoо et al., 2004; Coffey et al., 2008; Leehey et al., 2011; Bora et al., 2012; Lin et al., 2012), хроническая усталость (Griffith, Zarrouf, 2008; Bourgeois et al., 2009; Hamlin et al., 2011; Summers et al., 2014), нарушения сна (Bailey et al., 2008; Chonchaiya et al., 2010; Hamlin et al., 2011; Tentindo et al., 2018), аутоиммунные проблемы (Buskila, Sarzi-Puttini, 2008; Coffey et al., 2008; Winarni et al., 2012; Jalnapurkar et al., 2015). Выделение этих расстройств важно для ранней диагностики премутации, так как детей с подобными расстройствами ранее не тестировали на размер повтора CGG в локусе *FMR1*.

Премутантные аллели у человека возникают с определенной частотой из нормальных аллелей, и они склонны к дальнейшему увеличению в результате экспансии. Передача таких аллелей от отца приводит к незначительному увеличению экспансии, которая зависит от возраста отца. Передача премутантного аллеля по материнской линии приводит к более значительной экспансии и, соответственно, к большей выраженности симптомов в семьях с премутацией (Ashley-Koch et al., 1998; Tassone et al., 2007b).

При полной мутации развивается синдром ломкой X-хромосомы, также называемый синдромом Мартина-Белл в честь впервые описавших его Джеймса Пардона Мартина и Джулии Белл (D'Hulst, Кооу, 2009; Martin, Bell, 1943). Это наиболее распространенная форма наследственной умственной отсталости. Частота синдрома в популяции составляет около 1/4000 среди мужчин и 1/6000 среди женщин, и это значение варьирует в разных странах (D'Hulst, Кооу, 2009).

Интересный факт установлен в колумбийском городе Боливар, в котором частота встречаемости синдрома ломкой X-хромосомы была 1/38 среди мужчин и 1/100 среди женщин. Было установлено, что такая высокая частота обусловлена эффектом основателя (Saldarriaga et al., 2014). Главной особенностью синдрома является образование ломкого сайта FRAXA в районе Xq27.3, как результат недорепликации увеличенного CGG повтора (Yudkin et al., 2014). Клиническими признаками заболевания являются макроорхидизм при отсутствии эндокринной патологии, большая голова с широким лбом, длинное лицо, большие оттопыренные уши, дисплазия соединительной ткани и, как следствие, повышенная подвижность суставов и гиперэластичность кожи. В некоторых случаях возникает мышечная гипотония. Самым значимым клиническим признаком синдрома ломкой X-хромосомы является умственная отсталость с низким IQ и неспособностью к обучению. Оценка речи показывает упрощенность фразообразования и многочисленные ошибки в артикуляции (Garber et al., 2008). У некоторых детей в раннем возрасте развивается аутизм. Умственная отсталость может варьировать от умеренной до тяжелой с ярко выраженным дефицитом кратковременной памяти, внимания, исполнительности, зрительно-пространственного воображения, способности к арифметическим вычислениям. В клинической практике описаны и исключения: примерно 15% мужчин и 70% женщин с полной мутацией имеют IQ выше 70. Такой уровень интеллекта выявлен у больных, у которых сохранился небольшой уровень экспрессии гена *FMR1* (D'Hulst, Кооу, 2009). Эти данные свидетельствуют о том, что степень тяжести заболевания прямо зависит от длины участка CGG повтора и усугубляется при его увеличении (Fu et al., 1991). Полное подавление экспрессии гена *FMR1* связано с изменениями в структуре хроматина в районе экспансии тринуклеотидного повтора (Tabolacci, Chiurazzi, 2013).

Следует отметить существование небольшого числа случаев синдрома ломкой X-хромосомы без экспансии повторов. Они обусловлены миссенс-мутациями, небольшими делециями, интронами, а также вариантами, где с участка 3'-UTR мРНК происходит трансляция (Collins et al., 2010). Например, миссенс-мутация – Pе304Asn (I304N) была обнаружена у пациента с тяжелым проявлением синдрома.

Взаимосвязь такой мутации и заболевания также подтвердилась на модельных мышах, которые несли данную замену в гене *fmr1* и обладали всеми проявлениями синдрома. У таких животных измененный FMRP потерял способность связывать РНК, и его экспрессия была снижена, особенно при формировании синапсов головного мозга в первые месяцы после рождения (Zang et al., 2009).

Еще более редкими являются случаи полной мутации с отсутствием метилирования промотора гена *FMR1*. Было зафиксировано всего несколько таких случаев, и носители такого варианта гена, как правило, не проявляют признаки снижения интеллекта (Tabolacci et al., 2008b). У таких пациентов была экспрессия гена, хотя ее уровень и отличался от нормального (Pietrobono et al., 2005; Tabolacci et al., 2008b).

1.3. Эпигенетические изменения в гене *FMR1* при экспансии повторов

Один из важных аспектов патогенеза фраксопатий – это изменение структуры хроматина в области экспансии повторов и в прилежащих районах. Именно тип хроматина определяет уровень экспрессии гена. Активный или неактивный хроматин формируется на основе ковалентных модификаций гистонов (Разин, 2007), и изменение последовательностей ДНК часто приводит к смене типа хроматина. Например, при атаксии Фридрейха экспансия повтора GAA в гене фратаксина приводит к гетерохроматинизации локуса этого гена (Chan et al., 2013). Увеличение числа копий GC-богатого микросателлита IV коровы также приводило к гетерохроматинизации (Сучкова и др., 2004).

Аналогично при экспансии повторов происходит два значительных эпигенетических события: метилирование ДНК и модификация гистонов. В норме CGG повтор каждые 9-11 триплетов прерывается AGG вставками. Эти последовательности определяют стабильность повтора и обеспечивают правильную упаковку ДНК на нуклеосомах. Экспансия повторов приводит к утрате AGG вставок, что увеличивает риск дальнейшей экспансии, а также нарушает

структуру нуклеосом (Willemsen et al., 2011; Lokanga et al., 2013; Volle, Delaney, 2013).

Исследования С.П. Чандлера с соавторами (Chandler et al., 2003) показали, что увеличение длины CGG повторов приводит к нарушению экспрессии прилегающих последовательностей. Так, в экспериментах на ооцитах шпорцевой лягушки выяснилось, что экспрессия, регулируемая промотором герпесвируса, зависит от длины встроенного в плазмиду CGG повтора. Повтор длиной 27 триплетов считался нормой. Увеличение длины повтора до 70 триплетов снижало транскрипцию на 25%, а увеличение длины повтора более 100 триплетов снижало транскрипцию на 90%. При этом не происходило метилирования плазмиды. Однако ингибирование транскрипции наблюдали только после формирования нуклеосомных структур, что подчеркивает важную роль хроматина в регуляции экспрессии генов при экспансии повторов (Chandler et al., 2003). Влияние экспансии CGG повторов на экспрессию гена *FMR1* важно отметить потому, что экспансия начинается еще на этапе эмбрионального развития и детектируется уже на 17-й день эмбриогенеза (Malter et al., 1997).

Важной характеристикой ДНК является уровень ее метилирования, так как за счет этого повышается информационная емкость. Регулируют метилирование ферменты – ДНК-метилтрансферазы, которые пришивают метильные остатки преимущественно по CpG-островкам. Всего в геноме человека около 3×10^7 остатков метилцитозина (Bakker et al., 2000). Метилирование гена *FMR1* осуществляется в границах от 650 до 800 нуклеотида. Эта локализация не отличается между различными типами клеток и не зависит от пола и возраста. Более того, она совпадает с локализацией границ метилирования у мыши, несмотря на гомологию этого участка менее 50% с человеком. Специфичные хроматиновые структуры отделяют эту область от зоны неметилированного промотора гена и не позволяют гиперметилированию распространяться. При синдроме ломкой X-хромосомы и экспансии повторов эти границы теряются, и метилирование распространяется на промоторную область (Naumann et al., 2009). Исследование метилирования промоторной области гена *FMR1* с помощью МАЛДИ (матрично-

активированная лазерная десорбция/ионизация) масс-спектрометрии позволило выявить две области метилирования, названные FREE1 и FREE2 (fragile X-related epigenetic element). Установлена отрицательная корреляция уровня метилирования этих участков и экспрессии гена *FMRI*. Кроме того, район FREE1 который метилирован только у носителей полной мутации и не метилирован в случае нормального аллеля или премутации имеет высокую диагностическую значимость (Godler et al., 2010). Однако необходимо учитывать, что существуют очень редкие единичные случаи носителей полной мутации с неметилованным промотором и нормальным уровнем IQ и экспрессии гена (Tabolacci et al., 2008b).

Второй важный аспект модификаций хроматина при экспансии повторов – это изменение состава гистонов и негистоновых белков (Grewal, Moazed, 2003). Эухроматин и гетерохроматин имеют свои наборы ковалентных модификаций гистонов. Наиболее значимые из них это ацетилирование и метилирование аминокислотных остатков в консервативных N-областях гистонов H3 и H4. Повышение уровня ацетилирования соответствует активной транскрипции. В гетерохроматине гистоны почти всегда гипoaцетилированы (Grewal, Moazed, 2003; Шацких, Гвоздев, 2013). При экспансии повторов происходит гетерохроматинизация не только за счет метилирования ДНК, но и за счет ковалентных модификаций гистонов.

При экспансии повторов в первую очередь происходит нарушение нуклеосомной структуры. Ацетилирование гистонов H3 и H4 отсутствует в районе промотора гена *FMRI*, снижено метилирование гистона H3 по лизину 4 (H3K4), гистон H3 диметилован по лизину 9 (H3K9me2) и триметилован по лизину 27 (H3K27me3), а гистон H4 триметилован по лизину 20 (H4K20me3). Метилирование гистона H3 по лизину 4 является консервативным маркером активного эухроматина, а метилирование лизина 9 – это маркер гетерохроматина. Таким образом, вся эпигенетическая структура промоторной области гена *FMRI* при экспансии повторов накапливает маркеры гетерохроматина (Coffee et al., 1999; Coffee et al., 2002; Wang, 2006; Kumari, Usdin, 2010). Расположение модифицированных гистонов в промоторной области гена неравномерно. Так

H3K9me₂ и H3K27me₃ равномерно распределяются по промоторной области и району первого экзона, в то время как H3K9me₃ и H4K20Me₃ локализованы строго в районе увеличенного повтора. Это указывает на распространение сигнала гетерохроматинизации именно от увеличенного повтора (Kumari, Usdin, 2010).

Но сигналом к модификации гистонов служит именно метилирование ДНК. Это подтверждается экспериментом, в котором клетки с полной мутацией обрабатывали 5-азадезоксцитидином (5-azadC) – ингибитором ДНК метилтрансфераз, что приводило к деметилированию ДНК в районе гена *FMRI*, возобновлению экспрессии гена и увеличению ацетилирования гистонов H3 и H4 (Chiurazzi et al., 1998; Chiurazzi et al., 1999; Coffee et al., 1999).

Ацетилирование гистонов – это обратимый процесс, который регулируется двумя ферментами противоположного действия – гистоновыми ацетилтрансферазами и деацетилазами, которые могут работать в составе белковых комплексов с факторами транскрипции (Yang, Seto, 2003). Модификации гистонов определяют патогенез не только синдрома ломкой X-хромосомы, но и других фраксопатий. Например, сверхэкспрессия трех гистоновых деацетилаз, HDAC3, 6 и 11, приводила к снижению нейродегенерации в модели синдрома атаксии тремора – линии Uas-(CGG)₉₀eGFP *Drosophila*. Также ингибиторы гистоновых ацетилтрансфераз увеличивали продолжительность жизни модельных мух (Todd et al., 2010).

В редких случаях полной мутации и неметилированного промотора наблюдается экспрессия гена, при этом уровень метилирования лизинов 4 и 27 в гистоне H3 не отличается от такового у людей с нормальным размером повтора и соответствует эухроматину. Однако ацетилирование гистонов H3 и H4 и метилирование лизина 9 в гистоне H3 соответствуют гетерохроматину, но, по-видимому, не являются определяющими экспрессию гена (Tabolacci et al., 2008b).

Еще одной особенностью хроматина при увеличенном повторе является появление фосфорилированных гистонов γ H2AX, которые характерны для двуцепочечных разрывов ДНК. И особо следует отметить CGG связывающий белок CGGBP1, взаимодействующий с повторами в 5'-нетранслируемой области

гена *FMRI* (Deissler et al., 1996; Muller-Hartmann et al., 2000). Впервые этот белок был описан в 1990 году как фактор, специфически связывающий CGG повтор в 5'-UTR гена *BCR* (Zhu et al., 1990). Он имеет аффинность как к двуцепочечным, так и к одноцепочечным участкам ДНК, несущим повтор CGG (Richards et al., 1993). Этот белок связывается с различными участками, например, с короткими плечами акроцентрических хромосом человека, несущими гены рРНК, которые также содержат повторы CGG (Muller-Hartmann et al., 2000). CGGBP1 – это регуляторный белок с огромным числом функций, в частности, он выступает регулятором транскрипции, играет роль в клеточном цикле, метилировании ДНК, участвует в поддержании стабильности генома и т.д. В 5'-UTR гена *FMRI* белок CGGBP1 связывается только с неметилованной ДНК и может репрессировать транскрипцию. При этом наличие этого белка предотвращает метилирование CpG островков и конститутивный сайленсинг гена. Транскрипцию он регулирует в комплексе с фактором ZF5 (Deissler et al., 1996; Muller-Hartmann et al., 2000).

Кроме CGGBP1 был описан еще целый ряд белков, специфично связывающихся с повтором CGG и выделенных из ядерных экстрактов человека, мыши и клеток насекомых. К ним относятся белки XRCC5, XRCC6, WRN, CBF-A (HNRNPAB), UP1 и ZF5, которые участвуют в стабилизации, либо дестабилизации шпильки, формируемой повтором, регуляции транскрипции и взаимодействуют с ДНК полимеразой, влияя на репликацию и экспансию повторов (Zhu et al., 1990).

В регуляции транскрипции при взаимодействии с хроматином участвуют два фактора транскрипции – NRF1 и Sp1. Они могут связываться со специфическими сайтами в окружении гена *FMRI* и действуют как сильные активаторы транскрипции. NRF1 активирует многие гены, кодирующие РНК-связывающие белки, участвующие в транскрипции. Фактор Sp1 способен связываться с метилированной ДНК промотора гена *FMRI in vitro*, тем не менее, в клетках, несущих полную мутацию, этот фактор в промоторной области отсутствует. С таким аллелем связываются белок MeCP2 (метил-CpG-связывающий белок) и хроматин-ремоделирующий белковый комплекс Brahma. Вероятно, эти белки не позволяют фактору Sp1 связаться с промотором гена *FMRI* (Garber et al., 2006). Еще

один белок, регулирующий транскрипцию и связывающийся с промотором гена *FMR1*, это AP-2 α . У мышей, несущих молчащий аллель гена этого белка, экспрессия *fmr1* снижена в 4 раза (Lim et al., 2005). Определенный вклад в метилирование ДНК и гистонов в районе гена *FMR1* вносит РНК-интерференция. Так, малые РНК, полученные из мРНК этого гена, в комплексе RITS (RNA-induced initiator of transcriptional gene silencing) взаимодействуют с гомологичными ДНК в локусе мишени. Затем такой локус *de novo* подвергается воздействию ДНК-метилтрансферазы и/или гистон-метилтрансферазы (HMT), что вызывает метилирование 5'нетранслируемой области гена. В итоге происходит гетерохроматинизация и репрессия транскрипции гена *FMR1* (Jin et al., 2004).

1.4. Участие микроРНК в развитии фраксопатий

Значительные различия в симптоматике заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, отражают механизмы патогенеза данных заболеваний. В случае синдрома ломкой X-хромосомы механизм определяется отсутствием белка FMRP (Pieretti et al., 1991), в то время как при синдромах, связанных с премутацией, патогенез определяется изменениями в уровнях мРНК гена *FMR1* и белка FMRP (Tassone et al., 2007b). Одна из причин развития синдромов, ассоциированных с премутацией, – это механизм «приобретения функции» (gain of function) (Tassone et al., 2004). В этом случае уровень мРНК гена *FMR1* превышает нормальный уровень, в результате чего избыточная РНК связывается с белками в ядре. Район увеличенного CGG повтора в мРНК связывается с CGG-связывающими белками, в результате чего формируются включения, тем самым эти белки исключаются из клеточных процессов и нарушается их функция (Deissler et al., 1997). Эти включения содержат такие белки, как Sam68 и DGCR8, которые участвуют в сплайсинге и транспорте матричных РНК, а также в процессах созревания ряда микроРНК (Sellier et al., 2013). Другая причина развития синдромов, связанных с премутацией, – это нарушения путей регуляции микроРНК. На сегодня появляется большое количество данных, указывающих на то, что микроРНК вовлечены в развитие фраксопатий (Zongaro et al., 2013). Такие микроРНК можно разделить на

две группы. Первая группа – это микроРНК, которые взаимодействуют непосредственно с белком FMRP. Так, FMRP, взаимодействуя с miR-125b, подавляет экспрессию белка NR2A, который является субъединицей рецептора NMDA, влияющего на синаптическую пластичность (Edbauer et al., 2010). FMRP и miR181d совместно регулируют элонгацию аксонов через подавление трансляции Map1, белка, связанного с микротрубочками и Calm1, участвующего в кальциевой сигнализации. После стимуляции фактором роста Map1 и Calm1 высвобождаются из гранул, подавленных FMRP и miR181d, и принимают участие в трансляции во время удлинения аксона (Wang et al., 2015). Вторая группа микроРНК – это молекулы, непосредственно взаимодействующие с мРНК гена *FMR1*, уровень которых изменяется в ответ на изменение активности гена. Первичная мишень для таких микроРНК – 3' конец матричной РНК различных генов (Bartel, 2004). Поскольку каждая микроРНК может быть нацелена более чем на один ген, нарушение их количества в ответ на изменение экспрессии отдельного гена может приводить к нарушению регуляции экспрессии других генов, которые являются мишенью для данной микроРНК, что приводит к развитию заболеваний с множественными симптомами (Reddy, 2015). В мышинной модели синдрома атаксии/тремора, ассоциированного с ломкой X-хромосомой, участок 3'-UTR мРНК гена *fmr1* комплементарен микроРНК miR-101, miR129-5p и miR-221, которые экспрессируются в нервной ткани. У таких мышей экспрессия miR-221 снижена в нервной ткани на 40% по сравнению со здоровым контролем. Также сверхэкспрессия этой микроРНК в фибробластах пациентов с синдромом атаксии/тремора приводила к достоверному снижению мРНК гена *FMR1* (Zongaro et al., 2013). Предполагается, что miR-130b является регулятором экспрессии *fmr1* и отвечает за дифференцировку клеток-предшественников нейронов (Gong et al., 2013).

Интересно отметить исследование микроРНК при фраксопатиях, в котором клеточные линии были поделены на группы, не исходя из их генотипа, как это принято. Разделение было сделано на основе соотношения уровней экспрессии мРНК гена *FMR1* и количества белка FMRP. По структуре 3'-UTR мРНК этого гена

были отобраны 8 микроРНК, которые проявляли какую-либо биологическую активность в головном мозге: hsa-miR-182-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-410-3p и hsa-miR-302a-3p. Уровень большинства выбранных микроРНК снижается во всех группах клеток с изменением активности гена *FMR1* относительно контрольной линии. Только hsa-miR-182-5p значительно повышала экспрессию в группе клеток, полученных от пациентов с полной мутацией с полностью отсутствующей экспрессией гена *FMR1*. Максимальные отличия от нормы в уровне экспрессии различных микроРНК характерны для клеточной линии с неметилированной полной мутацией, в которой сохранился некоторый уровень экспрессии гена *FMR1*. В эксперименте с использованием модельных плазмидных конструкций с репортерными белками было показано, что из всех исследованных микроРНК с 3'-UTR мРНК *FMR1* взаимодействует только miR-139-5p, которая потенциально может выступать диагностическим маркером фраксопатий (Dolskiy et al., 2021).

Таким образом, показано участие микроРНК в развитии фраксопатий. В частности, miR-182-5p участвует в развитии синдрома ломкой X-хромосомы при этом не связываясь с мРНК гена *FMR1*, а miR-139-5p является негативным регулятором активности этого гена при премутации. Очевидно, что число микроРНК, вовлеченных в регуляцию работы гена *FMR1*, либо микроРНК, экспрессия которых нарушается при фраксопатиях, значительно выше, что, вероятно, будет описано в дальнейших исследованиях.

1.5. Соматическая нестабильность повторов CGG и методы ее оценки

Мутантный и премутантный аллели гена *FMR1* являются нестабильными и склонными к дальнейшей экспансии. Особенно следует отметить увеличение размеров повторов в соматических клетках – соматическую экспансию. Это явление описано для многих заболеваний, связанных с экспансией повторов, на различных объектах: модельных животных и культурах клеток (Telenius et al., 1994; Tanaka et al., 1999; Manley et al., 1999; Chong et al., 2005; De Biase et al., 2007).

Особенностью мутации в данном случае является то, что образовавшиеся аллельные варианты не передаются следующему поколению, однако соматическая экспансия приводит к высокому соматическому мозаицизму. Самое важное последствие соматической экспансии – это обострение симптомов у носителя. Его впервые обнаружили в экспериментах на мышинных моделях болезни Хантингтона, кроме обострения симптомов отмечали их проявление в более раннем возрасте (Wheeler et al., 2003).

Исследование пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы показало высокий соматический мозаицизм по размеру аллелей. Как правило, у большинства обследованных индивидуумов представлено по крайней мере два аллеля. Среди пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы носителями одного аллеля являются менее 20% выборки (Nolin et al., 1994; Jiraanont et al., 2017). Мозаицизм по размеру повтора у пациентов развивается независимо от того, являются их матери мозаиками по этому признаку или нет. Например, были описаны два пациента со сходными мозаичными генотипами, при том, что их матери имели абсолютно разные мозаичный и не мозаичный генотип (Ferreira et al., 2013; Bonarrigo et al., 2014). Интересно отметить, что у носителей полной мутации очень часто в соматических клетках представлен нормальный аллель, однако это не приводит к формированию нормального фенотипа, а лишь к некоторому смягчению симптомов синдрома ломкой X-хромосомы. Появление нормального или премутантного аллеля у пациента с полной мутацией является результатом делеции повтора, либо уменьшением повтора в гаметах при родительской трансмиссии. Это можно наблюдать в клинических случаях. Например, описан случай носительницы большой премутации размером 190 триплетов CGG с двумя сыновьями. Один сын имел все симптомы синдрома ломкой X-хромосомы и полную мутацию, при этом второй сын не имел признаков синдрома и был носителем нормального аллеля длиной 43 CGG повтора с AGG вставками. В другом клиническом случае была представлена семья, в которой мать была мозаиком с генотипом 29, 160 и более 200 триплетов, при этом она имела здорового сына с CGG повтором длиной 19 триплетов (Tabolacci et al., 2008a; Manor et al., 2017). В целом, мозаицизм по

размеру CGG повторов отражается на степени проявления синдрома ломкой X-хромосомы или на остроте симптомов. Например, уровень IQ пациентов коррелирует с уровнем экспрессии гена *FMR1* и количеством белка FMRP в случае мозаичного генотипа при наличии некоторого количества экспрессирующихся нормальных аллелей. При этом у женщин-мозаиков симптомы значительно мягче, чем у мужчин-мозаиков с аналогичным генотипом (Pretto et al., 2014).

Интересно, что у пациентов, носителей премутации по гену *FMR1*, не наблюдается мозаицизма по длине аллеля в соматических клетках, таких как лейкоциты, клетки ворсинок хориона и амниоциты, т.е. соматической экспансии у них нет. В отличие от этого при полной мутации наблюдается значительный мозаицизм по размеру повтора CGG в тех же типах клеток. Кроме того, показана передача увеличенного аллеля по материнской линии от матерей с высокой соматической экспансией и отсутствие передачи по отцовской линии (Nolin et al., 2008). Степень соматической экспансии может значительно варьировать между различными тканями одного индивидуума. Так, при исследовании размеров повторов CGG в разных отделах головного мозга пациента с синдромом ломкой X-хромосомы было установлено, что в разных отделах присутствуют неметилированные аллели от премутации до полной мутации, однако в теменной доле и остальных тканях организма присутствовал только один аллель: метилированная полная мутация (Taylor et al., 1999).

Изначально полагалось, что соматический мозаицизм по размеру повтора CGG представлен дискретными аллелями, например, премутация и полная мутация. Однако развитие методов анализа, в частности фрагментный анализ позволили установить, что соматический мозаицизм у многих индивидуумов связан с представленностью большого количества аллелей, которые отличаются друг от друга на один триплет (Zhao et al., 2015). Аналогичная картина мозаицизма наблюдается у людей с другими экспансионными заболеваниями и в мышечной модели заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой (Lokanga et al., 2013). Молекулярное моделирование показало, что такой тип мозаицизма формируется благодаря небольшим, но очень частым событиям экспансии или

сокращения повторов, которые аккумулируются в течение жизни (Mollersen et al., 2010). На мышинной модели установили, что частота и степень таких событий зависит от типа клеток и тканей. Также аналогичный мозаицизм обнаружен при болезни Хантингтона и миотонической дистрофии I типа (Monckton et al., 1995; Wong et al., 1995; Pinto et al., 2020). Степень такой экспансии зависит от длины повтора, а также большого числа различных генетических факторов. Кроме того, степень экспансии влияет на возраст, при котором начинается заболевание, и на тяжесть заболевания (Wong et al., 1995; Tassone et al., 2007a; Veitch et al., 2007; Bettencourt et al., 2016; Morales et al., 2016; Cumming et al., 2018; Ciosi et al., 2019; Flower, 2019; Genetic Modifiers of Huntington's Disease (GeM-HD) Consortium, 2019; Kim et al., 2020; Morales et al., 2020).

Степень соматической нестабильности и соматический мозаицизм отличаются у разных пациентов, в связи с чем возникает необходимость количественной оценки этих параметров. Такая оценка позволяет понять какой вклад они вносят в формирование фенотипа. Впервые метод такой оценки был предложен для обсчета результатов фрагментного анализа размера повторов у пациентов с болезнью Хантингтона (Lee et al., 2010). Из распределения размеров аллелей выбирается наиболее высокий пик (рис. 3), который считается основным аллелем. Все пики, которые по высоте составляли менее 20% от максимального пика, считаются фоном и не учитываются при анализе. Высоту всех учитываемых в анализе пиков нормализуют по сумме высот всех пиков. Индекс соматической нестабильности рассчитывается как сумма нормализованных высот пиков. Этот подход изначально казался достаточно удобным и был использован для расчета соматической нестабильности при различных экспансионных заболеваниях (Hubert et al., 2011; Lokanga et al., 2013; Pinto et al., 2013; Mollersen et al., 2016).

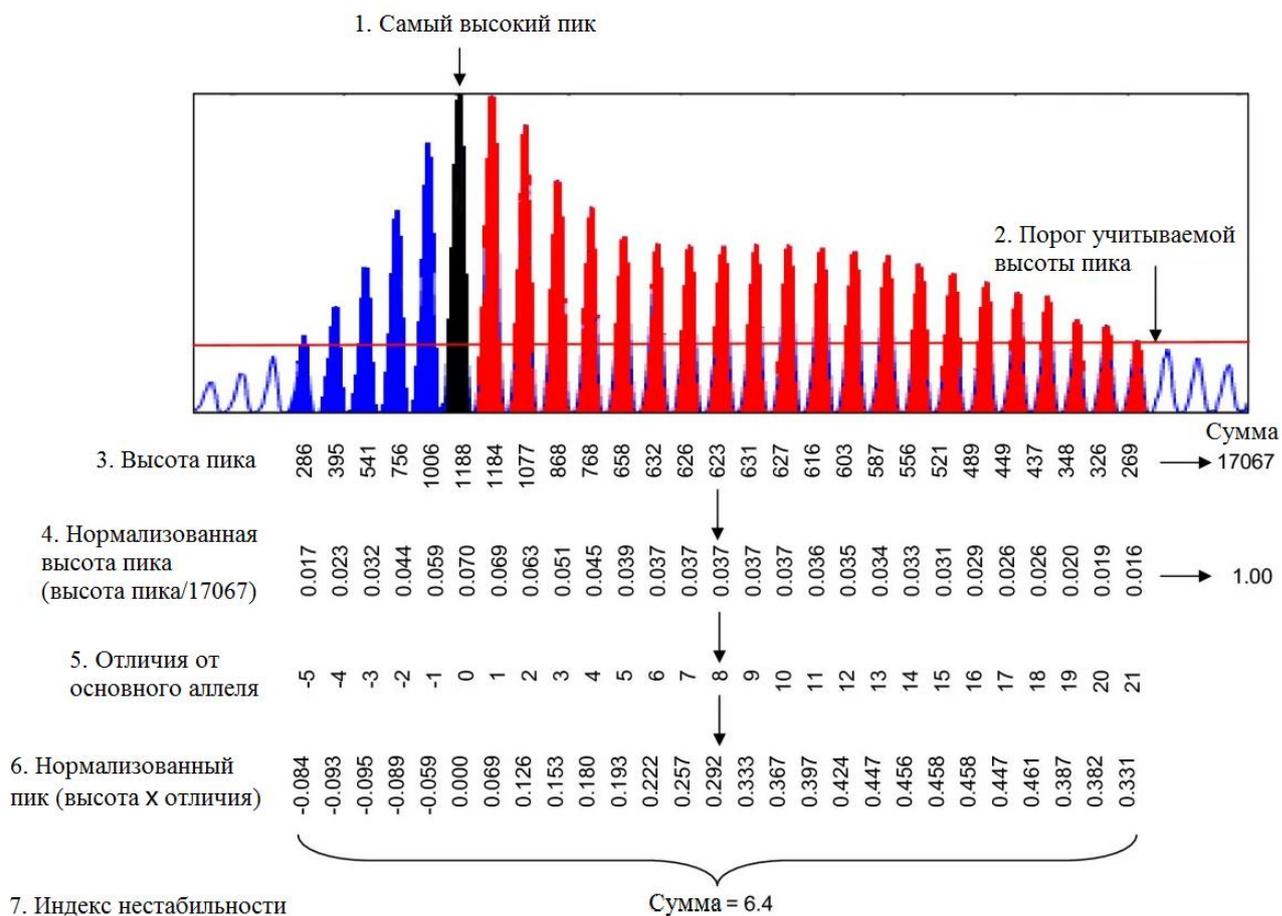


Рисунок 3. Методика расчета индекса соматической нестабильности у пациентов с болезнью Хантингтона (Lee et al., 2010). Пояснения в тексте.

Второй используемый в разных работах метод оценки соматической нестабильности основан на small-pool ПЦР. Он заключается в последовательном сильном разведении ДНК матрицы, чтобы получить как можно меньше копий на реакцию, с последующим определением размеров повторов в отдельных реакциях. Этот метод используется для оценки мозаицизма не только тринуклеотидных повторов, но и любых других микросателлитов (Monckton et al., 1995; Lokanga et al., 2013; Morales et al., 2020).

Оба подхода основаны на полимеразной цепной реакции, эффективность которой зависит от типа и длины повтора. Метод, основанный на определении основного пика по его высоте, не должен зависеть от эффективности ПЦР и, таким образом, может быть применим только для легко амплифицируемых аллелей. Таким образом, соматическую нестабильность GC-богатого и трудно

амплифицируемого CGG повтора невозможно оценивать с помощью такого подхода. В данном случае самый высокий пик будет относиться к легко амплифицируемому более короткому аллелю, что и было показано нами (см. 3.6.). Метод small-pool ПЦР позволяет лишь обнаружить мозаицизм, но не позволяет провести его количественную оценку. Также следует отметить, что при исследовании соматической экспансии трудность представляет отсутствие сведений об исходном размере повтора (Jin et al., 2003), поэтому корректно говорить именно о мозаицизме, а не экспансии, так как нельзя исключать случаев сокращения аллеля.

Особо стоит отметить подход к оценке соматической нестабильности повтора CGG у женщин, так как у них X-хромосома представлена двумя копиями, и соматическая экспансия чаще всего происходит в не инактивированной хромосоме. Для оценки соматической нестабильности в этом случае применяется два подхода. Поскольку измерение касается активной X-хромосомы, пик №1 (P1), который представляет самый маленький аллель, считается исходным унаследованным аллелем. В этом случае первый подход для определения экспансии заключается в определении $\Delta Rpts = P2 - P1$, где P2 это модальный увеличенный аллель (пик №2), а P1 это исходный аллель. Вторым подходом – это модификация вышеописанного метода по самому высокому пику. Здесь также выявляли P1 и P2 и пороговое значение величины пика как 0,2 RFU, после чего строили гистограмму. Для расчета дисперсии пика №2 брали аллели справа от него, а для пика №1 слева от него. Для расчета доли нестабильных аллелей использовали площади под кривой стабильных аллелей (SA – stable area) и нестабильных аллелей (UA – unstable area). В этом случае доля нестабильных аллелей определяется как $AUC2 = \frac{UA}{UA+SA}$, а доля стабильных аллелей как $AUC1 = 1 - AUC2$ (Hwang et al., 2022). Данный подход был использован для популяционного исследования соматической нестабильности повтора CGG в гене *FMRI* у 426 женщин, носительниц премутации. У большинства из них выявлена соматическая нестабильность исследуемого повтора в образцах крови. Еще раз было подтверждено, что степень экспансии зависит от первоначального размера повтора, количества AGG вставок и возраста женщины.

Это согласуется с выводом о том, что возраст матери влияет на риск передачи увеличенного повтора. Также еще раз была подтверждена повышенная экспансия именно на активной X-хромосоме, что подтверждает участие транскрипции в этом процессе. Особо следует отметить, что наличие только одной X-хромосомы у мужчин затрудняет такой анализ, так как невозможно выявить исходный унаследованный аллель (Hwang et al., 2022).

Интересно отметить также влияние других генетических факторов на нестабильность повторов. В частности, были описаны некоторые однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), которые влияют на соматическую экспансию. Например, SNP rs150393409, локализованный в гене *FAN1*, кодирующем нуклеазу FAN1, которая участвует в защите ДНК от экспансии у мышей с заболеваниями, ассоциированными с ломкой X-хромосомой (Zhao, Usdin, 2018a; Zhao et al., 2021). Этот SNP приводит к замене аргинина на гистидин в положении 507 белка FAN1, что, согласно компьютерному моделированию, приводит к нарушению структуры белка. Таким образом, влияние этого SNP согласуется с данными о функции FAN1. Кроме того, данные, полученные на большой выборке женщин, носительниц премутации, согласуются с данными, полученными на мышинной модели (Hwang et al., 2022).

Другой важный SNP, связанный с экспансией, – это rs701383, который локализован на расстоянии 8,77 т.п.н. от гена дигидрофолатредуктазы *DHFR* и 37,2 т.п.н. от гена *MSH3*. Продукт *MSH3* важен для репарации мисматчей и известно его участие в экспансии повторов CGG в мышинной модели заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой. С помощью базы данных GTEx (Genotype-Tissue Expression) SNP rs701383 определяется как eQTL (Expression quantitative trait loci), т.е. локус, отвечающий за количественные признаки, для гена *MSH3* в различных тканях, и ассоциирован с повышенной экспрессией этого гена. Также rs701383 является eQTL для гена *DHFR* в артериях и нервной ткани, но, например, в цельной крови ассоциации очень низкие. Этот SNP связан с более ранним началом болезни Хантингтона и соматической нестабильностью при

болезни Хантингтона и миотонической дистрофии I типа (Flower, 2019; Zhao, Usdin, 2015; Hwang et al., 2022).

1.6. Вероятные механизмы нестабильности CGG повторов

1.6.1. Общая характеристика нестабильности повторов

Риск экспансии CGG повторов в локусе *FMRI* напрямую связан с длиной повторенного тракта и имеет обратную зависимость от количества AGG вставок, которые чаще всего представлены на 5' конце тракта (Latham et al., 2014; Nolin et al., 2015; Nolin et al., 2019). В частности, у женщин, носительниц премутантного аллеля вероятность экспансии в 10 раз превышает вероятность сокращения, а при достижении повтором размера в 90 триплетов вероятность передачи следующему поколению уже полной мутации приближается к 100% (Nolin et al., 2015, Yrigollen et al., 2014). Полная мутация передается преимущественно по материнской линии. Однако меньшие по размеру аллели при передаче по отцовской линии склонны к экспансии в гаметах. Таким образом, меньшая степень экспансии характерна больше для передачи по отцовской линии, чем по материнской (Nolin et al., 1999; Nolin et al., 2015).

С того момента, как аллель приобретает длину полной мутации и становится метилированным, в нем прекращается экспансия (Glaser et al., 1999, Wohrle et al., 2001). Это также наблюдается в премутантном аллеле у женщин, где экспансия происходит только в активной X-хромосоме и прекращается в инактивированной (Zhao et al., 2019). Данное наблюдение свидетельствует о том, что для экспансии необходима либо транскрипция, либо эухроматиновое состояние хроматина. Профили экспансии, которые наблюдали в клетках крови у женщин, носительниц премутации, соответствуют результатам математического моделирования, которое указывает, что экспансия происходит короткими, на 1-2 повтора, но частыми увеличениями длины повторенного тракта (Mollersen et al., 2010). В отличие от этого, в клеточной культуре наблюдается быстрое изменение длины повтора (Zhou et al., 2016).

Изначальная гипотеза предполагала, что в основании как экспансии, так и сокращения повторов лежат одни и те же процессы. Однако экспериментальные данные говорят, что это не так. Например, замедление репликации под воздействием 5-фтордезоксифуридина в лимфобластной клеточной культуре пациентов, носителей премутации, приводит к сокращению повторов, но не к экспансии (Bjerregaard et al., 2018). Это выглядит так, как будто под воздействием репликативного стресса происходит отбор клеток с более коротким аллелем. Кроме того, в клеточной культуре сокращение неактивных мутантных аллелей, вероятно, не требует транскрипции, что отличает этот процесс от экспансии (Zhou et al., 2016). Также следует отметить, что в то время, как соматическая экспансия происходит за счет небольшого числа повторов на каждом шаге, сокращение, как правило, происходит за счет протяженных участков варибельной длины. AGG вставки также играют ключевую роль в подавлении передачи экспансии между поколениями, но в случае передачи сокращения повтора как по материнской, так и по отцовской линии они не играют никакой роли (Nolin et al., 2015).

1.6.2. Вероятный механизм экспансии повторов

На сегодня нет геномных данных, которые бы указывали на то, что какие-то конкретные факторы участвуют в экспансии повторов. Однако, экспансия при заболеваниях, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, имеет много общего с экспансией, связанной с другими локусами и другими заболеваниями. К таким сходствам относятся, например, небольшое число повторов, вовлеченных в каждый шаг экспансии, частота, которая зависит от транскрипции, и факт того, что экспансия происходит в неделящихся клетках. Как пример, экспансия, которая происходит в неделящихся нейронах полосатого тела у пациентов с болезнью Хантингтона, приводит к формированию повторов длиной несколько сотен единиц в течение жизни (Kennedy, Shelbourne, 2000). Исследования многих заболеваний, связанных с экспансией повторов, включая хорею Хантингтона, миотоническую дистрофию I типа и многие спиноцеребеллярные атаксии показали, что в экспансию повторов в соматических клетках вовлечены некоторые из белков

системы репарации мисматчей (Genetic Modifiers of Huntington's Disease (GeM-HD) Consortium, 2019; Massey, Jones, 2018). В частности, MSH3, MLH1 и MLH3 участвуют в развитии экспансии, в то время как, например, FAN1 выполняет функцию защиты генома от экспансии (Kratz et al., 2021). Те же самые белки играют роль как в развитии, так и в защите от экспансии как в соматических, так и в половых клетках нокин мышей, моделирующих премутантный аллель (Zhao et al., 2015, Zhao et al., 2016, Zhao, Usdin, 2018a, Zhao et al., 2018). Экспансия у пациентов с премутациями имеет ряд сходств с таковой у модельных мышей и с таковой у пациентов с другими экспансионными заболеваниями (Zhao et al., 2019, Lokanga et al., 2014a, Zhao, Usdin, 2018b). Нельзя исключить, что в делящихся и неделящихся клетках разные механизмы экспансии, но в мышинной модели экспансионных заболеваний одни и те же генетические факторы необходимы для экспансии повторов как в делящихся, так и в неделящихся клетках. Таким образом, по крайней мере в этой модели, механизмы экспансии одинаковые во всех клетках, в которых этот процесс наблюдается.

Белок MSH2, который связывается с MSH3 с образованием комплекса MutS β , также необходим для экспансии повторов в мышинной модели заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, в то время как MSH6, который связывается с MSH2 в комплексе MutS α , играет важную вспомогательную роль (Zhao et al., 2016; Lokanga et al., 2014b). Для экспансии необходима еще нуклеазная активность MLH3. Это интересно, так как роль MLH3 в мисматч репарации незначительна, однако он крайне необходим при мейозе, где участвует в процессинге структур Холлидея в продукты кроссинговера (Lipkin et al., 2002; Hayward et al., 2020; Cannavo et al., 2020). В дополнение к MLH3 для экспансии в мышинной модели необходимы белки репарации мисматчей PMS1 и PMS2 (Miller et al., 2020). Все три белка связываются с MLH1, формируя комплексы MutL α (MLH1/PMS2), MutL β (MLH1/PMS1) и MutL γ (MLH1/MLH3). Необходимость наличия всех трех элементов комплекса MutL непонятна, так как при репарации мисматчей они не действуют совместно. И наиболее непонятна роль именно MutL β , так как он хотя и представлен в гораздо большем количестве, чем MutL γ ,

для него неизвестна какая-либо определенная функция при репарации мисматчей, и у него отсутствует нуклеазная активность. Защитную роль FAN1 и EXO1, других нуклеаз, вовлеченных в репарацию мисматчей, можно объяснить конкуренцией за продукт расщепления MutL между каноническим путем мисматч репарации, который восстанавливает исходный аллель и альтернативным путем, который приводит к экспансии (Zhao et al., 2018).

Причина, по которой транскрипция необходима для экспансии, до сих пор неизвестна. Одна из первых гипотез, описывающих эту необходимость, была связана с проблемами транскрипции протяженного тракта CGG, которые могут решаться с помощью репарации, ассоциированной с транскрипцией (TCR), одним из базовых путей репарации ДНК, который ограничен районами синтеза РНК (Sweder, Hanawalt, 1993). Однако CSB, белок, необходимый для TCR, не участвует в экспансии повторов в мышинной модели (Zhao, Usdin, 2014; Zhao, Usdin, 2015).

Двухцепочечные разрывы могут образовываться в результате процессинга стабильных R-петель в локусе *FMRI* (Groh et al., 2014; Loomis et al., 2014; Kumari, Usdin, 2016; Abu Diab et al., 2018). В мышинной модели заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, негомологичное соединение концов защищает от экспансии через промежуточный продукт в виде двухцепочечного разрыва (Gazy et al., 2019). Однако прямое преобразование R-петли в двухцепочечный разрыв требует наличия белка CSB (Sollier et al., 2014, Teng et al., 2018).

R-петли могут служить триггером экспансии и другим образом. Например, одноцепочечный участок ДНК, представленный в R-петле, склонен к окислительному повреждению с образованием 8-оксо-7,8-дигидрогуанина (8-охоG), наиболее обычного продукта окислительного стресса. Как представлено на рисунке 4, такие повреждения могут быть исправлены путем эксцизионной репарации оснований, основного пути репарации таких повреждений в клетках млекопитающих. На левой части рисунка R-петля вносит свой вклад в экспансию, так как одноцепочечный участок R-петли подвергается окислительному повреждению. Репарация этого повреждения по пути эксцизионной репарации

оснований приводит к возможности проскальзывания и смещения цепей с образованием шпилек и петель на обоих цепях (Kovtun et al., 2007). Альтернативный вариант можно увидеть на правой части рисунка. Шпилька формируется на кодирующей цепи R-петли, с образованием S-петли. Это может способствовать образованию шпильки на матричной цепи после диссоциации транскрипта. Шпильки или двойные петли, образованные любым процессом, затем могут быть связаны обоими белками MutS. Это приводит к связыванию белков MutL α , MutL β и MutL γ . Расцепление цепи напротив шпильки с помощью MutL γ приводит к образованию двуцепочечного разрыва, который может быть исправлен на данный момент не понятно каким именно путем репарации двуцепочечных разрывов, не связанным с негомولوجичным соединением концов.

Проскальзывание/смещение цепей во время эксцизионной репарации оснований на протяженном участке может способствовать формированию шпилек, с которыми эффективно связываются MutS α и MutS β *in vitro* (Zhao et al., 2016). Роль эксцизионной репарации оснований также подтверждается фактом, что мутации в ДНК-гликозилазах OGG1 и NEIL1, которые необходимы для репарации 8-охоG, снижают экспансию у мышей, моделей болезни Хантингтона (Kovtun et al., 2007, Mollersen et al., 2012).

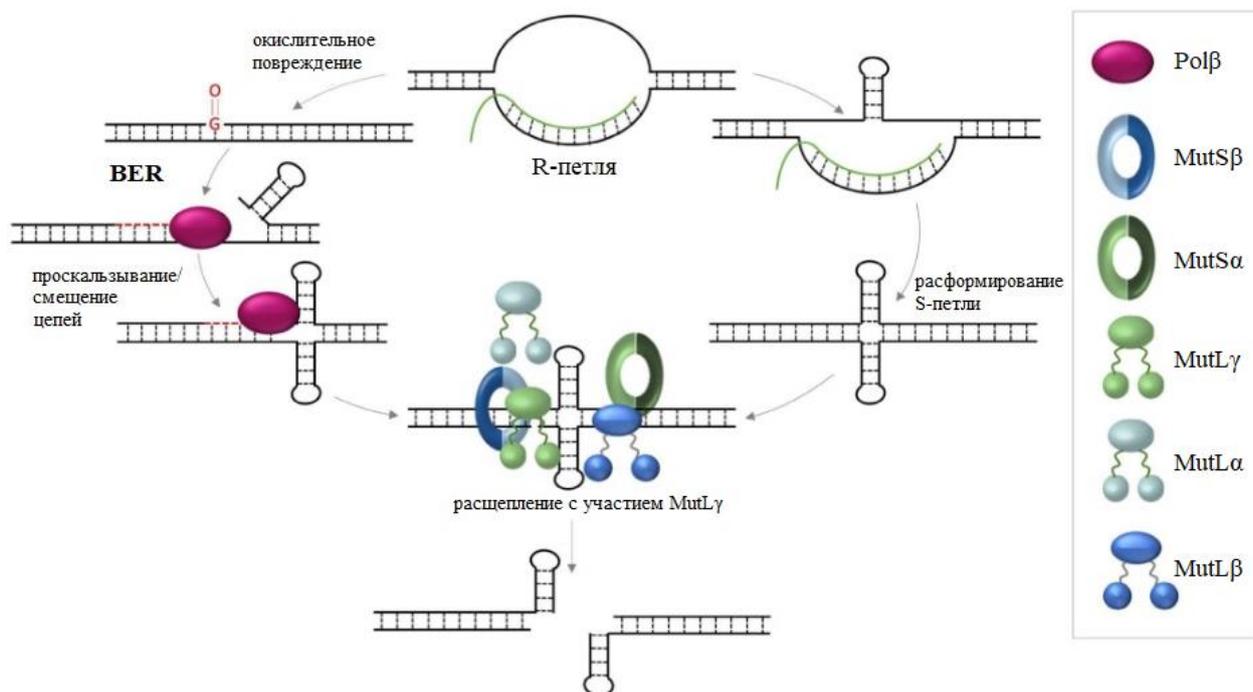


Рисунок 4. Предполагаемая схема мисматч репарации с участием транскрипции, которая приводит к экспансии повторов (по Hayward, Usdin, 2021).

Как видно из правой части рисунка 4, кодирующая цепь R-петли, сформированной в локусе *FMRI*, вероятно, формирует внутрицепочечные структуры в клетках пациентов (Loomis et al., 2014; Abu Diab 2018). Расформирование R-петли приводит к тому, что для матричной цепи нет комплементарной цепи, с которой можно образовать связи. Из-за этого образуется двойная петля, которая может связаться с MutS α и MutS β (Zhao et al., 2016). Расщепление с помощью MutL γ происходит на цепи, противоположной мисматчу (Kadyrova et al., 2020). Таким образом, процессинг двойной петли, сформированной либо в результате эксцизионной репарации оснований, либо в ходе транскрипции, проходит через образование двуцепочечных разрывов, репарация которых приводит к экспансии.

Репортерная конструкция с повтором CGG, интегрированная в геном клеток эритроидной лейкемии мышей, показала как экспансию, так и сокращение повторов с равной частотой. Эти события зависят от субъединицы POLD3 ДНК-полимеразы δ (Pol δ) и белков рекомбинации RAD51 и RAD52 (Kononenko et al.,

2018). Возможно, это связано с репликацией, индуцированной разрывом, с включением двух последних белков. Одноцепочечный 3'-конец, который образуется в результате разрыва внутри повторенного тракта, формирует повтор, который может потенциально отжигаться на второй хроматиде. Это приводит либо к экспансии, либо к сокращению повтора, в зависимости от того, где произошел отжиг: выше или ниже разрыва. Множественные переключения матрицы, которые происходят при репликации, индуцированной разрывом, могут также потенциально приводить либо к увеличению, либо к сокращению повтора. Хотя репликация, ассоциированная с разрывом, вовлечена в репарацию одноконцевых разрывов, возникающих при остановке репликативной вилки, предполагается, что она может быть индуцирована двуцепочечными разрывами, возникающими в R-петле (Cohen et al., 2020). Таким образом, процессы, связанные с репликацией, ассоциированной с разрывом, и индуцированные R-петлей, могут быть вовлечены в экспансию как в делящихся, так и в неделящихся клетках (Marnef, Legube, 2021).

Однако известно, что такая репликация зависит от белка CSB (Nakamori et al., 2020). Кроме того, такая репликация, ассоциированная с ломкостью хромосом в локусе FRAXA, зависит от нуклеазы SLX1/SLX4 для формирования одноконцевых разрывов (Garriga et al., 2020). Использование этой нуклеазы для индукции репликации, ассоциированной с разрывом, возможно исключает необходимость в нуклеазе MutLγ, которая формирует двуцепочечные разрывы разрезая R-петлю, например, у дрожжей (Su, Feudenreich, 2017). Возможно, такой гидролиз служит триггером экспансии повторов, опосредованной репликацией, ассоциированной с разрывом. Однако такой гидролиз не зависит от белка MutS, по крайней мере у дрожжей. Экспансия повтора CAG, опосредованная репликацией, ассоциированной с разрывом, у дрожжей также не зависит от белков MSH2, MSH3 и MSH6 (Kim et al., 2020).

В то время как у мышей потеря белков мисматч репарации, например, MSH3, приводит к почти полной остановке экспансии, у человека определенный уровень экспансии сохраняется через механизм, не зависящий от мисматч репарации. В частности, предполагается, что большое увеличение количества повторов,

ассоциированное с полной мутацией и унаследованное от женщины с премутацией, является результатом механизма, который приводит к этой крупной экспансии в виде единственного события. В роли такого механизма может выступать репликация, ассоциированная с разрывом (Kononenko et al., 2018). Однако экспансия, зависящая от репликации, ассоциированной с разрывом, в репортерной системе клеток эритроидной лейкемии мыши по своей частоте значительно ниже экспансии, наблюдаемой в мышечной модели заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой. Она составляет лишь порядка 30 повторенных единиц. На сегодня не установлено, может ли быть частота этих событий достаточной для объяснения больших экспансий в ооцитах человека при материнской передаче премутантного аллеля. Во всяком случае, сокращения в тех же клетках и в таких же условиях происходят с большей частотой и должны компенсировать экспансию (Kononenko et al., 2018).

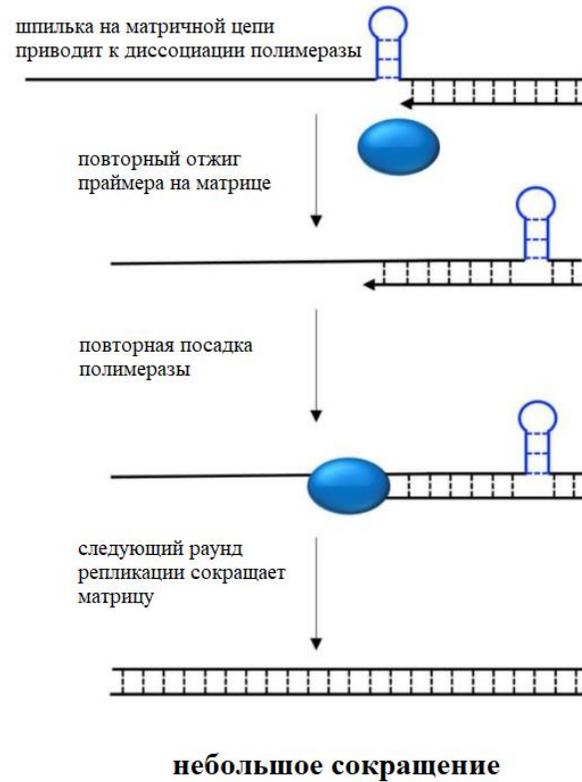
1.6.3. Вероятный механизм сокращения повторов

Если клетки носителей премутации выращивать в питательной среде в присутствии 5-фтордезоксифторуидина, то чаще наблюдают сокращение повторов, чем экспансию (Vjerregaard et al., 2018). Это может отражать трудность репликации через увеличенный повтор CGG – явление, которое усиливается при дефиците нуклеотидов в присутствии 5-фтордезоксифторуидина и, таким образом, преимущественно выживают клетки с уменьшенным повтором. Так, сперматоциты взрослого мужчины подвергаются большему числу раундов репликации, чем ооциты женщины такого же возраста (Goldmann et al., 2019). Таким образом, отбор клеток с сокращением повторов при репликации может объяснить, почему мужчины с премутацией не передают полную мутацию следующим поколениям, а также почему мужчины, имеющие полную мутацию в соматических клетках, в генеративных содержат премутацию (Reyniers et al., 1993).

Сокращение повторов может быть транскрипционно-независимым, так как это было показано для нетранскрибируемых мутантных аллелей (Hayward et al., 2019; Zhou et al., 2016). Более того, потеря белков мисматч репарации, необходимых для

экспансии, приводит к повышению сокращения повторов в мышинной модели заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой. Этот факт подтверждает идею, что экспансия и, по крайней мере, некоторые случаи сокращения повторов происходят по разным механизмам. Также интересен тот факт, что в клетках с нарушением мисматч репарации наблюдается особый класс сокращений повторов, заключающийся в потере 1-2 повторов. Такие сокращения наблюдаются в большой фракции аллелей в эмбриональных стволовых клетках мыши с нулевыми мутациями по MutL α или MutL γ (Miller et al., 2020). Такие небольшие сокращения могут быть результатом проскальзывания цепей, которое возникает в норме при репликации и легко репарируется по механизму мисматч репарации (рис. 5). Также это указывает на то, что в большинстве случаев проскальзывание цепей незначительно и большие сокращения повторов происходят по другому механизму.

А.



Б.

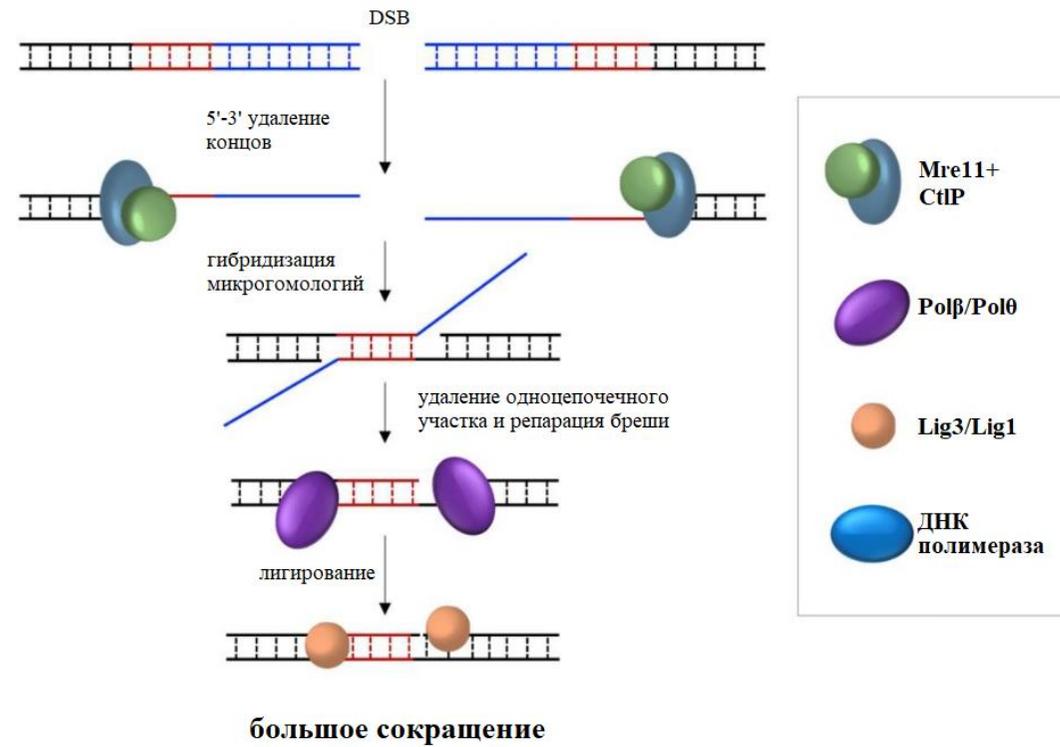


Рисунок 5. Предполагаемая схема сокращения/делеции повторов.

А. Проскальзывание цепей во время репликации может усиливаться образованием шпилек на матричной цепи. Образование новых затравок приводит к формированию более коротких дочерних цепей. Следующий раунд репликации идет с образованием более короткого аллеля. Б. Соединение концов по микрогомологии при репарации двуцепочечных разрывов индуцировано гидролизом концов для образования участка микрогомологии. После отжига этих микрогомогий следует удаление негомولوجичных участков, заполнение брешей, вероятно, ДНК-полимеразы Pol β и Pol θ , лигирование одной из лигаз Lig3 или Lig1 (по Hayward, Usdin, 2021).

Следует отметить, что большинство точек разрывов больших делеций у детей носителей полной мутации и премутации ассоциированы с микрогомологиями длиной 2-9 нуклеотидов (De Graaff et al., 1995; Hirst et al., 1995; Quan et al., 1995; De Graaff et al., 1996; Mila et al., 1996; Mannermaa et al., 1996; Schmucker et al., 1996; Gronskov et al., 1997; Grasso et al., 1999; Fan et al., 2005; Han et al., 2006; Luo et al., 2014; Goncalves et al., 2016; Tabolacci et al., 2020; Erbs et al., 2021). Эти микрогомологии являются маркерами процесса, который называется соединением концов, опосредованное микрогомологиями (microhomology mediated end joining – MMEJ). MMEJ включает в себя гидролиз концов в районе двуцепочечного разрыва с помощью Mre11 и CtIP (см. рис. 5Б), в результате чего образуются два коротких одноцепочечных фрагмента, внутри которых идет поиск гомологий, затем отжиг, удаление негомологичных участков, заполнение брешей и лигирование (Hayward, Usdin, 2021).

Разрывы с минимальным гидролизом могут приводит к делеции внутри повтора (сокращению повтора), в то время как более масштабный гидролиз приведет к большей делеции, включающей в себя фланкирующие районы. MMEJ часто сопровождается инсерцией нуклеотидов в сайтах разрывов. Эти инсерции часто происходят из прилегающих к разрыву последовательностей или возникают *de novo* из-за безматричного наращивания 3' концов разрывов. Такие инсерции создаются ДНК-полимеразой Pol θ , которая является основным ферментом MMEJ (Wyatt et al., 2016). Например, семинуклеотидная инсерция, ассоциированная с делецией, которая увеличивала последовательность с двух сторон от повтора, была описана у мальчика, мать которого являлась носителем полной мутации (Grasso et al., 1999). Также три примера формирования сайта *EagI*, ассоциированного с сокращением повтора, были описаны ранее (Tarleton et al., 2002; Cecconi et al., 2008; Tabolacci et al., 2008b). Поскольку сайтом рестрикции для *EagI* является последовательность CGGCCG он может возникать либо путем замены, либо путем инсерции триплета CCG. Аналогично описано появление сайта *SmaI* (CCCGGG) внутри повтора у мышей – моделей заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой. Вероятно, в основе данного процесса лежит аналогичный механизм

(Hayward, Usdin, 2021). Таким образом, ММЕJ и активность ДНК-полимеразы Pol θ являются потенциальной причиной формирования сокращения повторов или делеций у носителей полной мутации и премутации.

1.7. RAN-трансляция в локусе *FMRI*

При экспансии различных тринуклеотидных повторов часто встречается AUG-независимая трансляция, связанная с повторами (RAN – Repeat Associated Non-AUG translation). Она может приводить к образованию протяженных РНК, не относящихся к синтезу FMRP, с которыми связываются РНК-связывающие белки. AUG-независимая трансляция не участвует в клеточном метаболизме, но нарушает баланс регуляторных белков, что приводит к дисфункции клеток (Paulson, 2018). Также RAN-трансляция может приводить к образованию токсичных белков, которые накапливаются в нейронах пациентов и вызывают нейродегенерацию (Zu et al., 2011; Todd et al., 2013; Paulson, 2018).

RAN-трансляция, изначально описанная для повтора CAG в локусе *SCA8*, оказалась характерна и для других заболеваний, связанных с экспансией повторов. В частности, она была обнаружена при боковом амиотрофическом склерозе (локус *C9orf72*) и болезни Хантингтона (Zu et al., 2011). При этом мутация единственного старт-кодона, расположенного перед повтором, не отменяет трансляцию. Происходит инициация с трех разных рамок считывания, что приводит к образованию трех вариантов гомополимерного белка из глутаминовых, сериновых или аланиновых трактов. В этом случае инициация трансляции зависит от формирования повтором вторичных структур (Kozak, 1980; Kozak, 1986; Kozak, 1988; Kozak, 1990; Kozak, 1994; Peabody, 1987; Peabody, 1989). Показано, что уменьшение длины повтора или изменение его CG состава приводило к прекращению RAN-трансляции (Zu et al., 2011). При этом антисмысловые транскрипты также давали продукт RAN-трансляции, что было продемонстрировано, например, в случае гена *DMPK* (Zu et al., 2011).

Увеличенный повтор CGG в мРНК гена *FMRI* также транслируется в отсутствие старт-кодона AUG (Todd et al., 2013). Такая трансляция происходит со

всех трех рамок считывания с формированием гомополимерного полиглицинового белка (+1CGG RAN, FMRpoly(G)) с рамки считывания +1 относительно AUG FMRP, полиаланинового белка с рамки считывания +2 (+2CGG RAN, FMRpoly(A)), и полиаргининового белка с рамки считывания +0 (+0CGG RAN, FMRpoly(R)) (Todd et al., 2013; Kearse et al., 2016). Трансляция наиболее распространенного продукта RAN FMRpoly(G) включает открытую рамку считывания, которая заканчивается после стартового кодона FMRP (Todd et al., 2013). FMRpoly(G) накапливается во внутриядерных включениях пациентов с синдромом атаксии/тремора. RAN-трансляция CGG повтора в целом и FMRpoly(G), в частности, оказалась ассоциирована с токсичностью на большинстве модельных систем, и при этом именно FMRpoly(G) значительно повышает токсичность, а уменьшение его количества снижает токсичность у дрозофилы и лабораторной мыши (Todd et al., 2013; Sellier et al., 2017; Krans et al., 2019).

RAN-трансляция повтора CGG является кэп-зависимой во всех рамках считывания. При этом необходимо наличие именно m7G-кэпа, так как его замена на А-кэп, который не связывается с eIF4E, в модельной системе приводила к резкому снижению уровня RAN-трансляции (Kearse et al., 2016). Кроме того, для 5'-UTR гена *FMR1* характерен определенный уровень кэп-независимой трансляции, так как сама нетранслируемая область, вероятно, выступает в роли IRES (Internal Ribosome Entry Site – внутренний участок посадки рибосомы) (Dobson et al., 2008).

RAN-трансляция CGG повтора происходит в том числе и с повтора нормальной длины у человека (Todd et al., 2013; Kearse et al., 2016). Сайты инициации RAN-трансляции обнаруживаются у человека и мыши независимо от экспансии повторов, в том числе и в отсутствии экспансии (Ingolia et al., 2011; Ingolia et al., 2012). Исследование RAN-трансляции в модельной системе на основе плазмид с репортерным белком показало, что повтор CGG и его трансляция регулируют синтез FMRP. Т.е. RAN-трансляция повтора нормальной длины выступает в роли регуляторной uORF (короткая открытая рамка считывания в 5'-районе гена) для контроля базального синтеза FMRP. Блокирование RAN-трансляции или удаление повтора CGG увеличивало синтез FMRP в клетках человека и нейронах грызунов.

В случае нейронов пациентов с полной мутацией и сохранившейся активностью гена *FMR1* блокирование RAN-трансляции приводит к снижению нейротоксичности и повышению синтеза FMRP. При этом происходит блокирование повышения синтеза FMRP в ответ на активацию mGluR. Таким образом, подавление RAN-трансляции имеет потенциальный терапевтический эффект для пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы (Rodriguez et al., 2020).

1.8. Ломкие сайты хромосом

1.8.1. Общая характеристика ломких сайтов хромосом

Впервые разрывы на хромосомах были описаны в Национальных институтах здоровья (США) в 1965 году. Термин «ломкие сайты» был введен в 1970 году для описания разрыва на длинном плече хромосомы 16. Для этого разрыва характерно классическое менделевское наследование. После этого последовал ряд описаний ломких сайтов на X-хромосоме, часть из которых была ассоциирована с наследственной умственной отсталостью. Их цитогенетическая экспрессия происходит при фолатном и тимидилатном стрессе, т.е. для появления ломких сайтов хромосом необходимы специфические условия (Dekaban, 1965; Magenis et al., 1970; Sutherland, 1977; Sutherland, 1979; Glover, 1981). Ломкие сайты хромосом являются нормальным элементом кариотипа млекопитающих. Их можно определить как разрывы или перетяжки, видимые на метафазных хромосомах, полученных из живых клеток, после воздействия таких агентов репликативного стресса, как 5-фтордезоксифуридин, дистамицин, бромдезоксифуридин или афидиколин (Sutherland, 1991; Freudenreich, 2007; Lukusa, Fryns, 2008). На сегодня описано более 120 таких локусов, они являются стабильными при нормальном культивировании клеток и проявляются в специфических условиях, либо при добавлении специфических реагентов.

Все ломкие сайты хромосом можно разделить на две группы: обычные ломкие сайты и редкие ломкие сайты. Обычные ломкие сайты хромосом являются нормальным элементом кариотипа и встречаются у всех людей, в то время как

редкие ломкие сайты являются результатом мутации – экспансии повторов. Они встречаются не более чем в 5% популяции (Durkin, Glover, 2007; Feng, Chakraborty, 2017). Некоторые исследователи выделяют особую группу ломких сайтов – «ранореплицирующиеся ломкие сайты». Они локализованы в рано реплицирующихся районах хромосом с высоким GC-содержанием и низким содержанием ориджинов репликации (Barlow et al., 2013; Mortusewicz et al., 2013; Voutsinos et al., 2018). Однако, по своей сути, они являются нормальными элементами кариотипа, т.е. обычными ломкими сайтами.

Номенклатурный комитет HUGO Gene (HGNC, www.genenames.org) утвердил следующую номенклатуру ломких сайтов: FRA – сокращение от fragile, затем идет номер хромосомы и после этого заглавной латинской буквой обозначается каким по счету описан данный локус на этой хромосоме (Feng, Chakraborty, 2017). Например, обозначение FRAXA обозначает, что ломкий сайт находится на хромосоме X и является первым по порядку описания.

В зависимости от индуктора ломкости каждая группа ломких сайтов подразделяется на типы (табл. 1).

Классификация и обнаружение ломких сайтов хромосом зачастую могут быть затруднены, так как они могут кластеризоваться, в том числе обычные и редкие ломкие сайты могут образовывать совместные кластеры (рис. 6, табл. 2). Например, редкий ломкий сайт FRA11B и индуцируемый афидиколином ломкий сайт FRA11G локализованы в районе 11q23.3 (Fechter et al., 2007), а редкий ломкий сайт FRAXA и обычный ломкий сайт FRAXD локализованы в районах Xq27.3 и Xq27.2 соответственно (Hecht, Vixenman, 1990; Sutherland, Baker, 1990).

Таблица 1. Классификация ломких сайтов (Durkin, Glover, 2007; Feng, Chakraborty, 2017).

Тип и индуктор	Описанное количество	Последовательность
Редкие ломкие сайты	30	
Фолат-чувствительные	22	(CGG) _n

Дистамицин А-индуцируемые	5	АТ-богатые повторы
Бромдезоксиуридин-индуцируемые	2	АТ-богатые повторы
Индуктор неизвестен	1	
Обычные ломкие сайты	90	
Афидиколин-индуцируемые	78	АТ-богатые
Бромдезоксиуридин-индуцируемые	7	АТ-богатые?
5-азацитидин-индуцируемые	4	?
Индуктор неизвестен (вероятно, гидроксимочевина)	1	

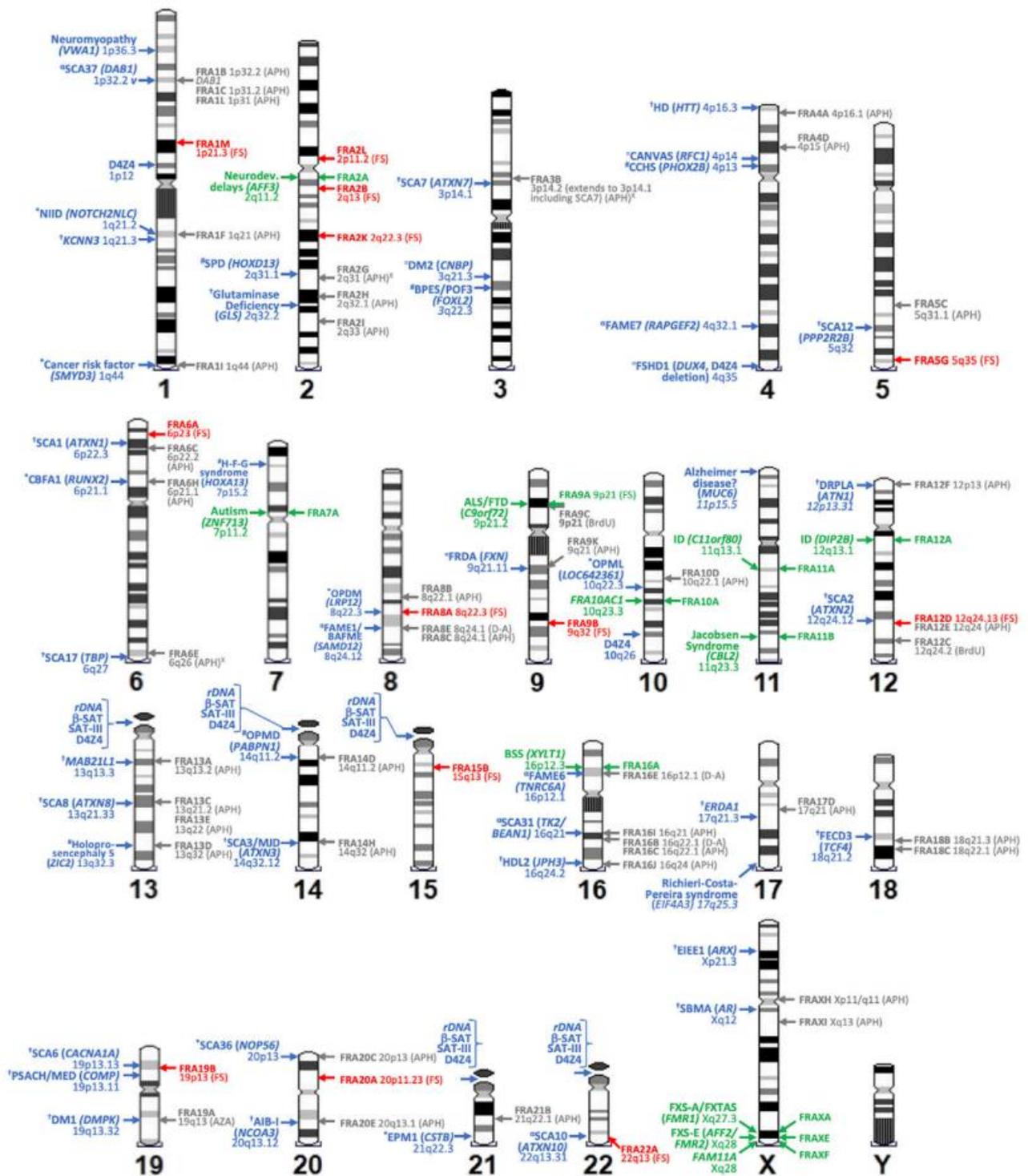


Рисунок 6. Распределение ломких сайтов хромосом и локусов экспансии повторов в кариотипе человека.

Зеленый цвет – фолатчувствительные ломкие сайты, которые картированы/секвенированы и описаны их связи с заболеваниями (все это повтор CGG за исключением FRA9A, ассоциированного с повтором GGGGCC в C9orf72); красный – не картированные фолатчувствительные ломкие сайты; серый – остальные редкие и обычные ломкие сайты; синий

– экспансия повторов: †CAG/CTG, #GCN/GCG, °пятинуклеотидные АТ-богатые повторы, *GC-богатые повторы, ∞остальные повторы (по Mirceta et al., 2022).

Таблица 2. Кластеризованные ломкие сайты хромосом (Mirceta et al., 2022).

Кластеры ломких сайтов и метод индукции	Хромосомная локализация
FRA1M (Ф*), FRA1E (А*)	1p21.3, 1p21.2
FRA8A (Ф), FRA8B (А), FRA8C (А)	8q22.1, 8q22.1-8q22.2
FRA9A (Ф), FRA9C (Б*)	9p21
FRA9B (Ф), FRA9E (А)	9q32
FRA10B, FRA10E	10q25.2
FRA11A (Ф), FRA11H (А)	11q13.3, 11q13
FRA11I (Ф), FRA11C (А)	11p15.1
FRA12D (Ф), FRA12C (Б), FRA12E (А)	12q24.13, 12q24
FRA13B (Б), FRA13C (А)	13q21, 13q21.2
FRA16B (Д*), FRA16C (А)	16q22.1
FRAXD (А), FRAXA (Ф), FRAXE (Ф), FRAXF (Ф)	Xq27.2, Xq27.3, Xq28

*Ф – фолатный стресс, А – афидиколин, Б – бромдезоксисуридин, Д – дистамицин.

Это все приводит к тому, что при исследовании некоторые ломкие сайты могут теряться. Этому также способствует то, что некоторые обычные ломкие сайты хромосом могут быть индуцированы в тех же условиях, что и редкие (например, при дефиците фолата) (Kähkönen et al., 1989; Jenkins et al., 1990; Mrasek et al., 2010).

Влияние ломких сайтов хромосом на генетические характеристики во многом определяется их положением в геноме. Изначально картирование ломких сайтов осуществляли с помощью цитогенетических подходов с разрешением в несколько хромосомных бэндов, т.е. несколько м.п.н. (Mrasek et al., 2010). Такой подход не позволяет установить точно последовательность, ассоциированную с ломким

сайтом, и определить причину и последствия ломкости. Применение флуоресцентной гибридизации *in situ* позволило определить последовательности и гены, связанные с ломкими сайтами. Например, FRA3B связан с геном *FHIT*, а FRA16D – с геном *WWOX*. Позднее точное картирование ломких сайтов было проведено с помощью высокопроизводительного секвенирования и других современных подходов (Okamoto et al., 2018; Pentzold et al., 2018; Ji et al., 2020; Zhao et al., 2020).

1.8.2. Обычные ломкие сайты хромосом

Самая большая группа ломких сайтов – это обычные ломкие сайты, которые встречаются у всех людей. Именно они являются горячими точками хромосомных перестроек *in vivo*, часть из которых могут быть канцерогенны или приводить к развитию нейродегенерации (Denison et al., 2003; Barlow et al., 2013; Le Tallec et al., 2013; Ambroziak et al., 2015; Wilson et al., 2015; Zheglo et al., 2019). Следует подчеркнуть, что обычные ломкие сайты хромосом – это нормальный элемент кариотипа, а не просто артефакт, наблюдаемый *in vitro*. Главной задачей в исследовании ломких сайтов является определение причин данного явления.

Любой химический агент, который вызывает образование ломких сайтов, так или иначе взаимодействует с аппаратом репликации ДНК. Ломкие сайты ассоциированы с последовательностями, репликация которых протекает с затруднением, либо в поздней S-фазе. Тем не менее выделяют также рано реплицирующиеся ломкие сайты, которые могут быть индуцированы гидроксимочевинной, реагентом, влияющим на соотношение дезоксирибонуклеотидов в пуле (Barlow et al., 2013). Т.е. клетки, обработанные одним из агентов, вызывающих ломкость, входят в митоз до того, как закончится репликация района ломкого сайта. Это приводит к недорепликации участка, преждевременной конденсации хроматина и образованию обычного ломкого сайта, видимого в микроскоп. Самыми распространенными среди обычных ломких сайтов хромосом являются таковые, индуцируемые афидиколином – ингибитором ДНК-полимераз α , δ и ϵ . Лучше всего из них описаны FRA3B и FRA16D. Сайты, индуцируемые

афидиколином, занимают протяженные, более 300 т.п.н., и гетерогенные участки ДНК, которые поздно реплицируются и содержат низкое количество ориджинов репликации (Lukusa, Fryns, 2008; Glover et al., 2017; Debatisse, Rosselli, 2019). Хотя эти районы являются АТ-богатыми и нестабильными, тем не менее не было выявлено последовательностей, которые бы обуславливали замедление репликации ДНК в таких районах (Mishmar et al., 1998).

Для описания проблем репликации, возникающих в районе обычного ломкого сайта, было предложено несколько моделей, большинство из которых связано с различного рода проблемами репликации (Zlotorynski et al., 2003; Helmrich et al., 2011; Ozeri-Galai et al., 2011; Irony-Tur Sinai et al., 2019; Van Wietmarschen et al., 2020). Однако экспериментальные данные по влиянию репликативного стресса на экспрессию обычных ломких сайтов противоречивы. Например, формирование R-петли приводит к образованию ломкого сайта FRA3B (Helmrich et al., 2011), в то время как другой группой исследователей это опровергалось (Park et al., 2021). Молекулярный комбинг позволил выявить остановку репликации в локусах FRA16B, FRA16D и FRA6E (Ozeri-Galai et al., 2011; Madireddy et al., 2016). В то же время аналогичный подход в других исследованиях сайтов FRA3B и FRA6E показал, что в клетках после обработки афидиколином не происходит остановки вилки в этих локусах (Palumbo et al., 2010; Letessier et al., 2011). Таким образом, можно сделать противоположный вывод о том, что остановка репликации или одновременные репликация и транскрипция не являются основными причинами образования редких ломких сайтов, кроме того не все протяженные гены, которые активно транскрибируются или поздно реплицируются, являются ломкими локусами (Wilson et al., 2015; Sarni et al., 2020; Park et al., 2021).

На сегодня известно, что чаще всего обычные ломкие сайты имеют очень высокое АТ-содержание (Matsuyama et al., 2003; Zlotorynski et al., 2003; Burrow et al., 2010), что приводит к остановке репликативных вилок в этих районах (Ozeri-Galai et al., 2011). Интеграция АТ-богатой последовательности длиной 3,4 т.п.н. из сайта FRA16C в стабильный эктопический сайт на хромосоме X приводила к появлению ломкости, пусть и с меньшей частотой, чем в FRA16C (Irony-Tur Sinai

et al., 2019). Это подтверждает, что наличие АТ-богатых районов – это, по крайней мере, одна из причин ломкости обычных ломких сайтов. Эти последовательности образуют вторичные структуры, который тормозят продвижение репликативной вилки, что усугубляется при репликативном стрессе (Kaushal, Freudenreich, 2019; Lyu et al., 2019). По данным разных авторов не специфические последовательности, а именно наличие вторичных структур и АТ-богатых последовательностей играет ключевую роль в ломкости хромосом. Это подтверждается тем, что в разных тканях и в разных клетках из одной ткани непосредственно сайт разрыва отличается, а ChIP-Seq и Repli-Seq анализы не позволили выявить конкретную последовательность, связанную с разрывом (Le Tallec et al., 2013; Pentzold et al., 2018; Brison et al., 2019). Также не было выявлено какой-либо специфичной последовательности, которая бы выступала в роли сигнала остановки репликации (Macheret et al., 2020).

Как уже было упомянуто, большинство редких ломких сайтов являются поздне-реплицируемыми, что делает их очень восприимчивыми к репликативному стрессу. Для многих из них, например, FRA3B, FRA16D, FRA7H, FRA1H и FRA2G, показана репликация в поздней S-фазе клеточного цикла (Le Beau et al., 1998; Hellman et al., 2000; Palakodeti et al., 2004; Pelliccia et al., 2008; Maccaroni et al., 2020). Исследование репликации всего генома показало, что 47 из 59 обычных ломких сайтов реплицируются в середине или конце S-фазы и в случае репликативного стресса входят в митоз недореплицированными (Brison et al., 2019; Ji et al., 2020; Macheret et al., 2020). Склонность таких сайтов к поздней репликации сохраняется у многих видов, в частности это происходит в клетках птиц (Pentzold et al., 2018). Однако свойство поздно реплицироваться не является уникальным свойством ломких сайтов, а характерно для многих участков генома. Еще одно отличие ломких сайтов – это низкое содержание ориджинов репликации, а также низкая активность существующих ориджинов (Palakodeti et al., 2010; Letessier et al., 2011; Le Tallec et al., 2011). Все это приводит к задержке репликации и ее продолжению уже во время митоза при репликативном стрессе. В результате происходит активация репликации, индуцированной разрывом, и гидролиз с помощью

комплекса MUS81-EME1 с образованием двуцепочечного разрыва (Brison et al., 2019; Ji et al., 2020; Macheret et al., 2020).

Некоторые ломкие сайты ассоциированы с экспрессией различных онкогенов, которые могут приводить к репликативному стрессу (Miron et al., 2015). По некоторым данным, для экспрессии обычных ломких сайтов необходима транскрипция, однако высокий уровень транскрипции снижает ломкость, скорее всего из-за того, что это приводит к более ранней репликации такого локуса (Helmrich et al., 2011; Park et al., 2021; Blin et al., 2019). Кроме того, транскрипция длинных генов вызывает временное выключение активных ориджинов в таких локусах и, соответственно, приводит к проблемам с репликацией (Brison et al., 2019). В добавок к этому активная транскрипция снижает пул свободных нуклеотидов, что в свою очередь, также затрудняет репликацию (Barlow et al., 2013).

Также причиной ломкости хромосом в обычных ломких сайтах может быть непосредственно взаимодействие транскрипции и репликации. Такое предположение было впервые сделано, когда выявили разный уровень экспрессии ломких сайтов в разных типах клеток (Murano et al., 1989a, b; Le Tallec et al., 2013). Как упоминалось выше, крайне нестабильные сайты FRA3B и FRA16D расположены внутри генов *FHIT* и *WWOX* размером 1,5 м.п.н. и 1,1 м.п.н. соответственно (Ohta et al., 1996; Bednarek et al., 2000; Smith et al., 2006; McAvoy et al., 2007; Smith et al., 2007; Helmrich et al., 2011; Le Tallec et al., 2013; Okamoto et al., 2018; Pentzold et al., 2018). Однако не все длинные гены ассоциированы с ломкими сайтами. Установлено, что только ломкость коррелирует с активной транскрипцией в длинных генах, а не наоборот (Le Tallec et al., 2013; Okamoto et al., 2018; Pentzold et al., 2018). Так, на примере генов *FHIT* и *WWOX* обнаружено, что ломкие сайты присутствуют в В-лимфоцитах, где оба гена активны, и отсутствуют в миобластах, где эти гены не активны (Helmrich et al., 2011). В искусственной экспериментальной системе на основе длинного гена *DMD* птиц под управлением Tet-on промотора удалось установить, что активация транскрипции приводит к образованию ломких сайтов и замедлению репликативных вилок, однако общее

время репликации остается неизменным. Тем не менее был указан также обратный эффект в случае FRA4F в гене *CCSER1* или FRA3B в гене *FHIT* (Blin et al., 2019). Таким образом, влияние транскрипции на репликацию зависит также от дополнительных факторов, таких, как общий уровень транскрипции в клетке и эпигенетическое окружение локуса.

Существует две гипотезы, описывающие влияние транскрипции на ломкость обычных ломких сайтов хромосом. Первая это «столкновение транскрипции и репликации» и вторая это «изменение ориджина репликации». Большие гены, ассоциированные с ломкими сайтами, такие, как *FHIT*, *WWOX* и *IMMP2L*, требуют больше одного клеточного цикла для завершения транскрипции. Она чаще всего начинается в фазе G2/M и длится до следующей G1/S фазы. Таким образом, очевидно, что в некоторых участках этих генов будет происходить конкуренция между транскрипцией и репликацией, особенно в условиях репликативного стресса. Это все приводит к остановке репликативной вилки и формированию R-петель (Santos-Pereira, Aguilera, 2015; Crossley, Vocek, Cimprich, 2019). Эти структуры очень устойчивы термодинамически и могут существовать длительное время, что еще больше усугубляет подавление репликации. Установлено, что R-петли специфически концентрируются в районах обычных ломких сайтов при умеренном репликативном стрессе и предшествуют высокой частоте разрывов хромосом (Okamoto et al., 2018; Wu et al., 2020). При этом частота ломкости положительно коррелирует с уровнем транскрипции мРНК в этих участках. Все это говорит в пользу модели «столкновение транскрипции и репликации». Иными словами, обычные ломкие сайты хромосом локализованы в транскрибируемых генах. Однако картирование всех обычных ломких сайтов показало, что некоторые из них локализованы за пределами транскрибируемых участков, и корреляция между уровнем транскрипции и частотой ломкости отсутствует в некоторых линиях клеток (Le Tallec et al., 2013). Кроме того, ингибирование транскрипции не уменьшает ломкость хромосом в условиях репликативного стресса (Brison et al., 2019), что противоречит модели «столкновение транскрипции и репликации», а формирование R-петель, вероятно, – не основная причина ломкости хромосом.

Секвенирование РНК показало, что обычные ломкие сайты обогащены длинными транскрипционными единицами, и транскрипция может регулировать распределение и плотность ориджинов репликации. Исходя из этого сформулирована модель «изменение ориджина репликации», в которой большие транскрипционные единицы не позволяют включаться спящим ориджинам репликации, так как убирают пререпликативный комплекс в G1 фазе. Таким образом, обычные ломкие сайты могут быть реплицированы только с двух фланкирующих репликативных вилок, которые должны пройти весь протяженный участок, что и делает ломкий сайт крайне восприимчивым к любым затруднениям репликации (Gros et al., 2015; Powell et al., 2015; Wilson et al., 2015; Macheret, Halazonetis, 2018; Chen et al., 2019; Ji et al., 2020; Liu et al., 2021).

Детальное исследование влияния проблем репликации на экспрессию обычных ломких сайтов было проведено с использованием камптотецина. Это ингибитор топоизомеразы I, который снижает количество ломких сайтов, индуцированных афидиколином (Arlt, Glover, 2010). Данный факт позволяет предположить, что афидиколин приводит к остановке комплекса ДНК-полимераза α /топоизомеразы I, в то время как геликаза продолжает движение. В результате этого образуются протяженные участки одноцепочечной ДНК, которые образуют нестандартные вторичные структуры и, в результате, эти одноцепочечные фрагменты остаются недореплицированными, что приводит к образованию ломкого сайта (рис. 7) (Arlt, Glover, 2010).

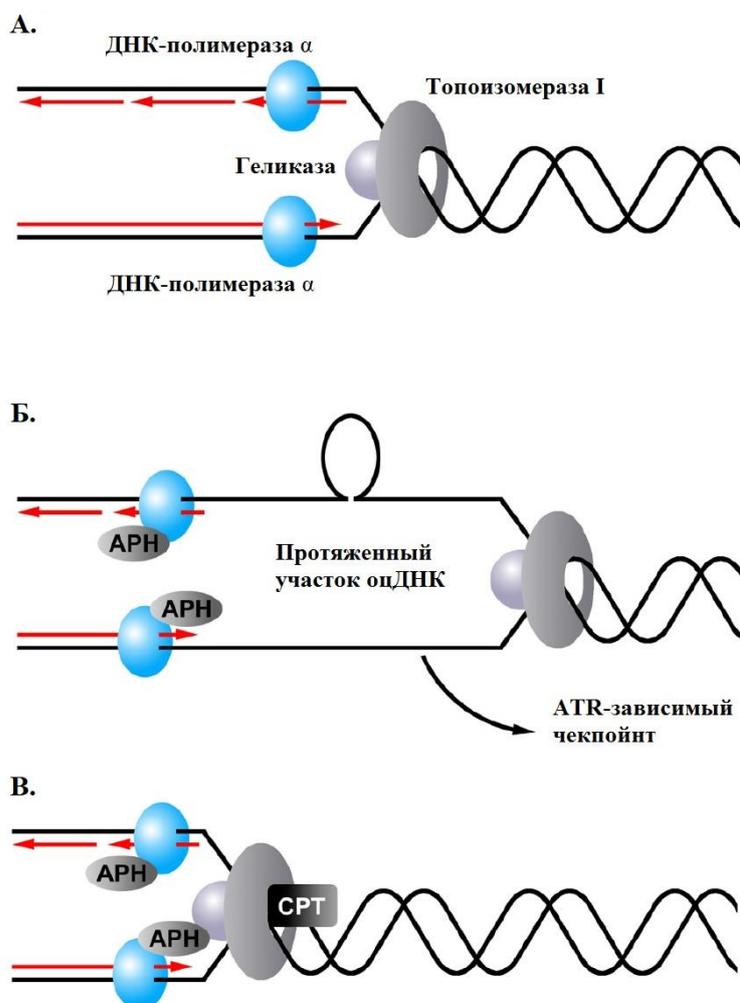


Рисунок 7. Модель, объясняющая влияние низких доз камптотецина на образование индуцируемых афидиколином обычных ломких сайтов хромосом (Arlt, Glover, 2010). Объяснения в тексте.

В процессе нормальной репликации ДНК-полимеразы геликаза и топоизомераза I движутся вдоль цепи ДНК, взаимодействуя друг с другом и сводя, тем самым, одноцепочечные участки к минимуму (см. рис. 7А). Если репликация происходит в присутствии афидиколина (АРН), активность ДНК-полимераз снижается, при этом геликаза и топоизомераза I продолжают двигаться с той же скоростью (см. рис. 7Б). Это приводит к образованию протяженных участков одноцепочечной ДНК, которая формирует вторичные структуры, например, шпильки и, тем самым, еще больше затрудняет работу ДНК-полимераз (см. рис. 7В). Остановка репликативной вилки приводит к включению чекпойнтов клеточного цикла и в некоторых случаях к образованию разрывов ДНК. Если

клетки обрабатывать одновременно афидиколином и камптотецином (СРТ), то происходит остановка как ДНК-полимераз, так и топоизомеразы I. Это позволяет избежать образования протяженных участков одноцепочечной ДНК и снизить количество ломких сайтов.

1.8.3. Редкие ломкие сайты хромосом и фолатный стресс

В отличие от обычных ломких сайтов, редкие ломкие сайты занимают небольшие локусы ДНК длиной около 0,6-5 т.п.н. Большая часть редких ломких сайтов может быть индуцирована 5-фтордезоксисуридином. В отличие от афидиколин-индуцируемых обычных ломких сайтов, редкие ломкие сайты локализируются в ограниченных участках генома, содержащих протяженные тракты CGG повторов, которые часто метилированы. В этих случаях ломкость хромосом сопряжена именно с длинными трактами повторов и не наблюдается в случае коротких трактов.

Например, экспансия CGG повторов приводит к образованию целого ряда фолатчувствительных ломких сайтов, в том числе: FRAXA, FRAHE, FRAHF, FRA16A, FRA11B и др. При этом, поскольку эти ломкие сайты являются результатом мутации, они сопряжены с какими-либо наследственными заболеваниями. Например, FRAXA и FRAHE сопряжены с умственной отсталостью, ассоциированной с ломкой X-хромосомой, сайт FRA11B связан с синдромом Якобсена и т.д. (Jones et al., 1995). В то же время экспансия других повторов, например, CAG при миотонической дистрофии, не является причиной ломкости хромосом, однако она приводит к образованию микроядер в лимфоцитах пациентов. Это свидетельствует о повышении нестабильности хромосом (Jalal et al., 1993; Wenger et al., 1996; Casella et al., 2003). Важной особенностью последовательностей, ассоциированных с ломкими сайтами, является их способность формировать вторичные структуры, шпильки, G-квадруплексы, i-мотивы и Z-ДНК (Mitas et al., 1995; Usdin, Woodford, 1995; Nadel et al., 1995; Mariappan et al., 1996; Yu et al., 1997; Hewett et al., 1998; Fojtik, Vorlickova, 2001; Renciuik et al., 2011).

Например, повтор CGG и комплементарный ему повтор CCG формируют вторичные структуры, G-квадруплексы и i-мотивы соответственно (Mirkin, 1996). *In vitro* удалось установить, что G-квадруплексы стабилизируются наличием катионов K^+ и при этом блокируют репликацию (Usdin, Woodford, 1995). Блокирование репликации также происходит в модельных системах клеток млекопитающих, в том числе с использованием эндогенного локуса *FMR1* (Voineagu et al., 2009; Gerhardt et al., 2014). В дополнение к этому, метилирование ДНК, характерное для неактивного аллеля, еще больше стабилизирует структуры, останавливающие репликативную вилку (Hardin et al., 1993; Fry, Loeb, 1994; Renciuik et al., 2011; Lin et al., 2013). Но подавление аллеля само по себе не приводит к образованию ломкого сайта, а скорее к этому приводит подавленная репликация, ассоциированная с подавлением транскрипции. Так, активные аллели *FMR1* реплицируются достаточно поздно в пределах клеточного цикла, в фазах S4 и G2, а неактивные еще позднее (Webb, 1992; Hansen et al., 1993; Hansen et al., 2010). Фолатный стресс только усугубляет эти проблемы.

Образование ломкого сайта FRAXA в гене *FMR1* происходит у пациентов с полной мутацией при отсутствии экспрессии гена и метилировании его промоторной области. Именно наличие этого ломкого сайта может быть причиной потери одной из X-хромосом и развития мозаичного синдрома Шерешевского-Тернера у женщин, носительниц премутации. При образовании разрывов, вероятно, происходит их последующее слияние с образованием дицентрической хромосомы, которая потом теряется во время цитокинеза (Dobkin et al., 2009). Наличие ломких сайтов FRAXA продолжает оставаться важнейшим диагностическим критерием при определении синдрома ломкой X-хромосомы.

5-фтордезоксисуридин ингибирует тимидилатсинтазу (рис. 8), что приводит к изменению в составе нуклеотидов и замедлению репликации (D'Anna et al., 1985). Кроме того, 5-фтордезоксисуридин может инкорпорироваться в ДНК и образовывать пары с гуанином и аденином (Meyers et al., 2004). Однако молекулярные основы образования ломких сайтов при действии этого реагента не известны.

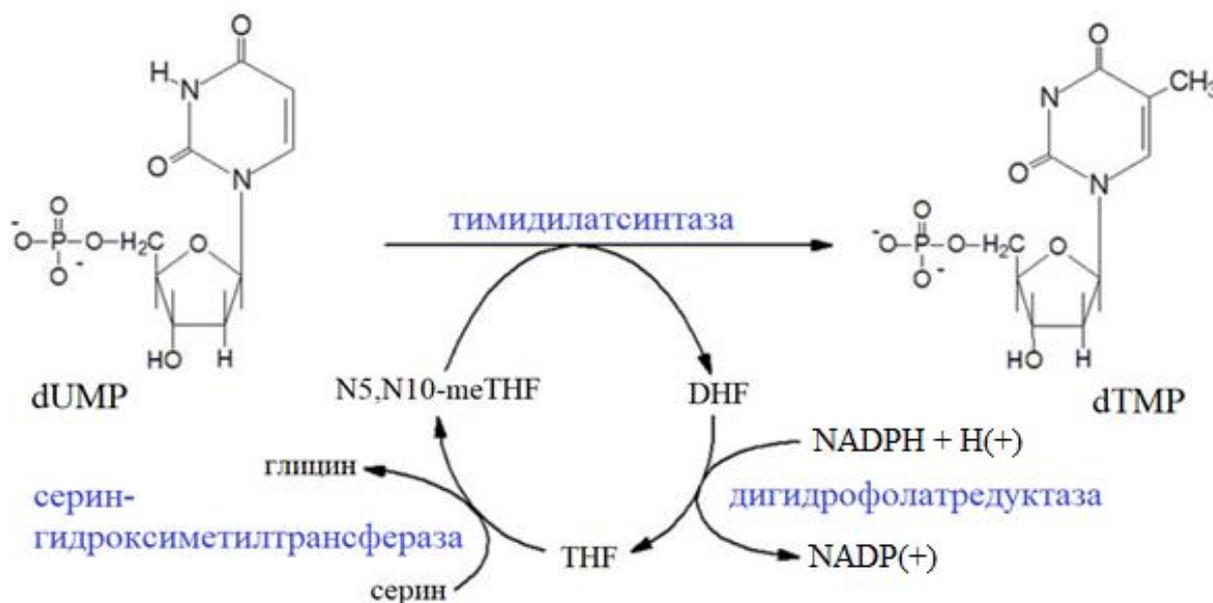


Рисунок 8. Схема связи синтеза тимидинмонофосфата с метаболизмом фолатов. Тимидилатсинтаза катализирует образование тимидинмонофосфата из уридинмонофосфата, и ее коферментом является тетрагидрофолиевая кислота, которая превращается в дигидрофолиевую кислоту (по D'Anna et al., 1985).

Ломкость хромосом на фоне тимидилатного стресса достигается несколькими путями индукции, которые нарушают пути метаболизма фолатов: 1) инкубация клеток в питательной среде с дефицитом фолиевой кислоты, 2) добавление метотрексата, ингибитора дигидрофолатредуктазы (см. рис. 8), 3) добавление 5-фтордезоксипуридина, ингибитора тимидилатсинтазы, 4) избыток тимидина, который ингибирует способность рибонуклеотидредуктазы конвертировать цитидиндифосфат в дезоксицитидиндифосфат и, таким образом, подавляет продукцию dCTP (Jacky et al., 1991). Избыток бромдезоксипуридина, аналога тимидина, который также снижает уровень dCTP, блокирует экспрессию фолатчувствительных ломких сайтов. Это блокирование возможно из-за способности бромдезоксипуридина образовывать пары с гуанозином в енольной форме (Freese, 1959; Sutherland et al., 1985a). Образование таких пар не блокирует синтез ДНК, в отличие от избытка тимидина, приводящего к наличию множества неспаренных молекул гуанозина из-за отсутствия dCTP (Sutherland et al., 1985b).

Кроме того, нарушение баланса пула нуклеотидов приводит к снижению точности ДНК-полимераз, повышению мутагенеза и служит фактором повышения ломкости хромосом (Das et al., 1985; Mattano et al., 1990; Kunz, Kohalmi, 1991).

Пути метаболизма фолатов тесно связаны с путями метилирования ДНК. Поскольку фолиевая кислота – это кофактор, необходимый для метилирования уридинмонофосфата до тимидинмонофосфата (см. рис. 8), она предотвращает токсичную интеграцию урацила в геномную ДНК. Экспериментальные данные подтверждают, что встраивание урацила в ДНК приводит к росту количества одно- и двуцепочечных разрывов, разрывам хромосом и образованию микроядер (Blount, Ames, 1995; Blount et al., 1997; Duthie, McMillan, 1997; Duthie, Hawdon, 1998). Токсичность урацила подтверждается также тем, что 4 из 8 существующих гликозилаз человека существуют специально для удаления урацила (Lindahl, Wood, 1999). Фолиевая кислота имеет также важное значение в продукции метионина и S-аденозилметионина – донора метила, необходимого во многих реакциях метилирования, в том числе и в поддержании метилирования ДНК (Zingg, Jones, 1997).

Влияние фолата на метилирование ДНК было подтверждено *in vivo* как у человека, так и у модельных животных. В частности, выявлена корреляция низкофолатной диеты и общего гипометилирования ДНК (Bekdash, 2021). Добавление фолата при низкофолатной диете в течение нескольких недель приводило к повышению общего уровня метилирования ДНК (Jacob et al., 1998). Незначительное снижение количества фолатов в питательной среде при культивировании клеток простаты грызунов приводило к различным хромосомным перестройкам (Bistulfi et al., 2010). Повтор CGG является крайне чувствительным к дефициту фолатов, что выражается в ломкости хромосом именно по этим локусам.

Обработка культуры клеток метотрексатом, ингибитором дигидрофолатредуктазы (см. рис. 8), приводит к сильному увеличению соотношения dUTP/dTTP и, соответственно к инкорпорации урацила в ДНК (Goulian et al., 1980). Например, у дрожжей *S. cerevisiae* инкорпорация урацила в ДНК происходит чаще в позднореплицирующихся генах, что соответствует

преимущественной локализации ломких сайтов также в поздне-replicative генах (Webb, 1992; Hansen et al., 1993; Subramanian et al., 1996; Bryan et al., 2014). Это может приводить к задержке репарации неправильного основания из-за отсутствия необходимых dNTP. Процесс также усугубляется дезаминированием цитозина, что приводит к повышению содержания урацила в тракте повторов CGG (Reidy, 1987; Feng, Chakraborty, 2017). При этом известно, что работа ДНК-гликозилаз более эффективна в районах повреждений ДНК, когда там формируются нестандартные вторичные структуры. Следовательно, повышенная способность повтора CGG формировать вторичные структуры приводит к тому, что неправильно встроенный урацил будет легче узнаваться гликозилазами, тем самым запуская репарацию ДНК (Hedglin et al., 2015; Feng, Chakraborty, 2017).

Ранее, еще до открытия экспансии повторов, было известно, что нарушения количества предшественника одного из нуклеотидов влияет на уровень остальных нуклеотидов, а также то, что нарушение баланса в пуле нуклеотидов повышает количество мутаций (Kunkel et al., 1982; Kunz, 1982; Meuth, 1984; Kunz, 1988; Mathews, 2006, 2014, 2015; Mannava et al., 2013). Аналогично это может оказывать влияние на нестабильность повторов (De Luca et al., 2008; Cilli et al., 2016; Mathews, 2017), что мы, вероятно, и наблюдаем в районе редких ломких сайтов хромосом.

1.9. Молекулярно-генетическая диагностика фраксопатий

Лабораторная и клиническая диагностика синдрома ломкой X-хромосомы является крайне трудоемким процессом. Синдром изначально выявляли, определяя размер CGG повтора методом Саузерн-блот гибридизации. В этом случае геномную ДНК обрабатывают рестриктазой типа *EcoRI*, вырезающей locus повтора и не восприимчивой к метилированию, а также метилчувствительной рестриктазой, например, *BssIII*, *EagI*, *NruI* или *SacII*, которая гидролизует только неметилованные аллели (Rousseau et al., 1991; Monaghan et al., 2013). Затем проводят гель-электрофорез без бромистого этидия, чтобы исключить неправильную подвижность фрагментов и определить мозаицизм и блот-гибридизацию с одним из зондов Stb12.3 (pP2 или Pfxa7) или Oх1.9, каждый из

которых локализован дистальнее повтора и сайтов рестрикции метилчувствительных рестриктаз (рис. 9). Получается, что, например, в случае женщины с нормальным генотипом формируется два бенда, один из которых по размеру составляет примерно 2,8 т.п.н. и соответствует нормальному аллелю в активной X-хромосоме, а второй – примерно 5,2 т.п.н., что соответствует нормальному, но метилированному аллелю в инактивированной X-хромосоме. При таком подходе в случае неметилированной премутации и для большинства случаев неметилированной полной мутации размер бенда будет меньше, чем 5,2 т.п.н. В случае же метилированных премутации и полной мутации размер бенда составит более 5,2 т.п.н. (Gold et al., 2000, Nolin et al., 2008).

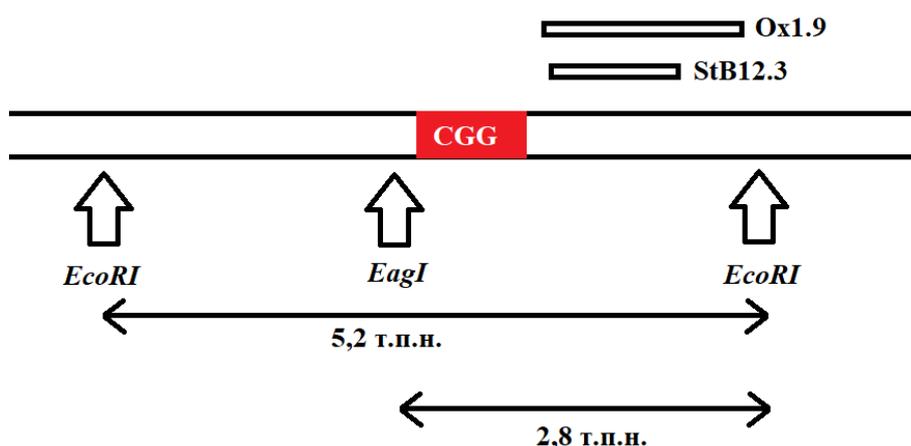


Рисунок 9. Схема расположения зондов (Ox1.9 и StB12.3) и сайтов рестрикции (стрелки) для молекулярной диагностики синдрома ломкой X-хромосомы с помощью Саузерн-блот гибридизации. Пояснения в тексте.

Этот метод удобен тем, что позволяет кроме размера повтора также определить наличие или отсутствие метилирования промоторной области гена *FMR1* в случае использования метилчувствительных рестриктаз. К недостаткам метода следует отнести достаточно грубое определение размера повтора, что оказывается критическим при пограничных размерах аллелей, и необходимость большого количества исходной ДНК, что не всегда возможно, особенно при работе с

пациентами детского возраста. Кроме того, наличие соматической экспансии и мозаицизма приводит к снижению доли каждого аллеля, что затрудняет выявление всех размеров повтора у индивидуума, а также приводит к образованию облаков на электрофореze, что затрудняет интерпретацию результатов. Дополнительные ограничения на этот подход накладывает разрешающая способность агарозного геля и точечные мутации в сайтах рестрикции, что может приводить к ложноположительным и ложноотрицательным результатам (Tarleton et al., 2002; Cecconi et al., 2008; Tabolacci et al., 2008a; Monaghan et al., 2013; Biancalana et al., 2015).

Второй способ определения размера CGG повтора для диагностики синдрома – это ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих повторенный участок. Метод более производителен, чем Саузерн-блот, требует всего несколько часов для постановки диагноза и на несколько порядков меньшего количества ДНК. В праймер вводится метка, и затем размер продукта определяют с помощью капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе. Данный подход позволяет определить размер повтора с точностью до триплета. Однако использование метода значительно затруднено высоким GC-содержанием амплифицируемого фрагмента и наличием вторичных структур, которые формируются на тракте повторов и тем самым затрудняют процесс амплификации (Houdayer et al., 1999; Saluto et al., 2005; Khaniani et al., 2008; Filipovic-Sadic et al., 2010). Стандартная ПЦР с использованием Taq ДНК-полимеразы не позволяет синтезировать фрагменты длиной больше, чем норма. В связи с этим исследователи прибегают к ряду подходов для решения проблемы синтеза GC-богатой матрицы. В частности, проводят ПЦР с использованием высокопроцессивных ДНК полимераз (например, Phusion), используют различные добавки, повышающие выход при амплификации GC-богатых участков: диметилсульфоксид, 7-деаза-дезоксигуанозин и т.д. Таким образом, удалось увеличить эффективность синтеза и получить продукт, соответствующий размеру некрупных полных мутаций (около 300-400 триплетов). Кроме того, был разработан химерный праймер последовательностью (CGG)₄, который отжигается вдоль всего тракта повторов

кроме позиций AGG вставок и в результате позволяет определить их наличие и положение в тракте повторов (Tassone et al., 2008; Seneca et al., 2012). Метод с использованием химерного праймера подразумевает присутствие в реакционной смеси также праймеров, фланкирующих повтор. В результате такой реакции при фрагментном анализе формируется профиль, имеющий наклон с максимальным количеством ДНК в районе коротких фрагментов со снижением к длинным фрагментам. При этом в случае наличия AGG вставок в этом профиле формируются резкие провалы, соответствующие местам, на которые не отжегся праймер (Tarleton et al., 2002; Cecconi et al., 2008; Tabolacci et al., 2008a). Позже, для определения наличия AGG вставок было предложено использовать гибридный праймер, несущий на 3' конце GGA или CCT. В случае этого подхода праймер отжигается только на AGG вставки и, тем самым, дает пики на фрагментном анализе в случае их наличия. Такой метод позволяет проще интерпретировать результаты анализа (Hayward, Usdin, 2017).

Также наличие AGG вставок определяют с помощью рестрикции после ПЦР. Наличие этого триплета формирует сайт рестрикции GGCGGA для рестриктазы *EciI*, и такой гидролиз ПЦР продукта позволяет установить наличие сайта и соответственно AGG вставки. Однако трудности возникают из-за особенностей фермента, который не стабилен, а также трудно интерпретировать результаты в случае неполного гидролиза (Hayward et al., 2016; Tassone et al., 2007a).

В Национальных институтах здоровья (США) был разработан особый подход для амплификации протяженных CGG повторов. Матричную ДНК предварительно гидролизуют с помощью рестриктазы *HindIII*, которая позволяет вырезать повтор и, тем самым, упростить денатурацию GC-богатой матрицы в ПЦР. После этого проводят амплификацию в том же буферном растворе, что и рестрикцию, и который оптимизирован для синтеза GC-богатых матриц (Hayward et al., 2016). Очень важным моментом при амплификации CGG повторов является использование буфера, не содержащего ионы K^+ . Известно, что ионы калия стабилизируют квадруплексы, к образованию которых склонен увеличенный повтор. Соответственно, использование буферов без калия увеличивает

эффективность амплификации (Usdin, Woodford 1995; Orpana et al., 2012; Hayward et al., 2016). Кроме того, при амплификации CGG повторов используют эффективный дестабилизатор вторичных структур – бетаин, который также значительно повышает эффективность ПЦР (Orpana et al., 2012).

Еще одной проблемой в использовании ПЦР является то, что эффективность синтеза различных аллелей отличается, и поэтому при анализе мозаичных или гетерозиготных образцов синтез более короткого аллеля гораздо эффективней, чем синтез более длинного аллеля. Это может привести к полной потере более длинного продукта и, следовательно, к ложноотрицательным результатам (Tassone, 2015).

Важно отметить сложности при определении размера повтора, которые возникают при использовании капиллярного электрофореза. G-богатые и C-богатые цепи участка, содержащего повтор, обладают различной подвижностью на электрофорезе (Fry, Loeb 1994; Mitas et al., 1995; Usdin, Woodford 1995; Yu et al., 1997). В связи с этим возникает необходимость использования нескольких стандартов длин повторов для определения точного размера экспансии. Из-за таких ограничений определение точного размера повтора больших полных мутаций чаще всего невозможно, поэтому определяют приблизительный размер.

Еще одним важным критерием, который используют при диагностике синдрома ломкой X-хромосомы, является наличие метилирования промоторной области гена *FMRI*. Один вариант определения метилирования с помощью Саузерн-блот анализа упомянут выше (Monaghan et al., 2013). Также уровень метилирования определяют с помощью бисульфитной ПЦР, либо ПЦР после гидролиза участка повтора метилчувствительной рестриктазой (Zhou et al., 2004; Coffee et al., 2009). При этом в случае методов с амплификацией, можно использовать праймеры с флуоресцентной меткой для дальнейшего фрагментного анализа, который позволяет выявлять в том числе метилированный вариант. Во всех методах с рестрикцией очень важно использовать контроль на полноту рестрикции, чтобы исключить синтез с недогидролизированных фрагментов.

Также был разработан подход с использованием платформы Illumina, в котором уровень метилирования определяли с помощью микрочипов, несущих зонды к 10 метилированным CpG островкам в гене *FMRI*. Метод основан на изотермической амплификации ДНК, которая модифицирована бисульфитом и гибридизации с чипом, несущем 50-ти меры. Затем с помощью флуоресцентно меченых нуклеотидов происходит пошаговое удлинение и считывание флуоресценции лазером, что позволяет определить статус остатков цитозина. В случае заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, этот метод работает только для определения метилирования у пациентов мужского пола. Однако он оказался применим для диагностики синдромов Прадера-Вилли и Сотоса при использовании зондов на другие участки генома, что важно при дифференциальной диагностике синдрома Мартина-Белл (Schenkel et al., 2016).

Очень важным критерием определения синдрома ломкой X-хромосомы является наличие ломких сайтов FRAXA, которые наблюдаются при полной мутации (Lukusa, Fryns, 2008). Ломкие сайты на X-хромосоме можно определять с помощью методов классической цитогенетики, например, при рутинной или дифференциальной окраске хромосом. Однако сайт FRAXA расположен в теломерном районе X-хромосомы и при потере теломерного участка крайне трудно определить на препарате незначительное укорочение одной из хроматид. Это приводит к недодиагностике при выявлении ломких сайтов, так как большая их часть теряется (Sutherland et al., 1985b). В связи с этим возникает необходимость разработки молекулярно-цитогенетического подхода для выявления и подсчета ломких сайтов FRAXA как в клинических образцах при диагностике, так и в клеточных линиях при проведении научно-исследовательских работ.

1.10. Терапия фраксопатий

1.10.1. Общие подходы к терапии фраксопатий

Понимание механизмов патогенеза синдрома ломкой X-хромосомы привело к развитию методов терапии этого заболевания. Исходя из наших знаний о природе синдрома в настоящее время развиваются два базовых подхода для лечения.

Первый подход заключается в таргетной терапии, т.е. в коррекции нейробиологических путей, которые нарушены из-за отсутствия FMRP. Вторым подходом является восстановление экспрессии гена *FMR1* путём воздействия на эпигенетические механизмы инактивации транскрипции (Tabolacci et al., 2016a), или с использованием генотерапевтических подходов для восстановления структуры измененного гена или доставки дополнительной активной копии гена (Park et al., 2015; Xie et al., 2016). Такой подход можно назвать этиологическим, так как он подразумевает коррекцию основной причины синдрома ломкой X-хромосомы.

Первый подход, таргетная терапия – это базовый метод лечения синдрома, закрепленный в клинических руководствах многих стран мира. Он во многом совпадает с подходами для лечения заболеваний аутистического спектра из-за преобладания специфических симптомов. В настоящее время, согласно руководству Британской Ассоциации психофармакологов от 2018 года, лечение заболеваний аутистического спектра включает следующие терапевтические препараты: глутаматергические агенты, ГАМКергические агенты, блокаторы допаминовых рецепторов (антипсихотики), серотонинергические агенты и другие препараты (Howes et al., 2018). В терапии синдрома ломкой X-хромосомы антипсихотики и серотонинергические препараты относятся к симптоматическому лечению. В отличие от этого глутаматергические и ГАМКергические препараты являются типичными примерами таргетной терапии, так как вовлекаются непосредственно в FMRP-зависимые нейробиологические пути (Hagerman et al., 2017). Клинические испытания именно этих агентов в качестве терапевтических препаратов для лечения синдрома ломкой X-хромосомы стали возможны после описания активизации глутаматергической системы (Huber et al., 2002) и снижения экспрессии некоторых компонентов ГАМКергической (Braat et al., 2015; Sabanov et al., 2017) на животных моделях. Однако, на сегодня данных, полученных в испытаниях на животных, недостаточно для внедрения этих подходов в клиническую практику (Howes et al., 2018). Тем не менее, продолжаются работы по исследованию ингибирования активности метаботропного глутаматного рецептора

5 (mGluR5), например, с помощью AFQ056/Mavoglurant (Zerbi et al., 2019), а также специфичных агонистов экстраинаптических ГАМК_A рецепторов, например, OV101/Gaboxadol (Cogram et al., 2019). Кроме того, в качестве новых агентов таргетной терапии рассматриваются другие вещества, воздействующие на FMRP-зависимые пути, например, метформин, как регулятор передачи сигнала и каннабидиол, как регулятор эндоканнабиоидной системы (Hagerman et al., 2017). Несмотря на активную разработку подходов для таргетной терапии, симптоматическая терапия остается в настоящее время основной. Антипсихотики, такие, как рisperидон и аripипразол, остаются единственными зарегистрированными FDA препаратами, чья эффективность доказана клинически (Howes et al., 2018).

Этиологические подходы к лечению синдрома ломкой X-хромосомы основаны на обратимости эпигенетических изменений в промоторной области гена *FMR1* и потенциально являются наиболее эффективными, так как воздействуют на непосредственную причину заболевания. В настоящее время наиболее перспективными являются два подхода для этиологического лечения (рис. 10).

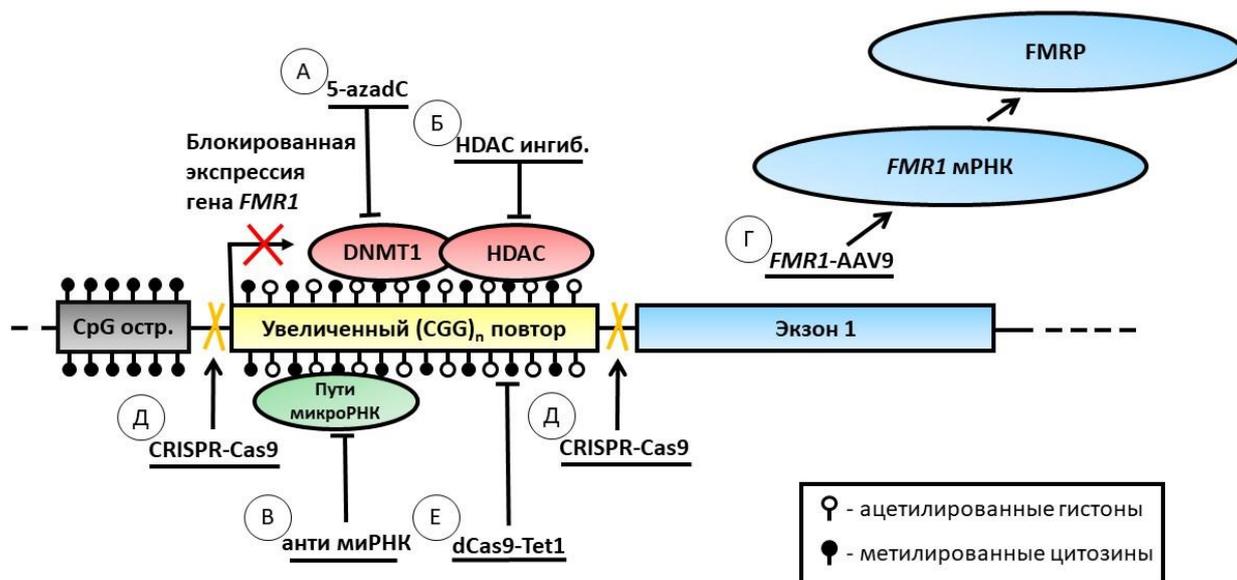


Рисунок 10. Подходы для терапии синдрома ломкой X-хромосомы.

А, Б – фармакологическая реактивация гена *FMR1*, В – использование некодирующих РНК для терапии синдрома ломкой X-хромосомы, Г, Д, Е – генотерапевтическая реактивация гена *FMR1*. Обозначения: 5-azadC – 5-азадезоксцитидин, DNMT – ДНК-метилтрансфераза, HDAC – деацетилаза гистонов, AAV – аденоассоциированный вирус. Пояснения в тексте.

Первый подход – это фармакологическая реактивация гена *FMR1* с помощью различных препаратов, например, 5-азадезоксцитидина (5-azadC) (см. рис. 10А). Этот метод позволяет очень эффективно влиять на метилирование ДНК и модификации гистонов, однако имеет свои ограничения из-за высокой цитотоксичности (Tabolacci et al., 2016a). Второе направление – это генотерапия, которая позволяет корректировать непосредственно изменения в геноме, служащие причиной развития заболевания. В настоящее время получены данные о полном деметилировании промотора гена *FMR1* и его реактивации при таргетном редактировании CGG повтора (см. рис. 10Д) (Park et al., 2015; Xie et al., 2016). В следующем разделе рассмотрим подробнее разрабатываемые технологии для этиологического лечения синдрома ломкой X-хромосомы.

1.10.2. Фармакологическая реактивация экспрессии гена *FMR1*

Экспансия CGG повторов в промоторной области гена *FMR1* более 200 триплетов приводит к тому, что ДНК-метилтрансферазы узнают образующиеся CpG островки и метилируют цитозины в последовательности CGG. Это служит сигналом для гетерохроматинизации и последующего подавления экспрессии гена. Белок MeCP2 узнает метилированный цитозин и активирует деацетилазы гистонов, которые удаляют ацетильные группы на N-концах гистонов H3 и H4 в районе метилирования, что в итоге приводит к конденсации хроматина (Saldarriaga et al., 2014). На сегодня для реактивации экспрессии гена *FMR1* проводятся исследования ряда химических агентов, которые являются ингибиторами ферментов, отвечающих за гетерохроматинизацию. Одно из важных веществ, обладающих реактивирующим эффектом – 5-азадезоксцитидин. При синтезе цепи ДНК данный агент встраивается в нее вместо цитидина, что приводит к необратимому ковалентному связыванию ДНК-метилтрансферазы I. Далее, при делении клеток, происходит пассивное деметилирование (Pietrobono, 2002). Ряд исследований показал, что деметилирующий эффект 5-azadC в геномной ДНК не является случайным, а ограничен специфическими районами. Реактивация транскрипции гена *FMR1* сохраняется в течение месяца после 7-ми дневной обработки клеток 5-azadC, достигая максимального уровня на 10-15 день (Tabolacci et al., 2016b). Поскольку данное вещество используется в антираковой терапии, его воздействие на человека хорошо описано. Его использование вызывает тошноту, рвоту, диарею и нейтропению (Christman, 2002). Это вводит ограничения на максимально допустимую к использованию дозу и на продолжительность лечения и, соответственно, на возможности терапии синдрома ломкой X-хромосомы. Однако, в экспериментах на гуманизированных лабораторных животных моделях, несущих ткани пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы, была получена сильная и продолжительная реактивация экспрессии гена *FMR1* с помощью ингибиторов ДНК-метилтрансфераз. Кроме того, выяснилось, что эффективность эпигенетической терапии повышается при использовании комбинаций химических

агентов, ремоделирующих хроматин, в особенности если они воздействуют на различные этапы эпигенетической регуляции (Vershkov et al., 2019).

Ингибиторы других ферментов модификации хроматина – деацетилаз гистонов – также исследуются (см. рис. 10Б). Так, при обработке лимфобластоидных линий клеток, полученных от пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы, тремя веществами: 4-фенилбутиратом, бутиратом натрия и трихостатином А, появилась постоянная незначительная реактивация гена *FMR1*. В случае использования этих веществ в комбинации с 5-azadC приводило к повышению уровня мРНК гена *FMR1* в 2-5 раз большему, чем при обработке только 5-azadC. Это указывает на синергический эффект гиперацетилирования гистонов и деметилирования ДНК при реактивации полных мутаций *FMR1* (Chiurazzi et al., 1999).

1.10.3. Терапия синдрома ломкой X-хромосомы с помощью некодирующих РНК

Механизм развития синдрома основан на отсутствии РНК-связывающего белка FMRP при полной мутации (Lozano et al., 2016). Этот белок отвечает за синаптическую пластичность. Он взаимодействует с мРНК в дендритах и подавляет трансляцию синаптических белков. Кроме того, FMRP вовлечен в пути РНК-интерференции и регуляцию трансляции рецепторов важных нейробиологических путей, также через взаимодействие с микроРНК (Liu et al., 2015). Например, FMRP взаимодействует с miR-125b для регуляции экспрессии рецептора NMDA, который влияет на синаптическую пластичность (Edbauer et al., 2010). Более того, при взаимодействии с miR-125a FMRP может обратимо ингибировать трансляцию мРНК PSD-95, кодирующую важный фактор для локализации глутаматного рецептора и функций синапса (DeMarco et al., 2019).

Кроме участия в нейробиологических путях, зависящих от FMRP, некодирующие РНК могут регулировать экспрессию этого белка. Известно, что пути РНК-интерференции влияют на эпигенетическую регуляцию работы генов, в том числе и при синдроме ломкой X-хромосомы (Holoach, Moazed, 2015). В 2004 году была предложена модель, описывающая участие РНК-интерференции в

метилировании повтора CGG. Согласно данной модели, предполагается, что малые РНК образуются в результате гидролиза двуцепочечной РНК, несущей CGG повтор. Это предположение сформулировано на основе двух наблюдений: такая двуцепочечная РНК может быть гидролизована ферментами семейства РНКаз III, и полностью метилированный повтор CGG активно транскрибируется на ранних этапах эмбрионального развития (Jin et al., 2004). Уровень экспрессии FMRP также снижается в клеточных линиях пациентов без полной мутации, но с мутацией в 3'-нетранслируемой области. Оказалось, что с мутантным участком связывается miR-130b, что и приводит к снижению экспрессии (Suhl et al., 2015). В дополнение в модели данио-рерио обнаружена отрицательная корреляция между уровнем транскриптов *fmr1* и *fmr1*-микроРНК. Данная микроРНК индуцирует метилирование промотора гена *fmr1*, что и приводит к инактивации гена и потере белка Fmrp (Lin, 2015).

В дополнение к РНК-интерференции, в регуляции эпигенетического состояния района гена *FMR1* принимают участие длинные некодирующие РНК (днРНК) (Holoch, Moazed, 2015). Они ассоциированы со многими ферментами, которые участвуют в модификациях хроматина для регуляции экспрессии (Wang et al., 2019). При синдроме ломкой X-хромосомы описан целый ряд днРНК, например, FMR4, FMR5, FMR6, AsFMR1. Так, FMR6 представляет собой сплайсированный вариант антисенс транскрипта, гомологичного экзонам 15-17, который, благодаря такой структуре, может регулировать экспрессию гена *FMR1*. Предполагается, что эта днРНК регулирует трансляцию FMRP непосредственно, либо через взаимодействие с miR-19a и miR-19b в 3'-нетранслируемой области гена *FMR1* (Pastori et al., 2014).

Все описанные некодирующие РНК могут быть потенциальной мишенью для терапии (см. рис. 10B). В настоящее время терапия на основе микроРНК развивается достаточно быстрыми темпами, и большое количество препаратов против различных заболеваний находятся на завершающих этапах клинических испытаний с многообещающими результатами (Rupaimoole, Slack, 2017). Наиболее перспективной стратегией терапии может быть анти-микроРНК терапия,

направленная на микроРНК, которые участвуют в гетерохроматинизации промоторной области гена *FMR1*.

1.10.4. Генотерапия в лечении синдрома ломкой X-хромосомы

Генотерапия – это одна из самых перспективных и многообещающих областей современной биотехнологии и медицины. Этот подход позволяет лечить заболевания, обусловленные изменениями в геноме, которые невозможно излечить существующими методами. На сегодняшний день проведено множество исследований, показавших высокую эффективность генотерапии в борьбе с заболеваниями на клеточных и животных моделях. Также уже происходит внедрение генотерапевтических подходов в медицинскую практику. Например, препарат Zolgensma (onasemnogene aberavovect-xioi), разработанный компанией Novartis, был одобрен FDA США в мае 2019 года. Это препарат на основе аденоассоциированного вируса для терапии спинальной мышечной атрофии (SMA) (Нюу, 2019). Проводится также ряд исследований для разработки генотерапии синдрома ломкой X-хромосомы. В ранних исследованиях удалось установить, что экспрессия FMRP у мышей, нокаутных по гену *fmr1*, приводила к частичному восстановлению нормального фенотипа, т.е. к уменьшению макроорхидизма, тревожности и частоты судорог. При этом экспрессию восстанавливали с помощью доставки кДНК гена *FMR1* человека с помощью искусственных хромосом дрожжей (YAC) (Peier et al., 2000; Gantois et al., 2001; Musumeci et al., 2007).

Последующие исследования основаны на стратегии использования рекомбинантных аденоассоциированных вирусов (rAAV), несущих кодирующую последовательность гена *FMR1*. Первая проверка этого подхода показала, что инъекция вектора *FMR1-AAV5* в гиппокамп мышей, нокаутных по гену *fmr1*, корректировала продолжительную депрессию, которая являлась результатом нарушенной синаптической пластичности (Zeier et al., 2009). В другом исследовании вектор *FMR1-AAV9* (см. рис. 10Г) с нейронспецифичным промотором гена синапсин-1 вводили в боковые желудочки пятидневных мышей, нокаутных по гену *fmr1*. Экспрессия трансгенного FMRP была обнаружена во

многих отделах переднего мозга и отсутствовала в отделах, удаленных от места введения. В результате прекращались повторяющиеся движения и восстанавливалось социальное поведение, но при этом сохранялась двигательная гиперактивность и оставалось нарушенным звуковое восприятие (Gholizadeh et al., 2014). В дальнейшем в этой же лаборатории параллельно с использованием вектора, несущего последовательность гена, в качестве отрицательного контроля стали использовать вектор AAV9-null (вместо фосфатного буфера, используемого в первоначальных исследованиях). Кроме того, были два варианта гена под промоторами разной силы. Аналогично, после введения вектора в желудочки максимальная экспрессия трансгенного FMRP наблюдалась в структурах переднего мозга, и гораздо ниже уровень экспрессии был в удаленных отделах. Применение векторов *FMR1*-AAV кроме корректировки поведения на молекулярном уровне корректирует экспрессию синаптического белка PSD-95 и одного из ключевых белков, регулирующих транскрипцию и обеспечивающих функционирование нервной системы – MeCP2. В результате терапевтический эффект достигался при экспрессии 35-115% от уровня экспрессии дикого типа. В тоже время гиперэкспрессия в пределах 115-235% от дикого типа имела очень слабый терапевтический эффект, либо он вообще отсутствовал и при очень сильной гиперэкспрессии (в 2,5-6 раз больше, чем в диком типе) наблюдали гиперактивность (Arsenault et al., 2016).

Самые современные генотерапевтические подходы основаны на использовании системы CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами) (см. рис. 10Д). Их использование для лечения синдрома ломкой X-хромосомы было изучено несколькими группами, и удалось получить делецию CGG повторов в ИПСК человека, несущих полную мутацию гена *FMR1*. Плазмиду, несущую гены Cas9 и направляющие РНК, фланкирующие CGG повтор, вводили в клетки электропорацией. При этом происходила полная делеция повтора с эффективностью 2-3%. Наблюдалось деметилирование промотора и образование транскрипционно-активного хроматина. Ген *FMR1* был реактивирован, и его

экспрессия сохранялась после дифференцировки клеток в нейроны (Park et al., 2015). Делеция повтора с помощью двух фланкирующих направляющих РНК приводила к восстановлению экспрессии гена до 67% от нормы в случае гибридных клеток и до 20% от нормы в ИПСК. В клетках с реактивацией происходило снижение метилирования промоторной области гена, в то время как в клетках с делецией повтора, но с отсутствием экспрессии гена метилирование промотора сохранялось. Предполагается, что неполное деметилирование связано с низкой пролиферативной активностью клеток. Для эффективной реактивации гена *FMR1* клетки должны делиться (Xie et al., 2016).

Другой подход для деметилирования промоторной области гена *FMR1* в ИПСК был разработан с использованием комплекса dCas9-Tet1/sgRNA (см. рис. 10E), доставляемого с помощью лентивируса. dCas9-Tet1 – это особый инструмент редактирования, состоящий из каталитически неактивного фермента Cas9 и фермента Tet1, индуцирующего деметилирование цитозинов. Целевое деметилирование в этом случае реактивирует экспрессию гена *FMR1* и восстанавливает активный хроматин в промоторной области. Офф-таргет эффект в случае использования такого инструмента минимальный. Такой подход позволяет восстанавливать нормальный электрофизиологический фенотип нейронов, который сохраняется даже после трансплантации таких клеток в мозг лабораторных мышей. Кроме того, такой подход позволяет восстановить экспрессию гена и в постмитотических нейронах, хотя и в меньшей степени чем в ИПСК (Liu et al., 2018).

Аналогичный подход использовали, сшивая dCas9 с активатором транскрипции VP192, для таргетной реактивации гена. Была получена очень сильная реактивация гена *FMR1* в эмбриональных стволовых клетках и нейрональных клетках-предшественниках. Однако при этом не была детектирована экспрессия белка FMRP. Транскрипция активировалась сильнее, если направляющие РНК были нацелены на CGG повтор, а не на промотор (Haenfler et al., 2018).

В первом эксперименте по генотерапии синдрома ломкой X-хромосомы *in vivo* были использованы наночастицы золота с Cas9 и Cpf1 нуклеазами, которые

доставляли прямо в головной мозг мышей. При этом мишенью для нокаута был ген *grm5*, кодирующий метаботропный глутаматный рецептор 5. После данной процедуры снижалось количество рецепторов и снижалось проявление повторяющегося поведения модельных животных (Lee et al., 2018).

Фармакологические подходы к терапии большинства заболеваний на сегодня остаются самыми распространенными и принятыми в клиническую практику, однако наравне с этим активно внедряются и современные подходы, основанные на молекулярно-биологических механизмах. В случае синдрома ломкой X-хромосомы мишенью для таргетной терапии является ген *FMR1*, не работающий у пациентов. Параллельное развитие двух подходов для реактивации экспрессии этого гена – химической реактивации и генотерапии – в конце концов должно привести к созданию современного и эффективного метода терапии заболевания.

1.11. Заключение по обзору литературы

Группа наследственных заболеваний, называемых фраксопатиями с момента своего открытия и до настоящего времени была достаточно хорошо изучена как с точки зрения клиники, так и на молекулярно-генетическом уровне. Это обусловлено высокой распространенностью и социальной значимостью этих заболеваний. На сегодня известен локус *FMR1* отвечающий за развитие этих патологий и тип мутации – экспансия повторов. Описан механизм нарушения работы гена, который приводит к развитию заболевания. Фраксопатии оказались многофакторной патологией как с точки зрения клиники, так и с точки зрения молекулярных механизмов их развития. Проведено большое количество исследований механизма самой экспансии, однако до сих пор нет единой общепринятой модели формирования этой мутации, которая, вероятнее всего, комплексная и зависит от разных этапов метаболизма ДНК. Возможно, сама молекулярная природа CGG повтора и его способность формировать различные вторичные структуры лежат в основе его нестабильности.

Мутации гена *FMR1* являются плейотропными, поскольку белок FMRP является важным регулятором трансляции и участвует в путях микроРНК. Также

подтверждено участие кодирующей цепи гена *FMR1* в развитии патологий за счет синтеза антисенс транскрипта, и наличие RAN-трансляции этой матричной РНК. Однако динамическая природа мутации экспансии повторов делает молекулярную природу заболевания еще более сложной, за счет соматической нестабильности, которая отражается на проявлении фраксопатий и требует детального исследования.

В настоящее время достаточно развиты и эффективны методы диагностики фраксопатий, однако крайне трудоемки и не всегда доступны к использованию в учреждениях здравоохранения. Но наиболее актуальным медицинским вопросом исследования фраксопатий является разработка методов терапии, которой на сегодня не существует, кроме малоэффективных симптоматических подходов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Модельные лабораторные мыши

Трансгенная линия мышей, использованная в работе, была получена в НИН (Национальных институтах здоровья, США) путем замены повтора CGG нормальной длины в гене *fmr1* на повтор длиной около 130 триплетов, и последующим скрещиванием с линией C57/BL6 (Entezam et al., 2007).

Мыши содержались в питомнике лабораторных животных НИН в соответствии с «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals». Работы с животными проводили в согласовании с NIDDK Animal Care and Use Committee (Комитет по содержанию и использованию животных Национального института диабета, заболеваний почек и пищеварительной системы).

2.1.2. Биологический материал пациентов с фраксопатиями

Биоматериал пациентов с фраксопатиями был получен из NICHD Brain and Tissue Bank for Developmental Disorders (Банк головного мозга и тканей пациентов с нарушениями развития, США).

Один образец ДНК был любезно предоставлен Др. Салли Нолин (Институт фундаментальных исследований нарушений развития, США).

2.1.3. Пациенты с фраксопатиями

Клиническое обследование пациентов с фраксопатиями и их родственников проведено на базе ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница №1» медицинскими генетиками, неврологами и психиатрами. Периферическую венозную кровь от каждого индивидуума собирали в пробирки с ЭДТА и замораживали до выделения ДНК.

Процедура обследования пациентов и здоровых лиц с целью получения необходимого материала всегда начиналась с беседы, в которой пациент или его

опекун подробно ознакомился с целью научного проекта, предстоящей ему программой обследования и значимостью полученных результатов. Процедура привлечения к обследованию была построена строго в соответствии с международными требованиями, которые включают в себя: информированность обследуемого, согласие его на проведение обследования в полном объеме и обеспечение конфиденциальности. В случаях, когда обследуемый являлся несовершеннолетним, подобную процедуру получения информированного согласия проводили с его родителями. Все исследования соответствовали этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной Медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Кроме того, исследования проводились под контролем локальных этических комитетов ГБУЗ Новосибирской области «Городской клинической больницы №1», ФГБУН Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, ФГБУН Института «Международный томографический центр» СО РАН.

В цитогенетическом анализе использованы образцы следующих индивидуумов:

CPG10, мать CPG9 и CPG11, женщина, 43 года, анеуплоидия по X-хромосоме, маркерные хромосомы дериваты X-хромосомы, премутация по гену *FMR1* в гетерозиготе.

CPG9, сын CPG10, мужчина, 24 года, умственная отсталость не сопряженная с ломкой X-хромосомой.

CPG11, сын CPG10, мужчина, 19 лет, синдром ломкой X-хромосомы.

2.1.4. Линии клеток

B95-8, лимфоциты периферической крови эдипова тамарина (*Saguinus oedipus*), иммортализованные вирусом Эпштейна-Барр. Линия получена из клеточного хранилища НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи.

GM06891, В-лимфоциты клинически здорового мужчины, иммортализованные вирусом Эпштейна-Барр. Возраст 29 лет. Брат пациента с синдромом ломкой X-хромосомы. Размер CGG повтора в гене *FMR1* 100-118 триплетов. Линия получена из клеточного репозитория Института медицинских исследований Кориелла (США).

GM06865, В-лимфоциты клинически здорового мальчика, иммортализованные вирусом Эпштейна-Барр. Возраст 9 лет. Брат пациента с синдромом ломкой X-хромосомы. Линия получена из клеточного репозитория Института медицинских исследований Кориелла (США).

GM06895, В-лимфоциты клинически здорового мужчины, иммортализованные вирусом Эпштейна-Барр. Возраст 55 лет. Отец пациента с синдромом ломкой X-хромосомы. Размер CGG повтора в гене *FMR1* 23 триплета. Линия получена из клеточного репозитория Института медицинских исследований Кориелла (США).

GM03200, В-лимфоциты мужчины с синдромом ломкой X-хромосомы, иммортализованные вирусом Эпштейна-Барр. Возраст 34 года. Метилированная полная мутация по гену *FMR1*, отсутствие экспрессии этого гена. Линия получена из клеточного репозитория Института медицинских исследований Кориелла (США).

GM04025, В-лимфоциты мужчины с синдромом ломкой X-хромосомы, иммортализованные вирусом Эпштейна-Барр. Возраст 29 лет. Метилированная полная мутация по гену *FMR1*. Размер CGG повтора в гене *FMR1* 645 триплетов. Отсутствует экспрессии этого гена. Линия получена из клеточного репозитория Института медицинских исследований Кориелла (США).

GM06897, В-лимфоциты мужчины с синдромом ломкой X-хромосомы, иммортализованные вирусом Эпштейна-Барр. Возраст 25 лет. Неметилированная полная мутация по гену *FMR1*. Размер CGG повтора в гене *FMR1* 477 триплетов. Незначительная экспрессия этого гена. Линия получена из клеточного репозитория Института медицинских исследований Кориелла (США).

CPG52, В-лимфоциты женщины, матери пациента с синдромом ломкой X-хромосомы, иммортализованные вирусом Эпштейна-Барр. Возраст 27 лет. Размер

CGG повтора в гене *FMRI* 35, 143, 210 и 277 триплетов. Линия получена в рамках данного исследования.

CPG67, В-лимфоциты мальчика с синдромом ломкой X-хромосомы, иммортализованные вирусом Эпштейна-Барр. Возраст 11 лет. Размер CGG повтора в гене *FMRI* 35 и 203 триплета. Линия получена в рамках данного исследования.

2.1.5. Зонды для FISH

RP11-489K19 (Empire Genomics, США). ВАС-клон. Координаты встройки CHRX: 146772515-146932347. Содержит ген *FMRI*.

RP11-351H6 (Empire Genomics, США). ВАС-клон. Координаты встройки CHRX: 150072311-150273165. Содержит ген *GPR50*.

Пэйнтинг-проба X-хромосомы любезно предоставлена проф. Малколмом А. Фергюсон-Смитом из Кембриджского университета (Великобритания).

2.1.6. Праймеры, использованные в работе

Таблица 3. Характеристики праймеров, использованных в работе.

Название	Последовательность '3'	Референс
Наработка пэйнтинг-проб для FISH		
6MW	CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG	Telenius et al., 1992
Анализ репликативной активности, локус <i>FMRI</i>		
FraX-7SX	CAAGCATAAGATGCCCAATGCCATATG	NC_000023.11
FraX-7DX	ACCAGATGATCTTCCAAAGTGGCTG	NC_000023.11
FraX-6.2DX	CGGAAAAGGCAAAATTCTGCAGA	NC_000023.11
FraX-6.2SX	TGTGTTGCATAGCTCTGTGGGTTT	NC_000023.11
FraX-SX	AACAGTGCTGGAATAACTGGAC	Gray et al., 2007
FraX-DX	CTTCACTTCATTCCAGTGCATG	Gray et al., 2007
FraX-3SX	CTGAAAACCTTAAGGTGCAGGG	Gray et al., 2007
FraX-3DX	CTCCAAGTGTAAGCTGTTGTTC	Gray et al., 2007
FraX-2SX	AGCATCCCGAAGGGAACATGG	Gray et al., 2007

FraX-2DX	ACTGTATGTGCACCCTGTGCC	Gray et al., 2007
FraX-1.SX	TCCCGACTCAATCCATGTCCC	Gray et al., 2007
FraX-1.DX	AGGCGAGAATAGGGGTGAAGG	Gray et al., 2007
FraX-1.4SX	CCTATTCTCGCCTTCCACTCC	Gray et al., 2007
FraX-1.4DX	ATTCTGCAGAGGTGCACTCA	Gray et al., 2007
FraX-1cSX	TCTGTCTTTCGACCCGGCAC	Gray et al., 2007
FraX-1cDX	GGAAGTGAAACCGAAACGGAG	Gray et al., 2007
FraX-11SX	TCCAATGGCGCTTTCTACAAGG	Gray et al., 2007
FraX-11DX	GCTGGTCTCTCATTTCGATAGG	Gray et al., 2007
FraX-12SX	TTTCAGGAAGACCCTAACATGG	Gray et al., 2007
FraX-12DX	GAAGTTTCATGGCATATATTTAGG	Gray et al., 2007
FraX-13SX	GTTACACCATTGCAGATCAACTAACACC TT	NC_000023.11
FraX-13DX	CTATTGCCAAAATACTGTAGTAAGGTGG GAT	NC_000023.11
FraX13AF	GAGGCAAAAGGTAACCCCGCGT	NC_000023.11
FraX13AR	TAGTGCCAGAAATCTAGTGACCAAACC A	NC_000023.11
FraX-14SX	CTGAGTTGCTTGTCCAGTGGGATG	NC_000023.11
FraX-14DX	GTCCTTGCAAATATGGTGGTTATGTTAG GCA	NC_000023.11
FraX-16SX	AGTCAATTATTGGGGTCAACCAC	NC_000023.11
FraX-16DX	GGGCAGAAATCAGAAACTCCAG	NC_000023.11
FraX-17SX	GTGAGCAGTGGTTCCTGTTGGTAAG	NC_000023.11
FraX-17DX	GTCCCTAATTTACTAGCAACTGGGCCA	NC_000023.11
FraX-18SX	AGCCACCTTGGGTATAGCACAAACATA	NC_000023.11
FraX-18DX	CTCTTAAGGAAAACCTATGGAAGCTGAGA CAGG	NC_000023.11
FraX-19SX	CCAGCTTTGCACTCACTACCACATTG	NC_000023.11
FraX-19DX	TTGCCACCTTGTATGTGCTATACCC	NC_000023.11
FraX-20SX	AACCCTATTTCTGGCTCTGGAC	Gray et al., 2007

FraX-20DX	CCCTCCAAGTTATCAAAGATTCC	Gray et al., 2007
Анализ репликативной активности, локус <i>lamin B (LMNB2)</i>		
LB2C1-SX	5'-GTТААСАGTCAGGCGCATGGGCC-3'	Gray et al., 2007
LB2C1-DX	5'-CCATCAGGGTCACTCTGGTTCC-3'	Gray et al., 2007
LO-F	5'-GCGTCACAGCACAACCTGC-3'	Gray et al., 2007
LO-R	5'-TCTTTCTTAGACATCCGCTTC-3'	Gray et al., 2007
Определение длины CGG повтора у человека и мыши		
frax-F	AGCCCCGCACTTCCACCACCAGTCTCCT CCA	NC_000023.11
Frax-AF	GCTGCCAGGGGGCGTGCGGCA	NC_000023.11
Flz2a	CATGTTCTCTTCAGCCCTGCTAGCGCCG GGAGCCCG	Lavedan et al., 1998
Frax-c	GCTCAGCTCCGTTTCGGTTTCACTTCCGG T	Fu et al., 1991
NewFraxC	CTCAGCTCCGTTTCGGTTTCACTTCCGGT	NC_000023.11
NewFraxR4	TAGACCTTGTAGAAAGCGCCATTGGAGC CCCGCA	NC_000023.11
Анализ метилирования локуса CGG		
FraxMetF	CCCGCCCTCCACCAAGCCCGC	Стрельников и др., 1999
FraxMetR	CTCCGTCACCGCCGCGCCCG	Стрельников и др., 1999

2.2. Методы

2.2.1. Получение клеток семенников лабораторных мышей

Для получения клеток семенники лабораторных мышей извлекали через разрез на брюхе, промывали средой А (DMEM/F12(1:1)), очищали семенные каналцы и помещали в 6 мл среды А. После отмывки в среде семенные каналцы переносили в PBS и 1х антибиотиком-антимикотиком (15240-062, Gibco, США), отмывали и помещали в глициновый буфер (1М глицин, 20 мМ HEPES, pH 7,2). В этом буфере их измельчали ножницами и инкубировали при комнатной температуре. Общее время нахождения семенных каналцев в глициновом буфере 8 мин. После этого семенные каналцы переносили в 50 мл пробирку, содержащую 35 мл глицинового буфера, и перемешивали инвертированием. Центрифугировали при 200g 5 мин, сливали супернатант и разбивали осадок в 35 мл подогретой до 33°C среды В (DMEM/F12 (1:1), 8,2% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 1х антибиотик-антимикотик). Повторяли центрифугирование. После центрифугирования добавляли раствор коллагеназы/гиалуронидазы (DMEM/F12 (1:1), 1мг/мл коллагеназы (4196, Worthington, США), 1 мг/мл гиалуронидазы (H3506, Sigma-Aldrich, США) в количестве 2 мл на один семенник и инкубировали при температуре 32,5°C в течение 30-45 мин с перемешиванием каждые 10-15 минут. После этого доводили объем смеси до 35 мл средой В и перемешивали, чтобы разбить клетки. Затем центрифугировали при 200g 5 мин, сливали супернатант и снова промывали средой В с последующим центрифугированием как описано выше. После чего осадок суспендировали в 30 мл среды С (DMEM/F12 (1:1), 5,5% сыворотки крови лошадей, 2,4% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 1х антибиотик-антимикотик). Пипеткой аккуратно убирали сгустки ДНК и фильтровали суспензию через стерильный фильтр с диаметром пор 41 мкм с помощью вакуумного насоса. Фильтрат переносили в 50 мл пробирки и доводили объем до 35 мл с помощью среды С. Центрифугировали как описано выше и сливали супернатант. После центрифугирования снова суспендировали в 35 мл среды С и измеряли концентрацию клеток с помощью счетчика клеток. Клетки рассаживали в чашки Петри диаметром 10 см в 10 мл среды С в концентрации

$1,25 \times 10^7$ клеток/чашка. Чашки помещали в CO_2 -инкубатор на 65 часов при $32,5^\circ\text{C}$ и концентрации CO_2 5,5%.

Параллельно с этим подготавливали 12-луночные планшеты, покрытые ламинином (5 мг/см^2). Для этого брали 150 мкл раствора ламинина с концентрацией 1 мг/мл и разбавляли в 8 мл охлажденной среды А. Добавляли по 1 мл готового раствора в лунку и инкубировали ночь при 4°C после чего переносили в CO_2 -инкубатор. Также готовили чашки Петри диаметром 10 см, покрытые коллагеном. Для этого готовили коллаген в концентрации 50 мкг/мл в 0,02М уксусной кислоте. Добавляли 1 мл полученного раствора на чашку, инкубировали 1 час при комнатной температуре, после чего убирали раствор коллагена и дважды промывали PBS. Хранили при 4°C .

Покрытые коллагеном чашки Петри ополаскивали средой С три раза, после чего добавляли 4 мл среды С и ставили в CO_2 -инкубатор на $32,5^\circ\text{C}$ при концентрации CO_2 5,5%.

С полученных ранее культур клеток семенников после 65 часов инкубации убирали питательную среду и аккуратно промывали средой А и затем PBS с 1х антибиотиком-антимикотиком. Популяцию генеративных клеток смывали с помощью пипетки средой А. Под фазово-контрастным микроскопом контролировали отделение половых клеток от соматических, прикрепленных к поверхности лунки. Полученную суспензию переносили в 15 мл пробирки. Популяция соматических клеток оставалась прикрепленной к поверхности лунки, ее оставляли для дальнейшей работы. Половые клетки осаждали при 200g как описано выше и меняли среду на 4 мл свежей среды С, суспендировали и переносили на покрытые коллагеном чашки Петри, которые уже содержали 4 мл среды, до финального объема 8 мл. Культуру инкубировали 4 часа при $32,5^\circ\text{C}$ и концентрации CO_2 5,5%, во время инкубации один раз клетки суспендировали.

После этого суспендировали культуру, и несвязавшиеся с коллагеном клетки (Col_{NB}) переносили в 50 мл пробирку и осаждали при 200g. Затем клетки суспендировали в 8 мл среды Е (DMEM/F12 (1:1), 10% FBS, 1х антибиотик-антимикотик, 0,00024% β -меркаптоэтанол) и фильтровали через 70 мкм фильтр в

новую 50 мл пробирку. Полученную суспензию раскапывали по 1 мл в лунку. Клетки инкубировали 40-50 минут при 32,5°C и концентрации CO₂ 5,5%, в середине этого периода клетки суспендировали пипетированием. После инкубации клетки, не связавшиеся с ламинином (Lam_{NB}), со всех лунок переносили в пробирку. Прикрепившиеся клетки семенников (Lam_B) дважды промывали средой E и затем раствором PBS-BSA (PBS, 0,5% BSA) и оставляли в этом растворе на 4 минуты в CO₂-инкубаторе при тех же условиях. После этого клетки снимали пипетированием и переносили в центрифужные пробирки, содержащие среду E. Контроль снятия всех клеток проводили под фазовоконтрастным микроскопом. Подсчет полученных несоматических клеток семенников проводили с использованием автоматического счетчика клеток.

2.2.2. Выделение отделов головного мозга лабораторных мышей

Проводили декапитацию животных и замораживали головной мозг с использованием сухого льда. Отделение мозжечка и различных отделов мозга производили с помощью инструментов для биопсии Harris Uni-Core (Electron Microscopy Sciences, США), размером 1,25 мм в криостате (Leica, Германия) при температуре -20°C.

2.2.3. Культивирование иммортализованных клеточных линий В-лимфоцитов

Линии иммортализованных В-лимфоцитов культивировали в питательной среде RPMI 1640, содержащей 1x GlutaMAX (35050-038, Gibco, США), 10-15% FBS в зависимости от жизнеспособности линии и антибиотика. Клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂ и 37°C. При концентрации клеток 7x10⁵ кл/мл и выше их рассаживали до концентрации 3x10⁵ кл/мл.

Иммортализованные В-лимфоциты замораживали в среде RPMI 1640, содержащей 20% FBS и 6% диметилсульфоксида.

Идентификацию клеточных линий на разных пассажах в сравнении с исходной линией проводили путем анализа SNP с использованием платформы Sequenom MassARRAY iPLEX™ (Bioserve Biotechnologies, США).

2.2.4. Иммуортализация В-лимфоцитов пациентов

Иммуортализацию В-лимфоцитов периферической венозной крови пациентов проводили как описано ранее (Lemskaya, 2018). Для этого 5×10^6 клеток линии В95-8, инфицированных вирусом Эпштейна-Барр, помещали в 10 мл среды RPMI-1640, содержащей 1x GlutaMAX (35050-038, Gibco, США), 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота и антибиотики. Один-два раза в неделю собирали среду, меняя ее на новую. Собранную питательную среду фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм для получения вирусного стока, который хранили при -70°C .

Образцы крови, собранные в вакутейнеры с гепарином (Vacutest, Кима, Италия) оставляли на столе при комнатной температуре до образования двух фракций. Затем верхнюю фракцию, содержащую сыворотку и моноклеары, переносили в культуральный флакон и добавляли 4 мл полной ростовой среды RPMI-1640, 4 мл вирусного стока и 0,04 мг/мл циклоспорина А (Goldbio, США). Клетки инкубировали в CO_2 -инкубаторе при 5% CO_2 и 37°C . Через неделю половину среды заменяли на свежую, содержащую 1-3% фитогемагглютинаина-М (L3010, BioWest, Франция). Культура считалась иммуортализованной, когда клетки начинали формировать конгломераты и их число удваивалось или утраивалось в течение недели.

2.2.5. Индукция ломких сайтов FRAXA и приготовление препаратов метафазных хромосом

Для индукции ломкого сайта FRAXA клетки инкубировали в полной ростовой среде, содержащей 0,1 мкМ 5-фтордезоксифторуидина (F0503, Sigma-Aldrich, США) в течение 18 часов. После этого клетки инкубировали в присутствии 100 нг/мл

колцемида KaryoMAX (15212012, Gibco, США) 2 часа. Клетки центрифугировали при 500g 5 минут и сливали супернатант. Осадок суспендировали в 3 мл гипотонического раствора 0,75 М КСl, нагретого до 37°C. После этого клетки инкубировали 20 мин при 37°C. Предфиксацию проводили добавлением 1 мл фиксатора метанол/уксусная кислота (3:1), охлажденного до -20°C. Суспензию инкубировали 10 минут при +4°C. Далее клетки центрифугировали 5 минут при 500g, сливали супернатант и добавляли 2 мл свежего ледяного фиксатора. Перед приготовлением препаратов фиксатор снова меняли. Препараты метафазных хромосом готовили раскапыванием суспензии на мокрые предметные стекла во влажной камере.

2.2.6. Флуоресцентная *in situ* гибридизация

ВАС-клоны, несущие гены *FMR1* и *GPR50*, метили биотином или дигоксигенином в реакции NICK-трансляции с использованием наборов BioNick DNA Labeling System (18247015, ThermoFisher, США) или DIG-Nick Translation Mix (11745816910, Roche, Швейцария). В мечение брали 1 мкг ДНК и инкубировали в 20 мкл реакционной смеси в течение 90 минут при 15°C. После этого пробирки помещали в лед и оценивали размер полученных фрагментов с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле. Ожидаемый размер составлял 200-500 п.н. Если полученные фрагменты превышали ожидаемый размер, проводили дополнительно 15 мин инкубации при 15°C. Реакцию останавливали добавлением 1мкл 0,5М ЭДТА. Меченные зонды хранили при -20°C.

Мечение пэинтинг-пробы X-хромосомы производили с использованием DOP-ПЦР в реакционной смеси, содержащей 67 мМ трис-НСl pH 9.4, 18 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% твин-20, 2,5 мМ MgCl₂, по 0,25 мМ d(ATP, GTP, CTP), 0,1 мМ dTTP, 0,05 мМ биотин-11-dUTP или дигоксигенин-11-dUTP, 1 мкМ 6MW-праймер (см. таблицу 3), 2 е.а. Taq ДНК-полимеразы (СибЭнзайм, Россия), 0,25 мкг хромосомной библиотеки. После начальной денатурации 96°C – 4 мин, проводили 25 циклов (94°C – 30 сек, 54°C – 58°C по 30 сек на каждый градус, 72°C – 2 мин). Количество продукта анализировали с помощью электрофореза.

Полученные препараты метафазных хромосом обрабатывали протеиназой К в концентрации от 0,025 мкг/мл до 0,05 мкг/мл в зависимости от суспензии в течение 10 минут при комнатной температуре. Отмывали 2 раза по 5 минут в 2xSSC при комнатной температуре. После этого препараты дегидратировали в серии спиртов комнатной температуры с концентрацией 70%, 80% и 96% по 2 минуты в каждом и сушили на воздухе. Денатурацию метафазных хромосом проводили в растворе 70% деионизованного формамида в 2xSSC. После этого препараты проводили через серию спиртов 70%, 80% и 96%, охлажденных до -20°C по 2 минуты в каждом и 96% комнатной температуры 2 минуты. Сушили на воздухе.

В расчете на одно предметное стекло брали 150 нг меченного зонда, смешивали с 10 мкг Cot1 ДНК человека (15279011, Invitrogen, США) и 10 мкг ДНК моллюска (AM9680, Invitrogen, США). Полученную смесь осаждали добавлением 1/10 объема 3М NaAc и 2,5 объемов 96% этанола и выдерживали в течение ночи при -20°C. После этого центрифугировали при 15000g в течение 25 минут при 4°C, убирали супернатант и промывали осадок охлажденным до -20°C 75% этанолом. После этого повторяли центрифугирование и убирали супернатант. Осадок высушивали и растворяли в 7 мкл деионизованного формамида (F9037, Sigma-Aldrich, США) в течение 1 часа при 37°C на термошейкере при перемешивании со скоростью 750 об/мин.

Готовили мастер-микс, содержащий 20% декстрансульфата (S4030, Millipore, США) и 4xSSC. К растворенному зонду добавляли 7 мкл мастер-микса и перемешивали на термошейкере при 37°C и 750 об/мин в течение часа. После этого зонд центрифугировали при комнатной температуре на 15000g в течение 6 минут и аккуратно переносили супернатант в новую пробирку. Полученный раствор денатурировали при 96°C в течение 5 минут, переносили в лед на 3 минуты и проводили предгибридизацию повторенных последовательностей при 37°C в течение 1 часа. После этого зонд центрифугировали на 15000g в течение 3 минут и наносили на препарат. Гибридизацию проводили под покровным стеклом в течение ночи во влажной камере при 37°C.

После гибридизации покровные стекла смывали ополаскиванием в 2xSSC. Отмывку проводили в растворе 50% деионизованного формамида в 2xSSC три раза по 5 минут при температуре 45°C. Затем под покровное стекло наносили блокирующий буфер (3% BSA, 4xSSC, 0,1% Tween-20) и инкубировали 30 минут при 37°C во влажной камере.

Конъюгаты (FITC-авидин, Alexa-555-стрептавидин, анти-DIG-Fluorescein) разводили в блокирующем буфере до концентраций 4-10 мкг/мл и центрифугировали при 15000g в течение 6 минут и аккуратно переносили супернатант в новую пробирку. Конъюгаты наносили под покровное стекло на препарат после блокирующего буфера и инкубировали 45 минут при 37°C во влажной камере. Отмывку проводили в растворе 4xSSC/0,1% Tween-20 при 45°C три раза по 5 минут. После этого препараты помещали в 0,2xSSC на одну минуту при комнатной температуре и дегидратировали в серии спиртов концентраций 70%, 80% и 96% по 2 минуты в каждом и сушили на воздухе. На препарат наносили 10 мкл DAPI (D3571, Invitrogen, США) в 50% глицерине с добавлением 10 мкг/мл флуорогеля (17985-10, EMS, США) и покрывали покровным стеклом. До анализа с помощью флуоресцентного микроскопа препараты хранили при +4°C.

В каждом эксперименте анализировали не менее 100 метафазных пластинок. Для статистической обработки применяли точный критерий Фишера и критерий χ^2 -квадрат (с поправкой Йейтса), используя Microsoft Excel и онлайн калькулятор GraphPad (www.graphpad.com).

2.2.7. Исследование ломкости хромосом и митотического индекса

Десять миллионов клеток в течение 18 часов инкубировали в полной ростовой среде, содержащей 0,1 мМ 5-фтордезокситуридина (F0503, Sigma-Aldrich, США) и/или от 3нМ до 30 мМ камптотецина (C9911, Sigma-Aldrich, США). Перед фиксацией к клеткам добавляли коллемеид KaryoMAX (15212012, Gibco, США) в концентрации 75 нг/мл и инкубировали в течение 2 часов при 37°C. Затем добавляли KCl и фиксировали, как описано в разделе 2.2.5. Гибридизацию с ВАС-клонами, несущими гены *FMRI* и *GPR50*, проводили как описано в разделе 2.2.6.

Анализ и подсчет метафаз осуществляли с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DB5500. Для каждого эксперимента анализировали, по крайней мере, 100 метафазных пластинок. Метафазный/митотический индекс рассчитывали, как отношение количества метафазных пластинок к общему количеству клеток в поле зрения. При анализе индекса подсчет проводили до тех пор, пока общее количество клеток не достигало 2000-3000. Статистическую значимость рассчитывали с использованием точного теста Фишера, используя онлайн калькулятор GraphPad.

2.2.8. Обработка клеток ингибиторами деацетилаз гистонов и оценка жизнеспособности клеточной культуры

Стоковый раствор 5-азадезоксцитидина (A3656, Sigma-Aldrich, США) в воде в концентрации 10 мМ готовили заранее, аликвотировали и хранили при -20°C. Растворы трихостатина А (T8552, Sigma-Aldrich, США) в концентрации 0,5 мМ, ромидепсина (Toronto Research Chemicals, Канада) в концентрациях 15 мкМ, 50 мкМ, 250 мкМ и вориностата (SML0061, Sigma-Aldrich, США) в концентрациях 250 мкМ, 0,5 мМ, 5 мМ готовили на стерильном 100% диметилсульфоксиде и хранили при -20°C. Для обработки 5-азадезоксцитидином клетки рассаживали в концентрации 5×10^5 кл/мл в 10 мл среды. Реагент добавляли ежедневно в объеме 10 мкл до конечной концентрации 10 мкМ в течение 8 дней. После этого собирали по 2×10^6 клеток для выделения РНК и белка, дважды промывали 1xPBS и хранили при -80°C. В случае остальных ингибиторов клетки рассаживали в концентрации 7×10^5 кл/мл в 15 мл среды и добавляли ингибиторы в различных концентрациях в объеме 15 мкл. К контрольным клеткам добавляли 15 мкл диметилсульфоксида. Через 72 часа инкубации собирали по 5×10^5 клеток для выделения РНК и белка, дважды промывали 1xPBS и хранили при -80°C.

Жизнеспособность клеточной культуры оценивали с помощью окрашивания трипановым синим и подсчетом окрашенных и неокрашенных клеток с помощью камеры Горяева. Жизнеспособность была определена как $X = \left(1 - \frac{a}{b}\right) * 100$, где X

– жизнеспособность клеточной культуры, а – количество окрашенных клеток, b – общее количество клеток.

2.2.9. Количественный анализ мРНК

Тотальная РНК из различных органов лабораторных мышей была выделена с использованием реагента Trizol™ (15596026, Invitrogen, США). Ткань гомогенизировали с помощью ножниц и гомогенизатора Поттера на льду, добавляли Trizol в расчёте 1 мл реагента на 50 мг ткани и дополнительно гомогенизировали. После этого образец инкубировали 5 минут. Затем в гомогенат добавляли хлороформ из расчёта 200 мкл на 1 мл исходного Trizol, перемешивали и инкубировали 3 минуты. Образцы центрифугировали при 12000g в течение 15 минут на 4°C. После этого отбирали верхнюю прозрачную фазу, не задевая интерфазу, и переносили в новую пробирку. Добавляли изопропанол из расчета 0,5 мл на 1 мл исходного Trizol. Инкубировали 10 мин при 4°C и центрифугировали при 12000g в течение 10 минут на 4°C. В случае низких концентраций РНК инкубацию проводили в течение ночи при -20°C. Осадок РНК промывали 75% этанолом, охлажденным до -20°C, высушивали и растворяли в деионизованной воде с добавлением ингибитора РНКаз RiboLock (E00381, ThermoFisher, США) до концентрации 1 ед./мкл. Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре.

Затем РНК обрабатывали ДНКазой I и проводили обратную транскрипцию с помощью набора SuperScript VILO™ cDNA synthesis kit (Life Technologies, США) по протоколу производителя.

Для анализа уровней мРНК в органах лабораторных мышей проводили ПЦР в реальном времени в трех технических повторах с использованием системы TaqMan fast universal PCR master mix (Applied Biosystems, США) с использованием зондов TaqMan, гомологичных мРНК гена *FMR1* производства Applied Biosystems. В таких экспериментах использование стандартных генов домашнего хозяйства (*β-actin*, *Gapdh* и *Ubc9*) для нормализации не представляется возможным из-за их различной активности в разных органах, поэтому была использована нормализация значений Ct в этих органах на значение Ct в сердце.

При исследовании влияния ингибиторов деацетилаз гистонов РНК из культур клеток выделяли с использованием набора для выделения РНК (CCR-100, Биосилика, Россия) по протоколу производителя. Обратную транскрипцию ставили с набором iScript_Select cDNA Synthesis Kit (BioRad, США). ПЦР в реальном времени проводили с использованием набора iQ_SYBR_Green Supermix (BioRad, США). Последовательности праймеров и нормализацию результатов проводили как было описано ранее (Brendel et al., 2013) по уровням экспрессии генов *FMRI* и *GAPDH*. За единицу был принят уровень экспрессии гена *FMRI* в клеточной линии GM06895. Статистический анализ проводили с использованием двухвыборочного t-критерия Стьюдента в онлайн калькуляторе GraphPad (www.graphpad.com). Эксперимент проводили в трех биологических повторах. Изменения считались достоверными при $P < 0,05$, где P это ошибка первого типа.

2.2.10. Определение длины CGG повтора

Геномную ДНК из органов, клеток или периферической венозной крови выделяли с использованием набора Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, США) по протоколу производителя.

Размер повтора CGG в органах лабораторных мышей и тканях человека определяли с помощью фрагментного анализа. Реакционная смесь для ПЦР в 50 мкл содержала: 100 пМ каждого праймера, 200 мкМ 4dNTP, 2% диметилсульфоксида, 2,5 М бетаина и 1 мкл Expanded High Fidelity PCR system (Boehringer Mannheim, Германия) в соответствующем буфере. Реакцию проводили по следующей схеме: (1) 95°C – 10 мин; (2) 95°C – 1 мин; (3) 65°C – 1 мин; (4) 75°C – 5 мин; шаги 2-4 повторяли 35 раз; (5) 72°C – 10 мин.

Прямой и обратный праймеры F_{gax}-с и Flz2a (см. таблицу 3) имели длину 25 и 24 н. соответственно и локализовались непосредственно возле повтора, таким образом размер ПЦР продукта составлял сумму длины повтора и 49 п.н. праймеров. Индекс соматической нестабильности рассчитывали для каждого органа для 3-5 мышей в группе по методу Ли с соавторами (Lee et al., 2010). Размер повтора у человека определяли аналогичным образом, но с использованием праймеров f_{gax}-

F и fraх-AF (см. таблицу 3). В состав ПЦР продукта кроме повтора и самих праймеров входила также фланкирующая область длиной 124 п.н.

Размер повтора в образцах периферической венозной крови пациентов определяли по специальному протоколу амплификации GC-богатых матриц. Реакционная смесь для ПЦР содержала: 75 mM трис-HCl (pH 8,8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% об. Tween-20, 2 mM MgCl₂, 0,2 мкМ прямого и обратного праймеров NewFрахС и NewFрахR4 (см. таблицу 3), 0,2 mM каждого dNTP, 2,5 M бетаина, 2,5% диметилсульфоксида, 2,5 ед. акт. Таq ДНК-полимеразы (СибЭнзайм, Россия), 1 ед. акт. Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher, США), 30 нг геномной ДНК. Реакцию амплификации проводили по следующей схеме: (1) 95°C – 1,5 мин; (2) 95°C – 30 сек; (3) 55°C – 30 сек; (4) 72°C – 2,5 мин; шаги 2-4 повторяли 40 раз, затем добавляли дополнительно такое же количество ферментов; (6) 95°C – 1,5 мин; (7) 95°C – 30 сек; (8) 59°C – 30 сек; (9) 72°C – 1,5 мин; шаги 7-9 повторяли 17 раз; (10) 72°C – 10 мин. Пример электрофореза продуктов ПЦР представлен в Приложении 1.

Для точного определения размера ПЦР продуктов их очищали с помощью набора для очистки из ПЦР смесей (28104, Qiagen, Нидерланды) растворяли в 9 мкл деионизованного формамида, добавляли 0,5 мкл стандарта длин 1200LIZ (Applied Biosystems, США) и анализировали на генетическом анализаторе ABI 3130XL (Applied Biosystems, США). Обработку результатов осуществляли с использованием программного обеспечения PeakScanner 2.0 (Applied Biosystems, США).

2.2.11. Анализ метилирования промоторной области гена *FMRI*

Определение метилирования промоторной области гена *FMRI* проводили как описано В.В. Стрельниковым с соавторами (Стрельников и др., 1999). Геномную ДНК гидролизовали метилчувствительной эндонуклеазой рестрикции *AspLEI* (СибЭнзайм, Россия) после чего амплифицировали с использованием праймеров FрахMetF и FрахMetR, гомологичных промоторной области и фланкирующих участков гидролиза. Результаты ПЦР анализировали электрофоретически на

наличие/отсутствие продукта амплификации. В случае отсутствия метилирования происходил гидролиз промоторной области и, как результат, отсутствие амплификации.

2.2.12. Анализ репликативной активности в районе повтора CGG

Для анализа репликативной активности 70×10^6 клеток инкубировали в 70 мл полной ростовой среды с добавлением 0,1М 5-фтордезоксисуридина (F0503, Sigma-Aldrich, США) или без него в течение 2-х или 18-ти часов. Затем клетки промывали 1xPBS и собирали в 240 мкл 1xPBS с 10% глицерином. 1% агарозу плавил в дистиллированной воде и охлаждали до 60°C. После этого добавляли NaOH до концентрации 50 мМ и ЭДТА до концентрации 1 мМ и заливали гель для электрофореза. Буфер для электрофореза содержал 50мМ NaOH и 1мМ ЭДТА. Клетки помещали в лунки геля для электрофореза и оставляли на 15 минут для лизиса. После этого проводили электрофорез в течение 5-6 часов при 30V. Затем гель нейтрализовали в 1xTAE и окрашивали бромистым этидием. Фракцию ДНК размером 0,5-1 т.п.н. вырезали из геля и выделяли с помощью QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, США). ПЦР в реальном времени проводили с использованием набора Power SYBRw Green PCR Master Mix (4368577, Applied Biosystems, США) согласно протоколу производителя с добавлением 0,1 мкМ соответствующего праймера (рис. 30, Таблица 3) и 10 нг ДНК. Ранее было показано, что увеличенный повтор влияет на эффективность ПЦР с использованием прилежащих праймеров (Gray et al., 2007). Однако мы показали, что эффективность амплификации не зависит от положения праймера относительно повтора (Приложение 2), поэтому дополнительный гидролиз геномной ДНК перед реакцией не проводили. Для построения стандартной кривой использовали геномную ДНК линии клеток GM06865. Абсолютное количество ПЦР продукта определяли после нормализации на стандартную кривую, построенную на основе геномной ДНК. Поскольку количество вновь синтезированных цепей зависело от клеточной линии, дополнительно проводили нормализацию на количество вновь синтезированных цепей в ориджине

репликации в гене ламина В2. Каждая точка была выражена как доля максимального пика в общем объеме данных. Для каждой клеточной линии было проведено три независимых биологических повтора, рассчитано среднее и стандартное отклонение для каждой пары праймеров.

2.2.13. Исследование ориджинов репликации *in silico*

Данные для глубокого секвенирования вновь синтезированных цепей из клеточной линии НСТ116 и эмбриональных стволовых клеток человека для анализа ориджинов репликации гена *FMR1* были получены из базы данных NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Данные для линии K562 были взяты из публикации (Martin et al., 2011).

Ориджины в районе гена *FMR1* были визуализированы двумя путями. Приложение IGV 2.3.18 The Broad Institute's Integrative Genomics Viewer (<http://www.broadinstitute.org/igv/>) было использовано для анализа TDF файлов, содержащих данные по каждой клеточной линии. Это давало возможность визуализировать активность ориджинов в участке протяженностью 100 т.п.н. отцентрованном на ген *FMR1*, что позволило определить границы ориджинов на 5' конце гена. Области ориджинов были определены и экспортированы как файлы BED. Затем с помощью геномного браузера UCSC (<https://genome.ucsc.edu/>) был проведен анализ и аннотация небольших районов гена *FMR1* с использованием BED файлов как треки. Приложение Sequence Manipulation Suite (<http://www.bioinformatics.org/sms2/index.htm>) было использовано для анализа последовательностей в области ориджинов. Поиск квадруплексов осуществлен с помощью приложения QGRS Mapper (<http://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/analyze.php>).

2.2.14. Анализ времени репликации

GEO данные GSM500933, GSM500943 и GSM923447 для линий клеток BG02, C0202-1 и IMR90 соответственно были загружены из базы данных NCBI Gene

Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>). Для данных GSM500943 был использован скрипт для конвертации oligoID в геномные позиции hg18 и инструмент liftOver (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgLiftOver>) для конвертации в геномные позиции hg19. Для получения данных визуализации, сравнимых с GSM500943, файл WaveSignal для данных GSM923447 в формате bigwig был конвертирован в формат bedGraph с использованием программы bigWigtoBedGraph (<http://genome.ucsc.edu/goldenPath/help/bigWig.html>).

2.2.15. Вестерн-блот анализ

Органы лабораторных мышей гомогенизировали в лизирующем буфере (150 mM NaCl, 1% TritonX-100, 0,5% дезоксихолат натрия, 0,1% SDS, 5 mM ЭДТА, 50 mM Трис-НСl pH 8,0) с добавлением ингибитора протеаз Pierce Protease Inhibitor Mini Tablets без EDTA (ThermoFisher, США) из расчёта 500 мкл на 10 мг ткани. Образцы инкубировали на льду в течение 1 часа при регулярном помешивании. Затем центрифугировали в течение 30 мин при 14000g и 4°C. Супернатант, содержащий белок отбирали в новую пробирку.

Для выделения ядерных белков клетки промывали 1xPBS и суспендировали в сахарозном буфере (0,32 M сахарозы, 10 mM трис-НСl (pH 8,0), 3 mM CaCl₂, 2 mM ацетата магния, 0,1 mM ЭДТА). Перед использованием в сахарозный буфер добавляли 0,5% NP-40, 1 mM ДТТ, 0,5 mM фенилметилсульфонил фторида из расчёта 100 мкл буфера на 10⁷ клеток. Пипетировали и центрифугировали при 500g в течение 5 мин при 4°C. Убирали супернатант, а осадок ядер промывали 1 мл сахарозного буфера без NP-40. Снова центрифугировали в тех же условиях и убирали супернатант. Осадок суспендировали в низкосолевого буфере (20 mM HEPES (pH 7,9), 1,5 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 0,2 mM ЭДТА, 25% глицерина, перед использованием добавляли 0,5 mM ДТТ, 0,5 mM фенилметилсульфонил фторида) из расчёта 30 мкл буфера на 10⁷ клеток. Добавляли равный объем высокосолевого буфера (20 mM HEPES (pH 7,9), 1,5 mM MgCl₂, 800 mM KCl, 0,2 mM ЭДТА, 25% глицерина, перед использованием добавляли 1% NP-40, 0,5 mM ДТТ, 0,5 mM фенилметилсульфонил фторида). Образцы инкубировали 30-45 минут при 4°C на

шейкере. Затем центрифугировали 15 минут при 4°C и 14000g и отбирали супернатант, содержащий ядерные белки. Концентрацию белка измеряли по Бредфорду относительно БСА, аликвотировали и хранили при -70°C.

Электрофорез белков проводили в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и затем осуществляли влажный перенос на PVDF или нитроцеллюлозную мембрану. Для детекции белков в вестерн-блот использовали антитела: anti-Msh2 (AB70270, Abcam, США), anti-Msh3 (AB74607, Abcam), anti-Msh6 (610918, BD Biosciences, США), anti-FMRP (ab130165, Abcam) и anti-GAPDH (ab9485, Abcam). Проявку блота проводили с помощью набора ECL prime kit (GE Healthcare, США) согласно инструкциям производителя. Белки MSH2/MSH3 человека, использованные в качестве положительного контроля, были любезно предоставлены Др. Шиха Гупта (Национальные институты здоровья, США).

2.2.16. Функциональная МРТ головного мозга

Функциональную МРТ головного мозга проводили на 1,5 Тл томографе Philips Achieva (Нидерланды) с использованием 8-ми канальной головной катушки NV SENSE. Последовательность fMRI: EPI 64×64×35 4 мм-iso TR/TE 3500/50, 120 объемов; референсная анатомическая последовательность: T1-TFE 256×256×64, 1×1×3 мм. Пациентам с синдромом ломкой X-хромосомы вводили пропофол из расчёта 2,3 мкг/кг. Здоровых добровольцев просили закрыть глаза для состояния покоя.

Обработку данных проводили с помощью программы Data Processing Assistant for Resting-State fMRI (DPARSFA, V4.3, <http://rfmri.org/DPARSF>) на основании SPM (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm>). После стандартных подготовительных шагов DPARSFA строила карту функциональной коннективности для 116 ROI, определенных в цифровом атласе головного мозга человека. Из всех ROI 26, которые относятся к мозжечку, не были проанализированы в этом исследовании. Статистический анализ групп функциональной коннективности был проведен с использованием SPM8. Индекс соматической нестабильности был использован независимо, как ковариат на уровне групп в обобщенной линейной модели.

Полученные статистические карты, показывающие взаимосвязь между индексами соматической нестабильности и функциональной коннективностью, имели пороговое значение $P < 10^{-5}$ с поправкой на множественное сравнение.

ГЛАВА 3. СОМАТИЧЕСКАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ПОВТОРА CGG И ЕЕ ВЛИЯНИЕ НА ПРОЯВЛЕНИЕ ФРАКСОПАТИЙ

3.1. Введение

Известно, что премутантные аллели гена *FMR1* возникают с низкой частотой из нормальных аллелей. При этом у них появляется склонность к экспансии при передаче между поколениями. Передача по отцовской линии приводит к небольшому увеличению количества повторов и зависит от возраста отца (Ashley-Koch et al., 1998). Наследование таких увеличенных аллелей имеет два последствия. Поскольку патологии при премутации, вероятно, зависят от числа повторов (Tassone et al., 2007a), это может приводить к увеличению остроты симптомов в семьях с премутацией. Также есть риск увеличения длины повторов до полной мутации при передаче между поколениями. В отличие от передачи по отцовской линии, передача премутантного повтора по материнской линии приводит к большому увеличению количества повторенных единиц и риск развития полной мутации значительно выше. Одна из гипотез, объясняющих экспансию повторов, предполагает ее возникновение в результате неправильной репликации и последующей репарации различных вторичных структур, которые формирует повтор CGG (Mirkin, 2007). В поддержку этой гипотезы в лаборатории Кэрэн Усдин в Национальных институтах здоровья (США) было показано, что белки репарации ATM (ataxia-telangiectasia, mutated) и ATR (ATM and Rad3-related) снижают риск экспансии, в то время как оксидативный стресс – повышает (Entezam, Usdin, 2008, 2009; Entezam et al., 2010). Соматическая экспансия характерна для многих заболеваний, ассоциированных с увеличением количества повторов (Telenius et al., 1994; Chong et al., 1995; Ueno et al., 1995; Manley et al., 1999; Tanaka et al., 1999; De Biase et al., 2007). Исследование этого явления на мышинных моделях указывает на то, что оно приводит к повышению остроты симптомов заболеваний и снижает возраст, при котором симптомы выявляются (Wheeler et al., 2003).

Изначально существовал ряд трудностей при изучении соматической экспансии, так как считалось, что она проявляется только при полной мутации, а

не при премутации. Гетерогенный продукт при электрофорезе CGG повтора считался артефактом, который образуется в результате добавления бромистого этидия. Однако использование Саузерн-блот анализа без бромистого этидия опровергло это заблуждение. Далее был выявлен пациент, у которого в большинстве отделов головного мозга присутствовали неметилованные повторы CGG размером от премутации до полной мутации, в то время как в теменной доле и других тканях была представлена единственная метилированная полная мутация (Taylor et al., 1999; Nolin et al., 2008).

При исследовании соматической нестабильности не всегда можно понять, какой размер повтора был исходный. Т.е. короткие аллели – это результат сокращения большого аллеля или наоборот, длинные аллели, это результат увеличения более коротких вариантов. Последствия экспансии повторов определяются комбинацией между количеством мРНК гена *FMR1* и длиной повторенного тракта. Поэтому при премутации может формироваться транскрипт, обладающий патогенными свойствами, в отличие от нормального (Jin et al., 2003). А это, в свою очередь, и приводит к передаче увеличенного аллеля в поколениях.

Ранее в лаборатории Кэрэн Усдин были получены трансгенные мыши, которые несут премутацию по гену *fmr1*. Они демонстрируют некоторые симптомы, характерные для людей с аналогичной премутацией: нейродегенерацию, нарушение функций яичников и увеличение повтора при передаче в поколениях (Entezam et al., 2007, 2010; Entezam, Usdin, 2008, 2009; Hoffman et al., 2012). В данной работе для исследования соматической экспансии использована эта линия мышей, линии клеток и образцы тканей пациентов.

3.2. Соматическая экспансия в различных органах мышей с премутацией по гену *fmr1*

Для получения детальных данных о соматической экспансии CGG повтора в различных органах мышей определяли его размер у самцов различных возрастов модельной линии. Приблизительная исходная длина повтора составляла около 130 триплетов. Повторенный тракт амплифицировали и определяли его размер с

помощью фрагментного анализа на приборе 3130XL Genetic Analyzer. Результаты обрабатывали с использованием программного продукта GeneMapper 4.0. Полученные профили размеров повторов при отсутствии мозаицизма обычно имели распределение Гаусса, в котором продукты отличались на один триплет. Максимальное количество продукта считали основным аллелем в исследуемом образце ДНК. Все дополнительные продукты амплификации, которые больше или меньше основного аллеля, вероятно, образуются в результате проскальзывания цепей во время ПЦР. В случае экспансии или сокращения размера повтора профиль распределения продукта отличался от распределения Гаусса смещением вправо или влево, более широким распределением или появлением дополнительных продуктов, соответствующих дериватному аллелю, возникшему в некоторых клеточных популяциях.

Размер CGG повтора в ДНК из различных органов мышей различных возрастов определяли путем сравнения его с размером повтора в ДНК, выделенной из хвоста этих же самых мышей в трехнедельном возрасте. В результате при анализе размера повтора в двухмесячном возрасте не только размер повтора не отличался от такового в трехнедельном возрасте, но и профиль распределения ПЦР продукта был тот же самый (рис. 11А). Это говорит об отсутствии соматической экспансии или о ее незначительности в раннем постнатальном периоде жизни мыши. Однако следует отметить одно исключение. В образцах из семенников наблюдался незначительный сдвиг вправо, и основной продукт отличался от исходного на один триплет. Незначительный уровень соматической экспансии наблюдался у четырехмесячных животных в головном мозге и печени, а также выявлен сдвиг на два триплета в семенниках (см. рис. 11А). В возрасте 12 месяцев соматическая экспансия наблюдалась у всех исследованных животных и наиболее ярко проявлялась в головном мозге, печени и семенниках. Относительно низкий уровень экспансии выявлен в почках, что отличается от данных, показанных ранее для других заболеваний, обусловленных экспансией повторов. В сердце и крови была очень низкая соматическая экспансия, даже у мышей возрастом более 12 месяцев (см. рис. 11Б). Следует отметить, что ни в одном из экспериментов не наблюдали

ни одного случая уменьшения количества триплетов в повторе CGG. Размер соматической экспансии варьировал, но был сопоставим у животных с одинаковым исходным размером повтора. Для большей наглядности рассчитывали индекс соматической нестабильности по методике Ли с соавторами (Lee et al., 2010) для каждого органа (рис. 12).

В печени и семенниках (см. рис. 11А) профиль аллелей зачастую показывает наличие двух пиков, один из которых соответствует исходному аллелю, а второй на 7-14 триплетов больше. В головном мозге мышей средний уровень экспансии оказался меньше, чем, например, в печени, но, в тоже время, разные отделы головного мозга показали разный профиль экспансии (см. рис. 11В). Так, например, в таламусе она минимальна, в то время как в полосатом и миндалевидном телах экспансия была более выражена и составила 6 и 8 триплетов соответственно.

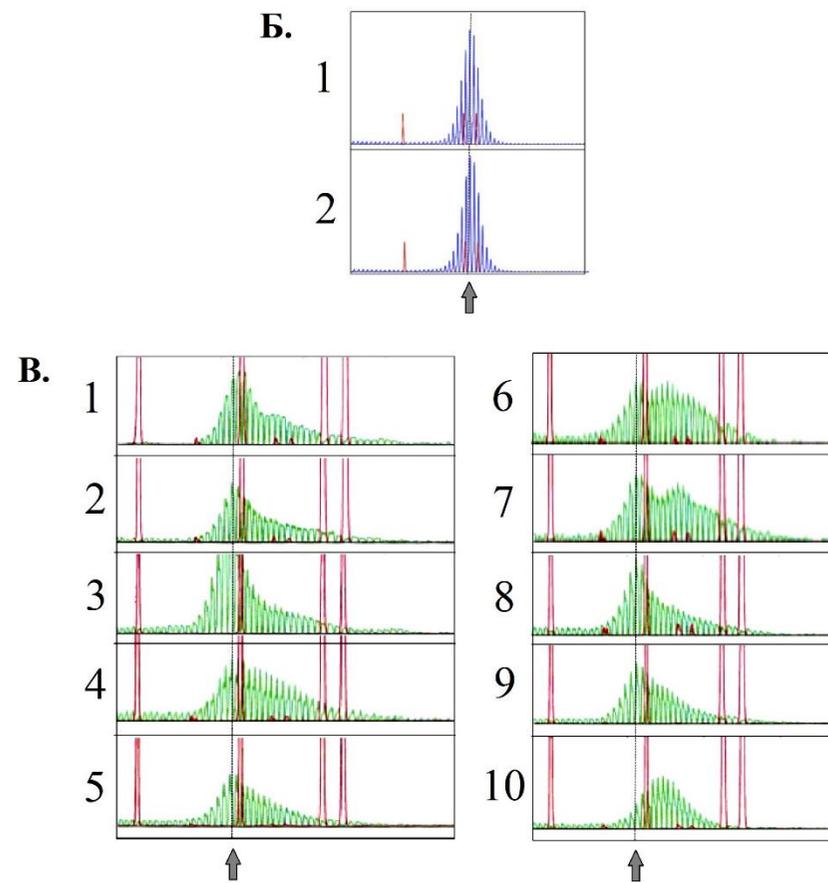
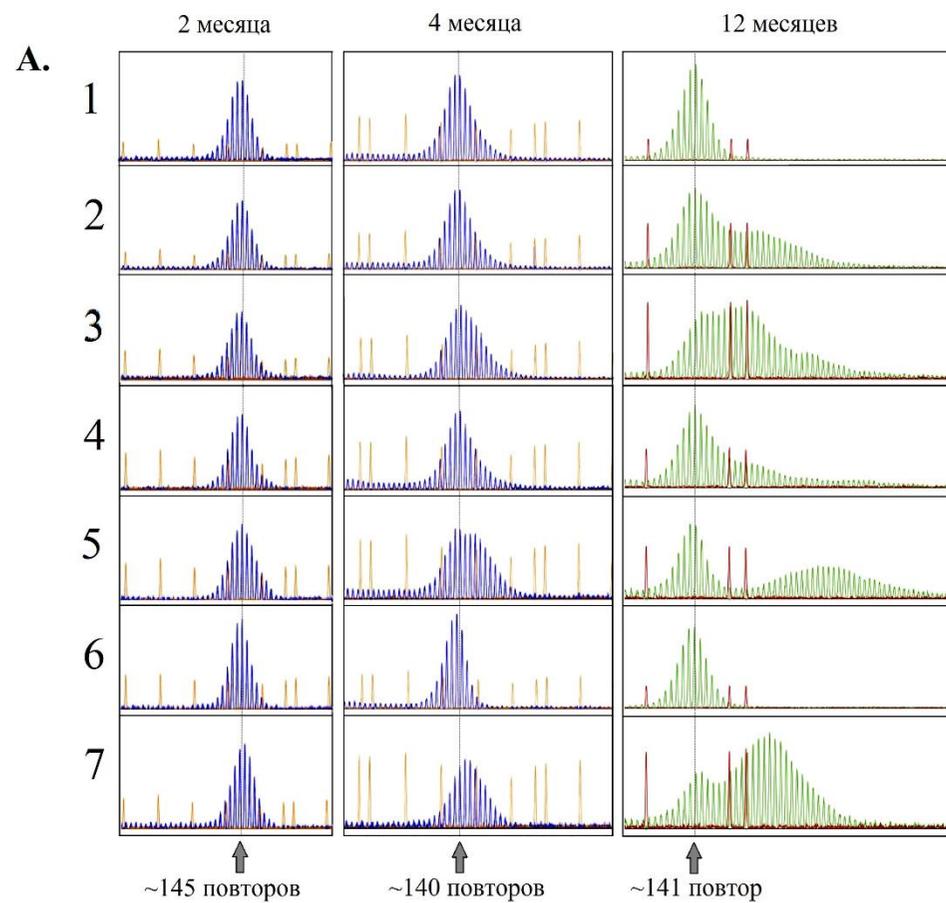


Рисунок 11. (Подрисуночная подпись на следующей странице).

Рисунок 11 (на предыдущей странице). Зависимость соматической экспансии от возраста у мышей с премутацией по гену *fmr1*.

А – профили распределения размера повтора CGG у самцов мышей разных возрастов в различных органах: 1 – хвост в 3-х недельном возрасте для сравнения, 2 – хвост в возрасте, указанном на рисунке, 3 – головной мозг, 4 – почки, 5 – печень, 6 – сердце, 7 – семенники; Б – профили распределения размера повтора CGG у 12-ти месячных самцов мышей в крови (1) и сердце (2); В – вариация размера повтора CGG в различных отделах головного мозга 12-ти месячных мышей: 1 – кора лобных полушарий, 2 – прецентральная извилина, 3 – медиальная извилина коры лобных полушарий, 4 – первичный соматосенсорный центр, 5 – задняя теменная кора, 6 – полосатое тело, 7 – миндалевидное тело, 8 – таламус, 9 – задняя часть гиппокампа, 10 – мозжечок. Вертикальная пунктирная линия указывает на исходный размер аллеля, который соответствует 3-х недельному возрасту.

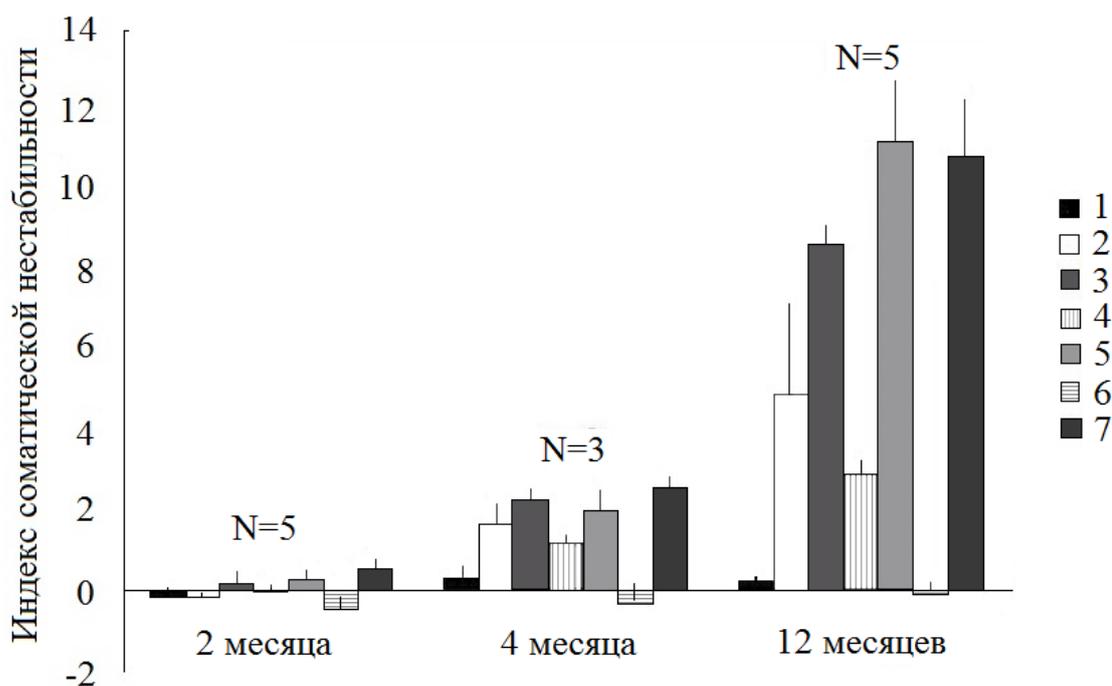


Рисунок 12. Индекс соматической нестабильности в различных органах мышей с премутацией по гену *fmr1* и исходным размером CGG повтора 141-145 триплетов.

1 – хвост в 3-х недельном возрасте для сравнения, 2 – хвост на момент исследования, 3 – головной мозг, 4 – почки, 5 – печень, 6 – сердце, 7 – семенники. N – количество исследованных животных. Вертикальные отрезки отображают доверительные интервалы.

3.3. Экспансия (CGG)_n повтора в несоматических клетках семенников

Соматическая экспансия не отражает того, что происходит с повтором CGG в половых клетках и, таким образом, не указывает на возможность передачи увеличенного аллеля следующему поколению. Анализ профиля распределения размера повторов в сперме 12-ти месячных мышей с премутацией по гену *fmr1* показал, что он отличается от такового в целых семенниках тех же самых животных (рис. 13А). В сперме наблюдался единственный пик, который превышал исходный аллель на 5 триплетов, в то время как в семенниках было два пика, один из которых соответствовал исходному аллелю, а второй превышал его на 13 повторов. С помощью «ПЦР на малом количестве матрицы» (small pool ПЦР) (см. рис. 13Б) было показано, что экспансия происходит в 75% клеток спермы, в то время как уменьшение размера повтора наблюдаются в 10%. Картина экспансии и размер повтора соответствовали таковым в потомстве самцов с таким же размером повтора (Entezam et al., 2007; Entezam, Usdin, 2008, 2009; Entezam et al., 2010).

Таким образом, анализ экспансии повторов в семенниках показал, что она происходит при передаче по отцовской линии премутантного аллеля преимущественно презиготически, что согласуется с данными, опубликованными ранее, полученными методом анализа гибридов (Entezam et al., 2007; Entezam, Usdin, 2008, 2009; Entezam et al., 2010). Следует отметить, что в тканях семенников 11-ти месячных самцов мышей, наблюдалась очевидная экспансия как во фракции, обогащенной первичными сперматоцитами, так и во фракции, обогащенной сперматогониями (см. рис. 13В). Однако во фракции соматических клеток семенников экспансия не наблюдалась. Также экспансии не было в соматических и половых клетках неполовозрелых модельных мышей 18-ти дневного возраста (см. рис. 13Г). Этот результат свидетельствует в пользу того, что экспансия не происходит в примордиальных половых клетках или просперматогониях, но начинает накапливаться в половых клетках половозрелых мышей в процессе сперматогенеза.

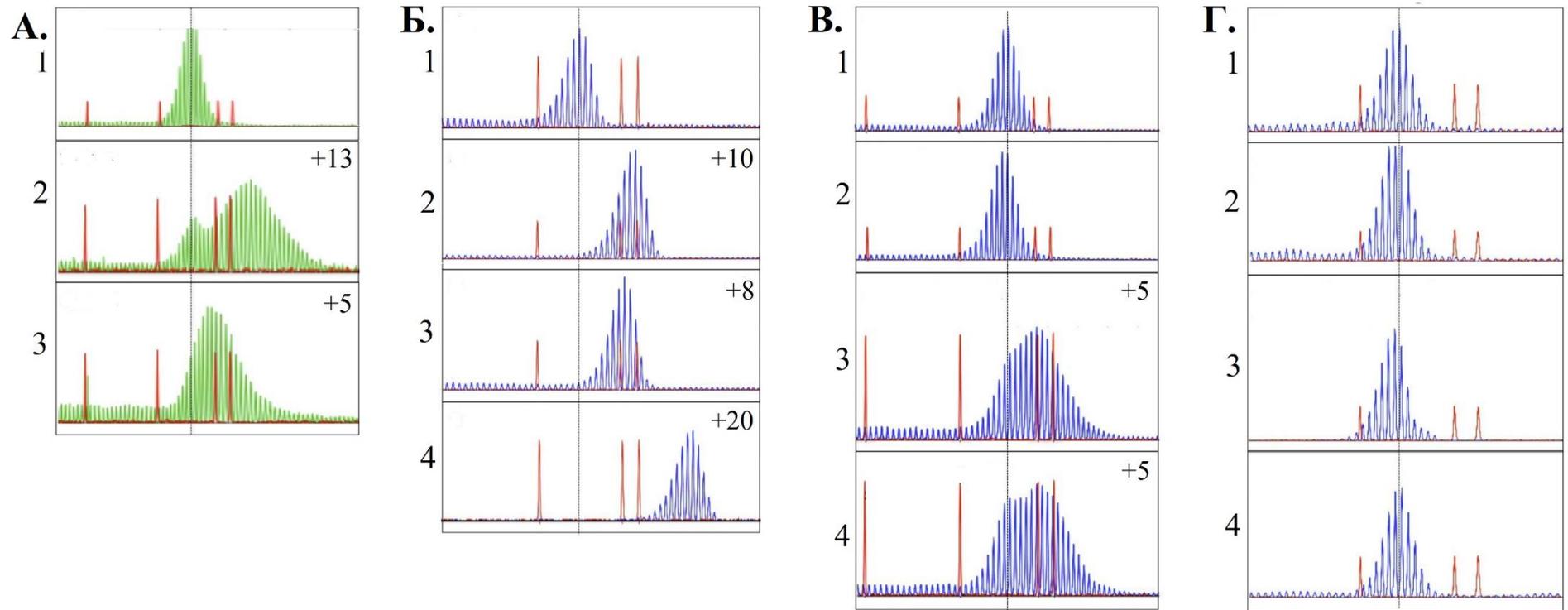


Рисунок 13. (Подрисуночная подпись на следующей странице).

Рисунок 13 (на предыдущей странице). Экспансия повторов в семенниках мышей, в зависимости от возраста животного и типа клеток.

А – сравнение количества повторов CGG в хвосте трехнедельных мышей (1) с тотальной ДНК из семенников (2) и спермы (3) 12-ти месячных мышей; Б – сравнение количества повторов CGG в хвосте трехнедельных мышей (1) с тремя независимыми микропробами (small pool PCR) из спермы 12-ти месячных мышей (2-4); В – сравнение количества повторов CGG в хвосте трехнедельных мышей (1) с количеством повторов во фракциях различных типов клеток 11-ти месячных мышей: 2 – соматические клетки, 3 – сперматогонии и сперматоциты, 4 – сперматогониальные стволовые клетки; Г – сравнение количества повторов CGG в хвосте трехнедельных мышей (1) с количеством повторов во фракциях различных типов клеток 18-ти дневных мышей: 2 – соматические клетки, 3 – сперматогонии и сперматоциты, 4 – сперматогониальные стволовые клетки.

+X – указывает размер экспансии повторов. Вертикальная пунктирная линия указывает на исходный размер аллеля, который соответствует 3-х недельному возрасту.

3.4. Соматическая экспансия и метаболизм ДНК

Причины экспансии повторов связывают с нарушениями при различных процессах метаболизма ДНК, таких как репликация, транскрипция или репарация. Поскольку уровень соматической экспансии различен в разных органах, предполагается существование возможной связи между размером экспансии и первым вероятным фактором экспансии – пролиферативной активностью клеток, т.е. частотой репликации ДНК. Печень – это орган, для которого показан наивысший уровень экспансии, особенно у взрослых мышей (см. 3.2.). Однако в клетках печени взрослых грызунов крайне редко происходят клеточные деления и события синтеза ДНК (Bohman et al., 1985). Аналогично высокий уровень экспансии показывает головной мозг, поскольку он содержит в большой пропорции слаборастущую глию и неделящиеся нейроны. Этот уровень значительно отличается в разных отделах мозга (см. рис. 11в), достигая в некоторых из них состояния, при которых экспансия настолько высокая, что практически все аллели превосходят по размеру исходный (например, в мозжечке,

см. рис. 11в). Таким образом, не наблюдается какой-либо корреляции между степенью экспансии и пролиферативной активностью клеток.

Второй фактор, который, вероятно, может влиять на соматическую экспансию, это активная транскрипция гена, в котором локализован повтор. Для оценки этого фактора был измерен уровень мРНК гена *fmr1* в различных органах мышей с премутацией по этому гену. В итоге можно установить, что уровень транскрипции сам по себе не объясняет уровень экспансии. Так, количество мРНК *fmr1* низкое в сердце (рис. 14) при низком уровне экспансии в этом органе. Однако уровень мРНК в почках намного выше, чем в печени, при том, что экспансия в печени выше (рис. 14). Следовательно, нельзя установить прямую связь между уровнем экспрессии гена *fmr1* и уровнем экспансии.

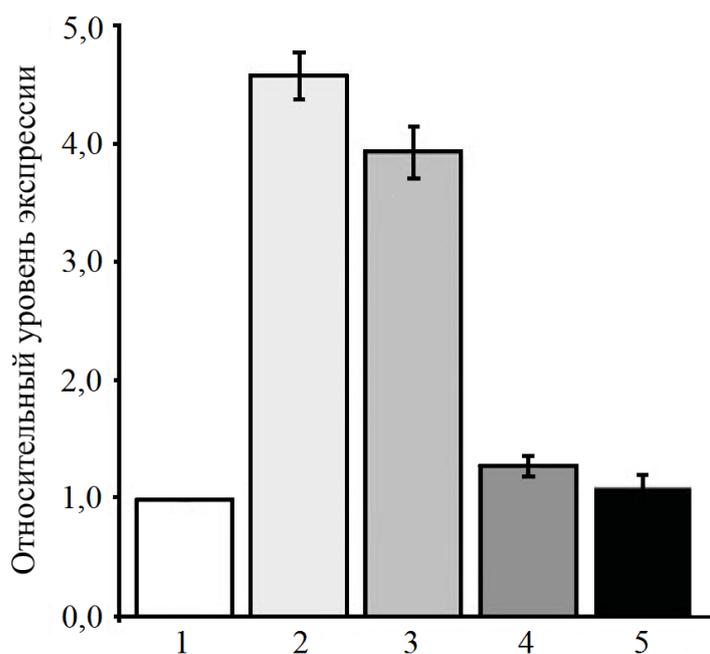


Рисунок 14. Уровень экспрессии гена *fmr1* у лабораторных мышей, носителей премутации в различных органах относительно уровня экспрессии в сердце.

1 – в сердце, 2 – в головном мозге, 3 – в почках, 4 – в печени и 5 – в семенниках. Результаты рассчитаны относительно уровня экспрессии гена *fmr1* в сердце. Вертикальные отрезки отображают доверительные интервалы.

Третий фактор метаболизма ДНК, который, вероятно, влияет на соматическую экспансию, – это репарация. Ранее было показано, что белки мисматч репарации Msh2 и Msh6, которые формируют комплекс MutS β , участвуют в экспансии повторов в мышечных моделях миотонической дистрофии I типа и болезни Хантингтона (Manley et al., 1999; Wheeler et al., 2003; Foiry et al., 2006; Tome et al., 2009). Msh2 также необходим при передаче увеличенного аллеля повтора CGG как по отцовской, так и по материнской линии (Lokanga et al., 2014b). Поскольку уровни мРНК *msh2*, *msh3* и *msh6* плохо коррелируют с уровнями соответствующих белков (рис. 15), проводилось сравнение непосредственно уровней этих белков с величиной экспансии в сердце, головном мозге, печени, почках и семенниках. Поскольку предполагается, что уровень Msh3 является лимитирующим фактором для формирования комплекса MutS β (Genschel et al., 1998; Marra et al., 1998; Chang et al., 2000), а свободный Msh3 очень быстро деградирует, то уровень этого белка в любом органе является хорошим индикатором, указывающим на уровень MutS β . Головной мозг и семенники – органы с высоким уровнем экспансии – также имеют высокий уровень Msh3 (см. рис. 15). Это должно согласоваться с идеей о том, что уровень Msh3/MutS β определяет склонность этих органов к экспансии. Однако факт того, что сердце, почки и печень имеют сходный уровень Msh3, не поддерживает указанную гипотезу, так как все эти органы имеют абсолютно разный уровень экспансии.

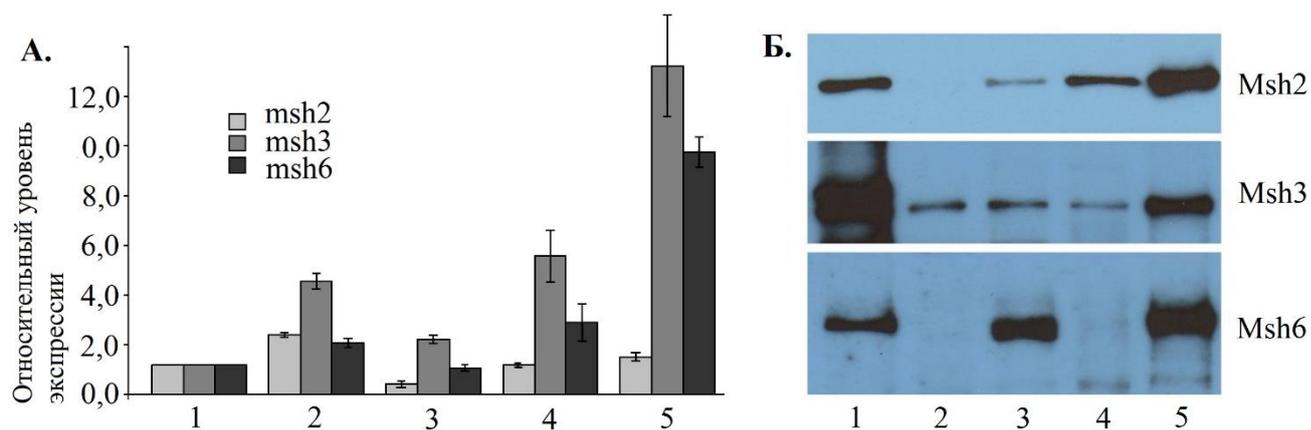


Рисунок 15. Анализ экспрессии *msh2*, *msh3* и *msh6* в различных органах мышей с премутацией по гену *fmr1*.

А – уровни мРНК исследуемых генов в сердце (1), головном мозге (2), печени (3), почках (4) и семенниках (5). Результаты рассчитаны относительно уровней экспрессии соответствующих генов в сердце. Б – вестерн-блот анализ экспрессии соответствующих белков в головном мозге (1), сердце (2), печени (3), почках (4) и семенниках (5). Вертикальные отрезки отображают доверительные интервалы.

3.5. Соматическая экспансия в культурах В-лимфоцитов и головном мозге человека

Соматическая экспансия, наблюдаемая у мышей с премутацией по гену *fmr1*, свидетельствует о возможной аналогичной картине в клетках человека. В нашей коллекции имелись выделенные в разные периоды времени в течение 42 месяцев образцы ДНК премутантной линии иммортализованных В-лимфоцитов человека GM06891 с исходным размером CGG повтора 118 триплетов (рис. 16А, Г). Образцы ДНК, выделенные после двух лет периодического культивирования, содержали очень малое количество исходных аллелей. В них преобладали аллели на 16, 35 и 51 триплет превышающие исходный (рис. 16Б, Г). В более поздних образцах преимущественно представлен аллель размером 195 триплетов, что на 77 повторов больше исходного (Приложение 3). Также присутствует небольшое количество аллелей, превышающих исходный на 45, 62, 93-96 триплетов (рис. 16В, Г).

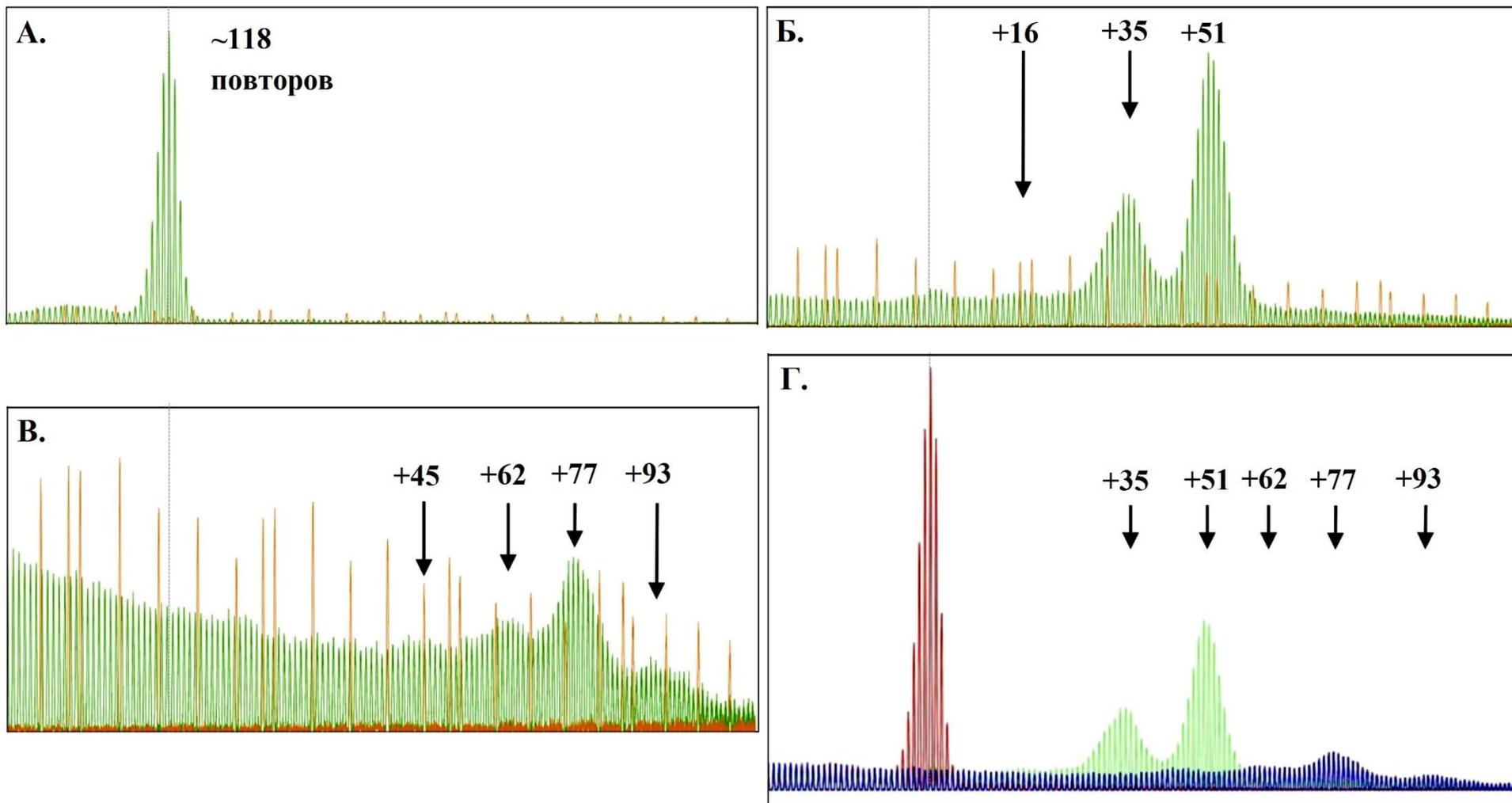


Рисунок 16. (Подрисующая подпись на следующей странице).

Рисунок 16 (на предыдущей странице). Соматическая экспансия в культуре В-лимфоцитов человека с премутацией по гену *FMR1*.

А – размер CGG повтора в культуре клеток GM06891 непосредственно после получения ее из клеточного хранилища; Б и В – размер CGG повтора в той же линии клеток, но в двух более поздних временных точках; Г – наложение всех трех временных точек в одном масштабе.

+X – количество повторов относительно исходного аллеля. Вертикальная пунктирная линия указывает на исходный размер аллеля.

В случае, когда в образце присутствуют аллели с разной длиной CGG повтора, синтез более коротких аллелей идет эффективнее, чем синтез длинных аллелей. Это объясняет низкое количество более крупных продуктов на изображениях с фрагментным анализом (см. рис. 16). Идентичность исходной линии и всех ее более поздних пассажей была подтверждена с помощью анализа SNP по 26 локусам. Шанс того, что клеточные линии, содержащие экспансию, не являются оригинальными, составляет $1,042 \times 10^{-11}$. Как было предположено ранее, отбор действует в пользу более коротких аллелей, которые продуцируют больше FMRP (Salat et al., 2000), поэтому клональная селекция крупных аллелей из исходной клеточной популяции кажется маловероятной. Таким образом, наблюдаемые изменения в размере повтора являются настоящей соматической экспансией. Как и во многих тканях мыши, экспансия в этой клеточной линии происходит скачкообразно, в этом примере на 15-19 повторов. Суммарная экспансия приводит к изменению премутантного аллеля в небольшую полную мутацию в части клеток.

Экспансия, показанная *in vitro*, в клеточных линиях человека указывает на то, что аналогичные процессы могут происходить *in vivo*. Чтобы это проанализировать проводилось исследование образцов посмертной биопсии тканей от трех пациентов с синдромом атаксии/тремора, ассоциированным с ломкой X-хромосомой. У них в крови при диагностике были выявлены аллели с размером повтора 67, 82 и 91 триплет. Повтор из 91 триплета имел одну AGG вставку в 5' области. О наличии AGG вставок в аллелях двух других пациентов нет информации. Всего два отдела головного мозга были доступны от пациента с аллелем 67 триплетов:

префронтальная кора и мозжечок. В обоих отделах были сходные профили размеров повторов с незначительным распределением ПЦР продуктов, что говорит либо об отсутствии, либо об очень низком уровне нестабильности. В случае пациента с 82 повторами была доступна сердечная ткань. Поскольку образцы сердца мыши показали очень низкую соматическую нестабильность, предполагается, что сердце человека должно иметь размер аллеля гена *FMRI* очень близкий к исходному, что в результате и подтвердили наши исследования.

Для пациента с 91 повтором не было доступной ДНК из сердца, однако были доступны образцы крови, которые забирали за 6 лет до его смерти. Хотя изменений размера аллеля по сравнению с кровью не было обнаружено в полосатом теле или мозжечке, в миндалевидном теле обнаружено присутствие незначительного количества аллелей, на 13 повторов превышающих по размеру исходный (рис. 17). Префронтальная кора показала незначительное смещение основного пика на один повтор в сторону увеличения. Также был небольшой пик, соответствующий аллелю на 8 триплетов больше исходного, и совсем маленький пик, незначительно превышающий фон. Его размер был на 19 триплетов больше, чем наблюдалось в крови. Происходит ли экспансия во всех этих регионах или в отдельных клеточных популяциях из этих отделов мозга, остается неясным.

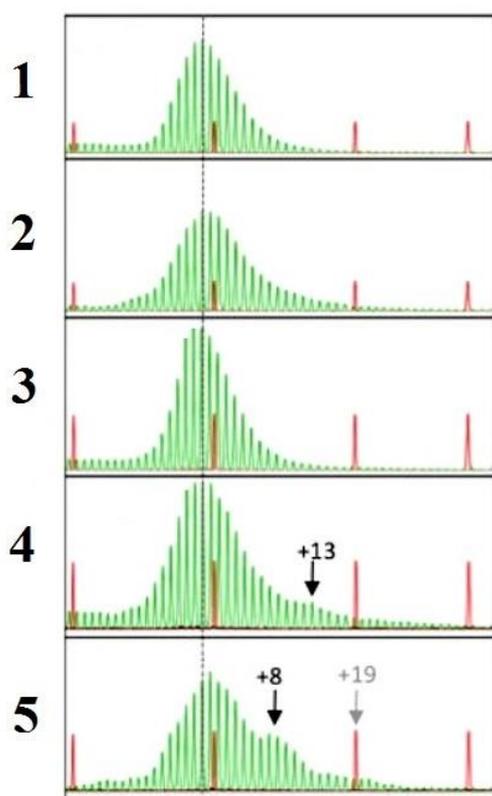


Рисунок 17. Соматическая экспансия в различных отделах головного мозга пациента с синдромом атаксии/тремора, ассоциированного с ломкой X-хромосомой, с исходным размером повтора 91 триплет.

1 – кровь, 2 – полосатое тело, 3 – мозжечок, 4 – миндалевидное тело, 5 – префронтальная кора.

+X – количество повторов относительно исходного аллеля. Пунктирная линия указывает на исходный размер аллеля.

3.6. Влияние соматической экспансии CGG повторов на изменения в головном мозге человека и нарушение когнитивных функций

Индекс соматической нестабильности – это величина, которая позволяет количественно оценить соматическую нестабильность повтора в биологическом образце. В начале данного исследования для лабораторных мышей с премутацией по гену *fmr1* расчет индекса соматической нестабильности проводили по методике, предложенной Ли с соавторами (Lee et al., 2010). Эта методика основана на определении основного пика на фрагментном анализе и последующей нормализации на сумму высот пиков. Данный подход изначально был разработан

для определения нестабильности CAG повтора, экспансия которого происходит при болезни Хантингтона. Тринуклеотидные повторы формируют вторичные структуры ДНК, которые затрудняют амплификацию при ПЦР. Стабильность этих структур напрямую зависит от последовательности повтора. Ранее было показано, что вторичные структуры с CGG повтором намного более стабильны, чем структуры, сформированные CAG повтором (Mirkin, 2007). Таким образом, амплификация CGG повтора намного менее эффективна и зависит от его длины. Более длинный CGG повтор в ПЦР нарабатывается в меньшем количестве, чем более короткий (Usdin, Woodford, 1995; Woodford et al., 1995; Jensen et al., 2010). Таким образом, для CGG повтора наиболее эффективная амплификация не обозначает превалирующей роли в определении генотипа, поэтому было решено разработать оптимизированный подход для оценки соматической нестабильности именно этого повторенного тракта.

В методике Ли с соавторами (Lee et al., 2010) индекс соматической нестабильности рассчитывается исходя из значения величины основного аллеля и разброса значений размеров остальных аллелей. В случае повтора CGG, так как нельзя выделить ни основной, ни исходный аллель, за центральное значение решено принять медиану всех значений. В этом случае нестабильность будет тем выше, чем сильнее отклоняются крайние значения размеров аллелей от медианы и чем больше количество аллелей. Таким образом, для CGG повтора, локализованного в промоторной области гена *FMRI*, оптимальным будет расчет индекса соматической нестабильности (I_{SI}) по следующей формуле:

$$I_{SI} = Me \times (N_{max} - Me),$$

где Me – медиана значений размеров повторов во всех аллелях данного образца, а N_{max} – максимальная длина CGG повтора в исследуемом образце.

Медиана – это величина, которая позволяет разделить все множество значений аллелей на две равных части. При этом учитывается гетерогенность генотипа и количество аллелей в образце, и не имеет значения представленность ПЦР продукта. Таким образом, не требуется эффективного синтеза каждого аллеля в

ПЦР, достаточно того, чтобы каждый аллель был детектирован и учтен исследователем.

Для примера рассмотрим алгоритм расчета индекса соматической нестабильности для пациентов СРG52 и СРG67. СРG52 – это женщина, имеющая генотип 35, 143, 210 и 277 триплетов (рис. 18). Медиана в этом случае равна 176,5, а I_{SI} :

$$176,5 \times (277 - 176,5) = \mathbf{17738,25};$$

У пациента СРG67 было детектировано два аллеля размером 35 и 203 триплет (рис. 18). Медиана в этом случае равна 119, а I_{SI} :

$$119 \times (203 - 119) = \mathbf{9996}.$$

Таким образом, в двух представленных примерах пациенты имеют сходные размеры повторов, однако количество аллелей отличается в два раза, что отражается в почти двукратной разнице индексов соматической нестабильности.

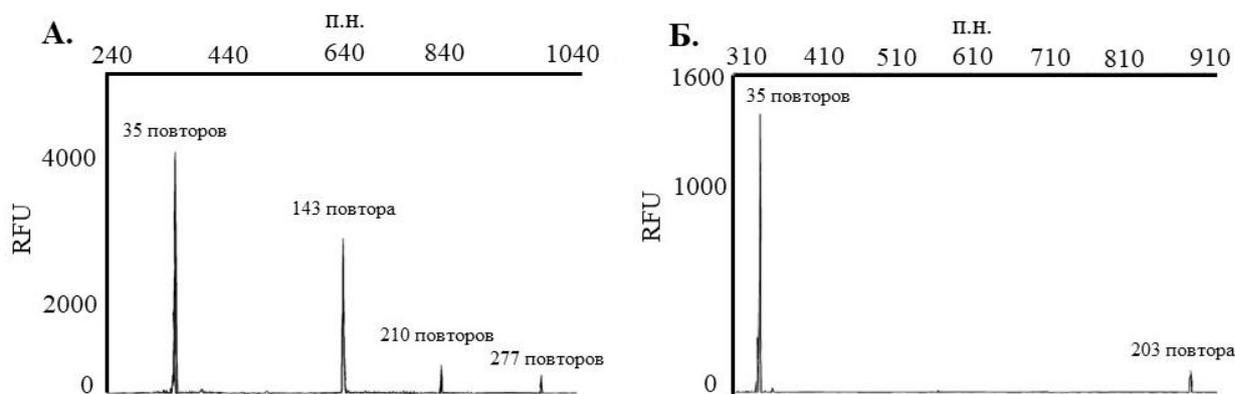


Рисунок 18. Результаты фрагментного анализа для определения размеров повтора CGG у пациентов (А) – СРG52 с четырьмя аллелями гена *FMRI* и (Б) – СРG67 с двумя аллелями гена *FMRI*.

Данный подход работает для случаев, когда генотип представлен двумя и более аллелями. В случае одного аллеля индекс соматической нестабильности принимаем равным размеру повтора в образце, так как в случае одного аллеля величина $N_{\max} - Me$ будет равна нулю. Индекс соматической нестабильности нельзя считать равным нулю, так как CGG повтор по своей природе нестабилен.

В предложенном подходе для расчета индекса соматической нестабильности следует отметить две важных вещи: первое – это то, что значение медианы отражает увеличение общей длины повтора, а разница между максимальной длиной повтора и медианой отражает распределение длин аллелей. Второе – это возможность получить количественную величину, которая бы отражала нестабильность повтора и давала возможность провести сравнение этой величины между пациентами, а также с другими параметрами, характеризующими заболевание.

С использованием разработанного подхода была проанализирована соматическая нестабильность в выборке пациентов из медикогенетической консультации ГБУЗ НСО «Городская клиническая больница №1». Для работы отбирали тех пациентов, для которых были получены результаты фрагментного анализа размера повтора и была сделана функциональная МРТ головного мозга. Выборка состояла из 11 пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы (средний возраст 8 лет (1-15)) и 15 матерей пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы (средний возраст 36 лет (27-46)) (рис. 19). У всех пациентов были отмечены клинические симптомы, характерные для синдрома ломкой X-хромосомы. Все матери пациентов не имели клинических признаков фраксопатий независимо от генотипа. Например, СРG52 – мать пациента, имеет нормальный фенотип, при этом в ее генотипе содержится 4 аллеля гена *FMRI*, из которых два являются полной мутацией. Это еще раз подтверждает наличие соматической экспансии.

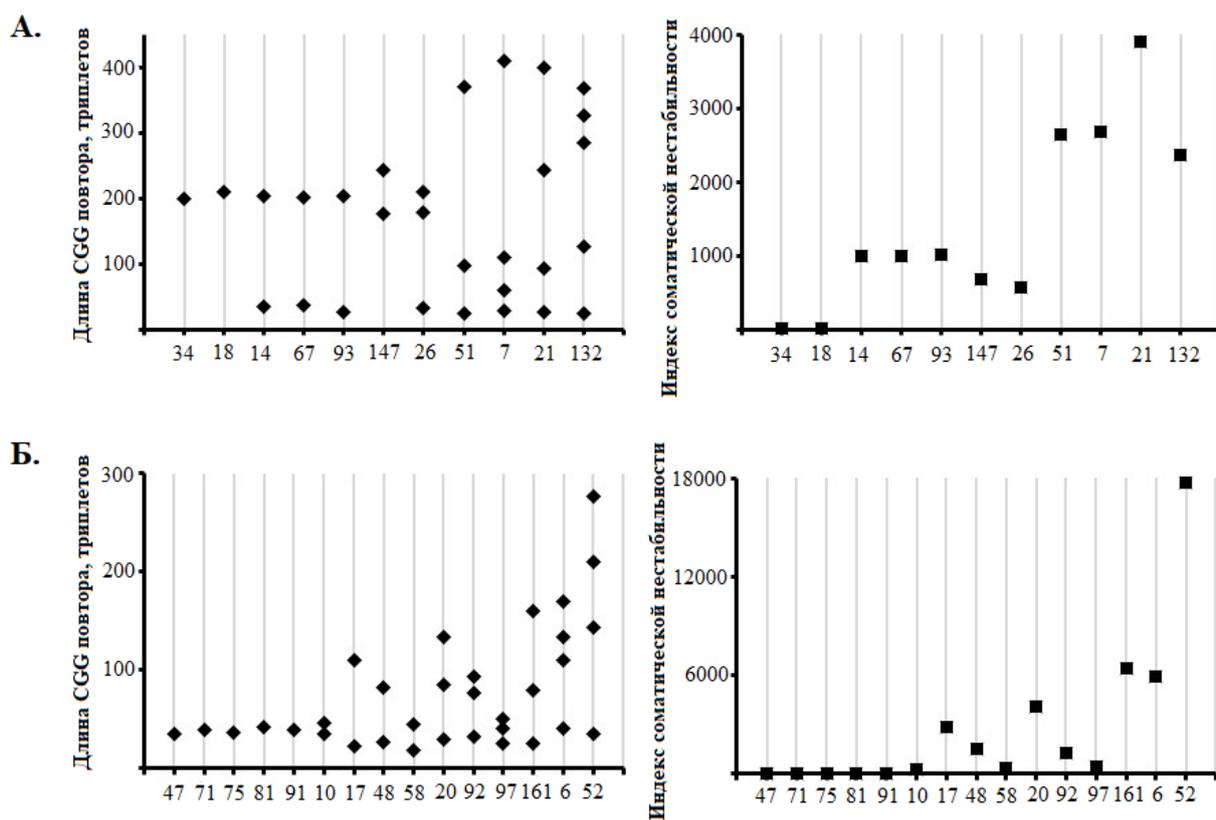


Рисунок 19. Размеры повторов CGG в ДНК клеток крови и индексы соматической нестабильности у пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы (А) и матерей пациентов (Б).

Цифры внизу указывают номер пациента.

Мозаицизм по размеру повтора был выявлен у 9 пациентов из 11 (см. рис. 19А). У 8 пациентов из 9 с мозаичным генотипом был выявлен нормальный аллель. Два аллеля было детектировано у 4-х пациентов, 3 и 4 аллеля – у двух и 5 аллелей – у одного из носителей мозаичного генотипа. Среди матерей пациентов 5 были гомозиготами с нормальным размером повтора, 4 были гетерозиготны, одна из них имела аллели, соответствующие норме/серой зоне, остальные имели норму/премутацию (см. рис. 19Б). Оставшиеся 6 матерей пациентов были мозаичны, с 3 или 4 аллелями размером от нормы до премутации и с полной мутацией в одном случае.

Распределение индексов соматической нестабильности среди пациентов и матерей отражено на рисунке 19 справа. Как видно из графического представления,

индекс соматической нестабильности отражает число аллелей и разброс значений размеров аллелей.

Дополнительно к индексу соматической нестабильности можно добавить упрощенный критерий, который в некоторых случаях можно использовать для количественной оценки степени соматической нестабильности. Это сумма длин повторов. Данный показатель зависит от размера повтора и частично от количества аллелей и может быть использован как дополнительный критерий оценки соматической нестабильности. Графически сумма аллелей у пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы и матерей данных пациентов представлена на рисунке 20. Корреляция индекса соматической нестабильности и суммы аллелей составила 0,73 ($P < 0,01$) у пациентов и 0,94 ($P < 0,01$) у матерей.

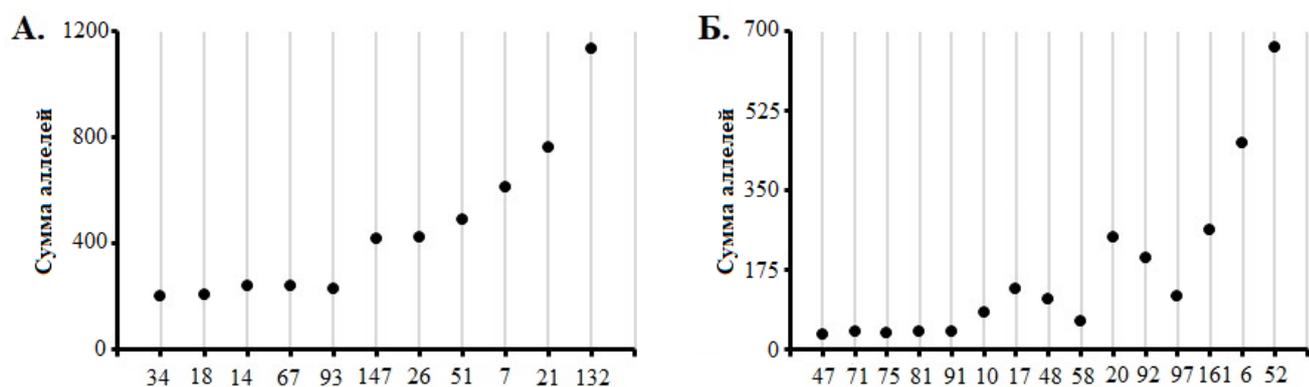


Рисунок 20. Сумма длин повторов CGG пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы (А) и матерей данных пациентов (Б).

Цифры внизу указывают номер пациента.

Неврологическое и психиатрическое состояние пациентов оценивали с помощью стандартных клинических подходов. При этом оценивались такие параметры, как способность идти на контакт, речь, мышление, двигательная расторможенность, ориентация, эмоциональная лабильность, интеллект и способность к самообслуживанию. Эти показатели являются качественными и не представляется возможным провести их количественную оценку.

Когнитивные способности в первую очередь зависят от взаимодействий между популяциями нейронов и отделами головного мозга – функциональной коннективности (ФК) (Sporns, 2013). Исследование ФК в различных долях головного мозга заключается в комплексном подходе, обеспечивающем как структурные, так и функциональные доказательства взаимосвязи между областями головного мозга, которые определяют основу когнитивных процессов.

Для оценки взаимодействий между отделами головного мозга проводили исследование ФК с помощью функциональной МРТ в состоянии покоя (resting state). Функциональная МРТ в состоянии покоя – это функциональная МРТ, которая позволяет картировать области серого вещества в головном мозге и взаимосвязь между этими зонами в состоянии покоя или при невыполнении физических действий (Niazy et al., 2015). С помощью такого подхода исследуют особенности функций головного мозга у пациентов с неврологическими заболеваниями. Было установлено, что соматическая нестабильность повтора CGG в гене *FMRI* влияет именно на функциональную коннективность в головном мозге у пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы.

Результаты исследования функциональной коннективности между отделами головного мозга и их с индексами соматической нестабильности представлены в таблице 4. Рассмотрены отделы головного мозга, для которых выявлена такая корреляция (расчёт как указано в 2.2.16.). Из представленных данных видно, что для ряда функциональных коннективностей существует зависимость от соматической нестабильности CGG повтора, а между матерями и пациентами есть отличия.

Таблица 4. Функциональная коннективность между отделами головного мозга пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы и матерей пациентов. Корреляция функциональной коннективности отделов головного мозга с индексом соматической нестабильности и суммой повторов.

Отделы головного мозга	Функциональная коннективность у матерей	Функциональная коннективность у пациентов	Корреляция с индексом соматической нестабильности и суммой аллелей у матерей	Корреляция с индексом соматической нестабильности и суммой аллелей у пациентов
Правая островковая доля и нижняя лобная извилина	Положительная, сильная	Положительная	Отрицательная	Положительная
Нижняя лобная и передняя поясная извилины	Отрицательная	Положительная	Отрицательная	Положительная
Средняя височная и нижняя лобная извилины	Положительная	Положительная	Не выявлено	Не выявлено
Средняя лобная извилина и нижняя теменная доля	Положительная, сильная	Положительная	Положительная	Положительная
Миндалевидное тело и верхняя височная извилина	Положительная, сильная	Положительная, сильная	Положительная	Положительная

Правый гиппокамп и средняя поясная извилина	Отрицательная	Отрицательная	Отрицательная	Отрицательная
Правое предклинье, угловая и надкраевая извилины	Положительная, сильная	Положительная	Положительная	Отрицательная

3.7. Биологический смысл корреляций между индексом соматической нестабильности и функциональной коннективностью между отделами головного мозга

Увеличенный CGG повтор в гене *FMRI* у носителей премутации и полной мутации практически всегда сопровождается соматической нестабильностью. Исследование этой нестабильности имеет крайне важное медицинское значение, так как она, во-первых, влияет на передачу повтора определенного размера в поколениях, а во-вторых, может влиять на степень проявления симптомов фраксопатий. Исследование нестабильности повторов у человека затруднено из-за недоступности биоматериала из различных органов, поэтому анализ проводят, как правило, в образцах периферической венозной крови. В этом случае в качестве модели могут выступать лабораторные животные с аналогичным генотипом. В частности, в данной работе представлены результаты по исследованию нестабильности CGG повтора у трансгенных лабораторных мышей, несущих премутантный аллель. Обнаружено, что изменения повтора происходят в разных органах в разной степени, но значительно проявляются именно с возрастом животного. При этом нет корреляции с репликативной активностью, уровнем транскрипции гена *fmr1* и уровнем экспрессии белков репарации Msh2, Msh3 и Msh6. Значительная экспансия наблюдается в половых клетках самцов, что обуславливает передачу увеличенного повтора по отцовской линии.

При работе с образцами человека возможен анализ посмертного материала тканей. В нем выявлено увеличение размера повтора в различных отделах головного мозга относительно такового в крови. Тут следует упомянуть, что в случае модельных мышей в крови изменения размера повтора также незначительны. Это следует учитывать при работе с образцами крови пациентов. Наблюдаемая нестабильность размера повтора в образцах венозной крови будет подразумевать ее наличие в не меньшей степени в головном мозге, что было показано на лабораторных мышках и посмертных биопсиях человека. Таким образом, анализ корреляций соматической нестабильности в крови с функциональной коннективностью отделов головного мозга имеет значение.

В предыдущих исследованиях выявили смягчение психиатрических симптомов у пациентов с полной мутацией и мозаичным генотипом, в котором представлены более короткие аллели. Однако наличие более коротких аллелей даже нормальной длины, не приводит к восстановлению нормального фенотипа. Природа возникновения мозаицизма не до конца понятна, некоторые полные мутации стабильны, другие – нет. Вероятно, стабильность повтора зависит от наличия AGG вставок, а также из-за нарушения процессов метаболизма ДНК в районе вторичных структур, формируемых повтором.

Для анализа степени соматической нестабильности был предложен оптимизированный для CGG повторов подход для расчёта индекса соматической нестабильности, который учитывает разброс значений размеров повтора в образце и сам размер повтора. Как альтернативную величину предложено использовать сумму длин повторов.

Большинство пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы имеют ряд специфических симптомов: аутизм, нарушения речи, эхолоалия, стереотипия, членовредительство, упрямство, избегание зрительного контакта. Фенотип, ассоциированный с синдромом ломкой X-хромосомы, включает в себя широкий спектр когнитивных нарушений. Все эти параметры сильно варьируют по степени выраженности от тяжелой до легкой умственной отсталости.

Для каждого пациента из данного исследования имеются результаты медицинского осмотра врачами генетиками, неврологами и психиатрами. Однако количественная оценка этих результатов оказалась невозможна. В связи с этим было решено переключиться на анализ функциональной коннективности между отделами головного мозга пациентов с помощью функциональной МРТ. Измеряли уровень коактивации при фМРТ в покое. Изменения функциональной коннективности в покое является биомаркером многих нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, различные виды деменции (Hohenfeld et al., 2018). Также изменения функциональной коннективности описаны для заболеваний аутистического спектра. Существует гипотеза, согласно которой функциональная коннективность снижается при

заболеваниях аутистического спектра (Chen et al., 2017). В развитии этих заболеваний принимают участие соматосенсорная верхняя височная извилина, нижняя лобная извилина, островковая доля, префронтальная кора и предклинье/задняя поясная кора (Yerys et al., 2015; Yamada et al., 2016; Gotts et al., 2019). Все упомянутые области имеют социально значимые функции и коррелируют с выраженностью клинических симптомов.

Для определения того, влияет ли размер CGG повтора на когнитивные функции были исследованы корреляции индексов соматической нестабильности с изменениями функциональных коннективностей в головном мозге пациентов и их матерей. В большинстве случаев у матерей с достоверными изменениями функциональных коннективностей была отрицательная корреляция функциональной коннективности и индексов соматической нестабильности, т.е. чем выше была соматическая нестабильность, тем ниже функциональная коннективность между отделами головного мозга. У пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы наблюдалась обратная связь, высокая соматическая нестабильность коррелировала с высокой функциональной коннективностью. С молекулярно-биологической точки зрения это можно объяснить тем, что все матери пациентов с высокой соматической нестабильностью имели только премутантные аллели, в то время как низкая соматическая нестабильность сопряжена с нормальными аллелями. В тоже время у пациентов высокая соматическая нестабильность начинала проявляться при появлении нормального аллеля при полной мутации, что приводило к смягчению симптомов.

Важно отметить две корреляции в группе матерей и пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы, которые затрагивают правую островковую долю и нижнюю лобную извилину, а также нижнюю лобную и переднюю поясную извилины. Эти области регулируют эмоции и внимание и играют роль в когнитивных и мотивационных функциях (Cha et al., 2016; Namkung et al., 2017). Кроме того, островковая доля влияет на сеть, лежащую в основе социальных когнитивных процессов, и сеть, ответственную за манипулирование информацией и принятие решений (Uddin et al., 2017). Вероятно, изменения в островковой доле, нижней

лобной и передней поясной извилине отвечают за развитие аутистических симптомов, которые характерны для пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы.

Таким образом, индекс соматической нестабильности является применимым критерием для количественной оценки степени вариабельности CGG повторов и коррелирует с изменениями в головном мозге пациентов.

3.8. Заключение по главе 3

Мы показали, что у модельных мышей с премутацией существует зависящая от возраста соматическая экспансия CGG повторов в основном в головном мозге, печени и несоматических клетках семенников (см. рис. 11, 13). В разных отделах головного мозга был показан разный уровень соматической экспансии, в частности она высокая в миндалевидном теле (см. рис. 11). Это интересно в том плане, что ранее было установлено изменение активности в разных отделах головного мозга пациента с синдромом атаксии/тремора (Hessl et al., 2007). Увеличение размера CGG повтора также происходит в премутантной культуре клеток человека, что в итоге приводит к образованию полной мутации (см. рис. 16). Экспансия происходит и в головном мозге пациентов с синдромом атаксии/тремора (см. рис. 17). Хотя она была небольшая, следует отметить, что самый большой аллель наблюдаемый у пациентов был по крайней мере на 50 триплетов меньше мышинных аллелей, исследованных в этой части работы. Поскольку количество повторов в исходном аллеле имеет непосредственное влияние на величину и частоту экспансии в половых клетках (Entezam et al., 2007), это также может влиять на нестабильность в соматических клетках. Более того известно, что у мышей на степень экспансии влияет не только генетика, но и факторы окружающей среды (Entezam, Usdin, 2008, 2009; Entezam et al., 2010). Таким образом, в зависимости от размера повтора, генетического фона и факторов окружающей среды соматическая экспансия может происходить у одних пациентов, носителей премутантного аллеля, более интенсивно чем у других. Наши эксперименты на лимфобластоидных клетках человека с начальным размером повтора однозначно указывают на то, что у людей с размером повтора больше 100 триплетов может происходить

соматическая экспансия. Факт того, что в образцах крови мышей наблюдалась очень низкая нестабильность, может свидетельствовать о том, что у человека также при низкой экспансии в крови в головном мозге, печени и гонадах будет наблюдаться больший размер повтора. Высокий уровень экспансии в головном мозге и печени – органах, в которых большинство клеток являются постмитотическими, указывает на то, что клеточная пролиферация не является фактором, ее определяющим. Таким образом, соматическая экспансия у премутантных мышей с высокой долей вероятности является результатом неправильной репарации поврежденной ДНК, а не результатом репликативного синтеза. Она очень похожа на передачу премутантного аллеля с экспансией в ооцитах, которая усиливается при оксидативном стрессе (Entezam, Usdin, 2008, 2009; Entezam et al., 2010).

Соматическая нестабильность также наблюдается в мышечной модели других заболеваний, обусловленных увеличением количества повторов. Однако тканеспецифичность в этом случае отличается. Например, в мышечной модели экспансии CAG повтора наибольший уровень соматической нестабильности наблюдался в почках (Mangiarini et al., 1997; Lia et al., 1998; Fortune et al., 2000; Gomes-Pereira et al., 2001; van den Broek et al., 2002), в то время как у мышей, премутантных по ломкой X-хромосоме, в этом органе наблюдался незначительный уровень экспансии (см. рис. 12). В мышечной модели атаксии Фридрейха, заболевания, обусловленного увеличением GAA повтора, в почках также наблюдалась незначительная нестабильность (Clark et al., 2007). Однако в отличие от мышей, премутантных по гену *FMRI*, в данной модели не наблюдалась экспансия в семенниках. Понимание причин тканеспецифичности этих процессов позволит идентифицировать факторы, необходимые для этого в разных моделях заболеваний и, таким образом, пролить свет на механизм нестабильности повторов.

Существует большое количество различных объяснений причин тканеспецифичности экспансии в других заболеваниях, связанных с увеличением количества повторов. Было предположено, что именно транскрипция поврежденного гена является определяющим фактором (Schumacher et al., 2001;

Mochmann, Wells, 2004; Lin, Wilson, 2007; Lin et al., 2009; Lin et al., 2010; McIvor et al., 2010; Nakamori et al., 2011). Однако факт того, что в сердце, в котором почти нет экспансии, а также в печени и семенниках, в которых высокая экспансия, один и тот же уровень мРНК *fmr1* (см. рис. 14) указывает на то, что транскрипция этого гена сама по себе не объясняет органспецифичность нестабильности повторов у мышей с премутацией.

Предполагалось, что изменение уровня различных белков, вовлеченных в репликацию и/или репарацию ДНК может объяснить тканеспецифичность экспансии. Например, было предложено, что различия в уровне Flap эндонуклеазы, FEN1 и ДНК-полимеразы β – ферментов, вовлеченных в эксцизионную репарацию нуклеотидов, влияет на разницу в уровне нестабильности, наблюдаемой в мозжечке и полосатом теле мышей, моделей болезни Хантингтона (Goula et al., 2009). Однако однозначных доказательств участия этих белков в развитии заболеваний, ассоциированных с экспансией повторов, не было показано, как и не был исследован уровень этих ферментов в других тканях. Предполагалось, что высокий уровень MutS β связан с более высокой экспансией в ИПСК, происходящих из клеток пациентов с атаксией Фридрейха, чем в фибробластах, из которых они произошли (Ku et al., 2010; Seriola et al., 2011). Аналогично нестабильность выше в эмбриональных стволовых клетках, полученных из эмбрионов с миотонической дистрофией I типа, чем в дифференцированных клетках, полученных из этих стволовых клеток (Seriola et al., 2011). Однако большое исследование, проведенное на различных тканях, показало, что уровень этих белков не влияет на тканеспецифичность экспансии в мышечной модели болезни Хантингтона, заболевания, обусловленного изменением CTG повтора, как и миотоническая дистрофия I типа (Lee et al., 2010). Выводы в данной работе были основаны на определении уровня мРНК *msh2/3*, который, как мы показали, не коррелирует с уровнем белков Msh2/3 у премутантных мышей (см. рис. 15). Факт того, что у премутантных мышей уровень этих белков очень высокий в мозге и семенниках, с высокой достоверностью мог бы указывать на то, что MutS β определяет органспецифичность экспансии. Однако сходный уровень Msh3 наблюдается в

сердце, печени и почках, несмотря на абсолютно разный уровень нестабильности в этих органах. Таким образом, при вовлечении в исследование большого количества разных тканей, корреляции между уровнем MutS β и размером экспансии не наблюдается.

Нет необходимости строить сложные модели для объяснения полученных результатов, как это было сделано для других подобных заболеваний (Lee et al., 2010). Вероятно, в экспансию повторов вовлечена неправильная репарация повреждений в ДНК. Это повышает вероятность того, что тканеспецифичность определяется комбинацией уровня MutS β и количества повреждений в ДНК. Число повреждений в ДНК, определяемое по количеству локализаций γ H2AX, само по себе также не определяет тканеспецифичность, так как количество этих локусов совпадает в головном мозге и сердце (Wang et al., 2009; Hudson et al., 2011), несмотря на большую разницу в уровне экспансии. Однако в итоге данные по уровню MutS β по всем пяти органам можно объединить. Например, нестабильность будет низкой в такой ткани как сердце, где уровень MutS β и повреждений ДНК низкий. Экспансия будет высокой в головном мозге и семенниках, потому что уровень MutS β относительно высокий. И хотя в печени наблюдается низкий уровень MutS β , количество повреждений ДНК в этом органе в 3-10 раз выше, чем в почках (Wang et al., 2009; Hudson et al., 2011), что увеличивает вероятность того, что нестабильность будет именно в печени. Таким образом, данная модель может указывать на то, что агент, который повышает уровень повреждений ДНК, будет вызывать высокий уровень экспансии в органах с низкой соматической нестабильностью.

Соматическая экспансия у человека имеет важнейшее клиническое значение, так как увеличение количества повторов приводит к уменьшению количества транскрипта. Разница в риске экспансии между разными тканями указывает на вероятный диссонанс в степени нестабильности между кровью и другими тканями, на которую накладывается также генетический фон и влияние факторов окружающей среды. В добавок, нестабильность повтора в семенниках определяет риск передачи увеличенного аллеля от отца к дочери. На это также влияет возраст

отца (Ashley-Koch et al., 1998). Известно, что факторы окружающей среды, такие, например, как оксидативный стресс, влияют на экспансию повторов (Entezam et al., 2010). Определение факторов, которые снижают соматическую экспансию позволит разработать стратегию терапии для смягчения симптомов у пациентов с премутацией и риск передачи увеличенного аллеля следующим поколениям.

Соматическая нестабильность практически всегда характерна для пациентов с премутацией и полной мутацией по гену *FMRI*. При этом наличие более коротких аллелей снижает выраженность симптомов у пациентов с полной мутацией. Однако наличие таких аллелей не приводит к восстановлению полностью нормального фенотипа. Природа феномена соматического мозаицизма до конца не понятна, некоторые увеличенные аллели являются стабильными, другие нет. В какой-то мере это может зависеть от наличия или отсутствия AGG вставок. Также нарушения в процессах репликации и репарации ДНК может играть определенную роль в стабильности повтора CGG.

В ряде исследований пытались обнаружить взаимосвязь между соматической нестабильностью и остротой симптомов. Однако исследователи, и мы в том числе, сталкиваются с проблемой количественной оценки соматической нестабильности. Ранее Ли с соавторами была предложена методика определения индекса соматической нестабильности повтора CAG при болезни Хантингтона (Lee et al., 2010). Подход заключается в выборе основного аллеля по высоте пика при фрагментном анализе. Метод хорошо применим для легко амплифицируемых повторов. В случае повтора CGG в гене *FMRI* последовательность является слишком GC-богатой и может быть амплифицирована только при определенных условиях, а количество продукта всегда выше для более коротких аллелей (см. рис. 18). В этом случае при фрагментном анализе «основным аллелем» в случае повтора CGG всегда будет более короткий аллель. Для решения этой проблемы и был разработан индекс соматической нестабильности, который основан только на количестве аллелей и длине самого аллеля, независимо от представленности ПЦР продукта. Предложенная формула учитывает только медиану значений длин повторов в образце и распределение размеров повторов, которое выражается

разницей значений крайнего аллеля и медианы. Также для выражения соматической нестабильности можно использовать более простой критерий, такой как сумма длин аллелей, которая коррелирует с индексом соматической нестабильности. Оба параметра могут быть использованы при анализе выборок пациентов. Такое представление данных упрощает оценку нестабильности повторов у пациентов и позволяет предсказать риск развития осложнения симптомов и передачи увеличенных аллелей следующим поколениям.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ПОДХОДА ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЛОМКОГО САЙТА FRAXA НА ПРЕПАРАТАХ МЕТАФАЗНЫХ ХРОМОСОМ

4.1. Введение

Трудоемкость диагностики фраксопатий с помощью молекулярных методов, основанных на амплификации, или с помощью Саузерн-блот гибридизации, требует разработки альтернативного подхода. В этом случае может быть использована особенность клеток, носителей полной мутации гена *FMRI*, а именно наличие ломкого сайта FRAXA, который можно визуализировать цитогенетически. Изначально для выявления ломких сайтов хромосом использовали классические цитогенетические методики, основанные, например, на рутинной окраске и последующем выявлении перетяжек. Такой подход достаточно грубый и неточный. К тому же ломкий сайт FRAXA расположен очень близко к теломере, поэтому возникают трудности в визуализации небольших фрагментов хромосомы в случае разрыва. При этом длины хроматид визуально не отличаются. Использование молекулярно-цитогенетических подходов позволит максимально повысить эффективность методики выявления ломких сайтов FRAXA.

4.2. Паттерны локализации сигналов генов *FMRI* и *GPR50*

Ломкий сайт FRAXA является индуцируемым фолатчувствительным и детектируется после инкубации делящейся клеточной линии в присутствии 5-фтордезоксифуридина. Было установлено, что оптимальным временем обработки является 16-18 часов при концентрации реактива 0,1 мкМ. Именно при таких условиях образуется достоверно определяемое количество ломких сайтов и сохраняется достаточно высокий метафазный индекс, который позволяет провести анализ хромосом. После индукции FRAXA готовили препараты метафазных хромосом и проводили их гибридизацию *in situ* с двумя зондами, меченными разными флуорохромами, позволяющими их идентифицировать на препарате. В качестве зондов использовали ВАС-клоны, один из которых содержал полную

последовательность гена *FMRI* (RP11-489K19), а второй – полную последовательность гена *GPR50* (RP11-351H6).

Основной проблемой визуализации именно сайта *FRAXA*, а не соседних ломких сайтов, с помощью методов классической цитогенетики является его теломерное положение на хромосоме. Такое положение позволяет достаточно просто может идентифицировать перетяжку, однако если происходит разрыв и теломерный фрагмент теряется, незначительная разница в длине хроматид не позволяет с помощью микроскопа установить наличие разрыва. Использование флуоресцентной гибридизации *in situ* может помочь более эффективно выявлять наличие теломерного фрагмента, а вероятные трудности тут могут возникать только из-за проблем гибридизации. Идея использования двух зондов позволяет, во-первых, маркировать ломкий сайт в гене *FMRI*, во-вторых, маркировать теломерный фрагмент, который теряется, и в котором расположен ген *GPR50* и, в-третьих, свести к минимуму проблемы гибридизации одного из зондов использованием второго зонда.

Всего в ходе выполнения этой работы было проанализировано более 1000 метафазных пластинок в четырех клеточных линиях: двух, полученных от здоровых индивидуумов, и двух, полученных от пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы. Для работы специально были взяты коммерческие клетки, с точно охарактеризованным размером повтора и уровнем метилирования (см. 2.1.4) Для контроля проводили анализ наличия ломких сайтов *FRAXA* в тех же самых клеточных линиях, но без обработки 5-фтордезоксидурином. Всего было выделено 5 паттернов распределения сигналов от двух зондов на препаратах метафазных хромосом (рис. 21).

Все локализации сигналов на нормальных X-хромосомах без ломких сайтов отнесены к паттернам I-III (см. рис. 21). Во всех этих типах локализации при окрашивании *DAPI* не наблюдается каких-либо разрывов или перетяжек. Паттерн I представляет собой четкие сигналы на двух хроматидах от двух используемых зондов. При паттерне локализаций II сигнал одного из зондов на одной из хроматид теряется, при этом виден четкий сигнал двух зондов на двух хроматидах. Паттерн

локализации III характеризуется потерей обоих сигналов от одного из зондов и сохранением двух сигналов второго зонда. Именно паттерны II и III объясняют использование двух зондов. Потеря сигнала в них связана не с отсутствием необходимых последовательностей в хромосоме, а с трудностями гибридизации, обусловленными, например, недостаточной протеиназной обработкой конкретного участка хромосомы, что снижает доступность ДНК для гибридизации.

Паттерны локализаций IV и V (см. рис. 21) отнесены к аномальным, то есть характерным для хромосом, несущих ломкий сайт FRAXA. Так, паттерн IV представляет собой сигналы от одного или двух зондов на одной из хроматид и полное отсутствие сигналов на второй. При этом на DAPI окрашенных хромосомах никаких разрывов или перетяжек может не наблюдаться. Паттерн V характеризуется разрывами или перетяжками, видимыми при DAPI окрашивании. При этом не имеет значения, каким образом распределены сигналы от обоих зондов.

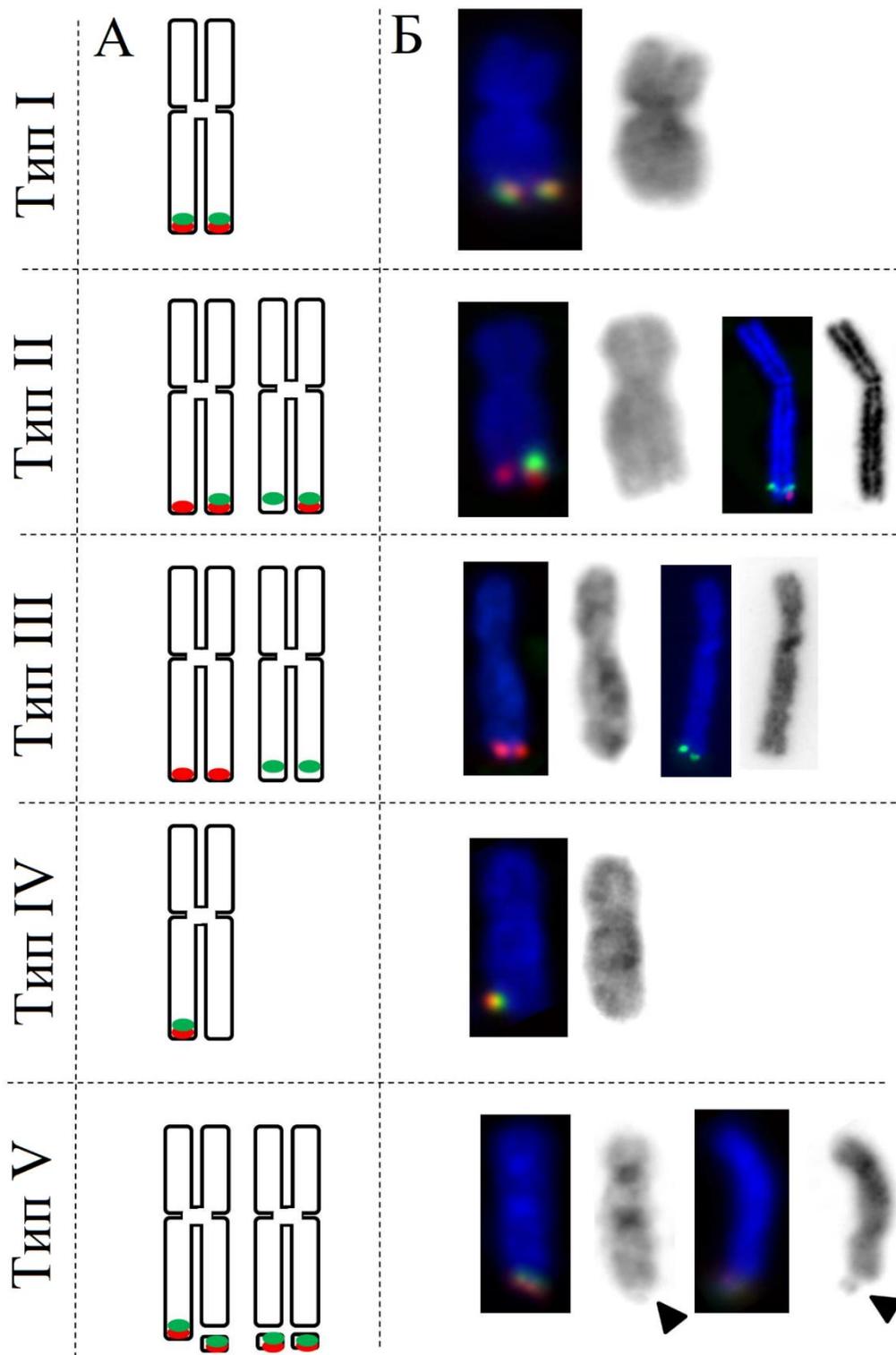


Рисунок 21. Типы паттернов локализации ВАС-клонов, несущих гены *FMR1* (зеленый) и *GPR50* (красный) на метафазных хромосомах пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы и здоровых контролей.

А – схема; Б – примеры FISH-изображений для каждого паттерна локализаций; синий цвет хромосом за счет окрашивания DAPI; справа от каждой фотографии инвертированное черно-белое DAPI изображение для более детального анализа морфологии X-хромосомы; стрелками указаны видимые разрывы или перетяжки на хромосомах.

Отдельно стоит отметить, что сигналы от одного и того же зонда могут отличаться по размеру, либо по наличию двойных сигналов вместо одиночных на некоторых хроматидах (рис. 22). Однако эти различия являются артефактами и относятся к особенностям проведения гибридизации, они не отражают копийности последовательностей и не являются результатом воздействия 5-фтордезоксимуридина. Статистический анализ частоты их распределения показал отсутствие каких-либо достоверных различий между клеточными линиями как после обработки 5-фтордезоксимуридином, так и без таковой. Таким образом, разные по размеру сигналы, либо двойные сигналы, нами отнесены к результатам нормальной гибридизации.

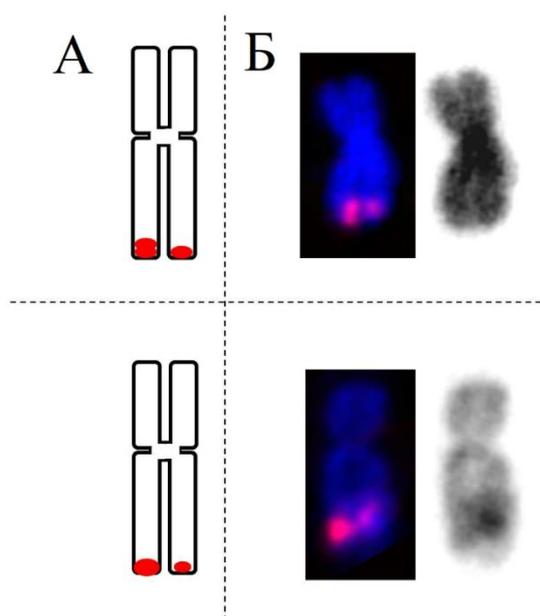


Рисунок 22. Пример особенностей FISH, которые не являются результатом экспрессии ломкого сайта FRAXA.

Вверху – двойной сигнал гена *FMR1* на одной из хроматид и одинарный на второй. Внизу – сигналы гена *FMR1* (красный) разного размера на разных хроматидах; А – схема; Б – примеры FISH-изображений для каждого паттерна локализаций; синий цвет хромосом за счет окрашивания DAPI. Справа от каждой фотографии инвертированное черно-белое DAPI изображение для более детального анализа морфологии X-хромосомы.

4.3. Распределения паттернов локализации в зависимости от клеточной линии и наличия или отсутствия 5-фтордезоксисуридина

Распределение паттернов локализации было исследовано в двух контрольных клеточных линиях – GM06865 и GM06895; и двух линиях клеток, полученных от пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы – GM03200 и GM04025. Выбранные культуры клеток инкубировали в присутствии 5-фтордезоксисуридина либо без него, после чего фиксировали, получали препараты метафазных хромосом и проводили гибридизацию *in situ* с описанными выше зондами. После этого подсчитывали паттерны локализации сигналов во всех вариантах клеток. Анализировали не менее 100 метафазных пластинок для каждой линии клеток и каждого варианта инкубации. Результаты подсчета паттернов локализации представлены в таблице 5.

Таблица 5. Частота паттернов локализации ВАС-клонов, несущих гены *FMRI* и *GPR50* на метафазных хромосомах пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы и здоровых контролей.

Тип паттерна	GM06895		GM06865		GM03200		GM04025	
	К (N=150)	FdU (N=102)	К (N=100)	FdU (N=103)	К (N=204)	FdU (N=131)	К (N=108)	FdU (N=104)
Норма								
I	0,84	0,85	0,88	0,83	0,89	0,73	0,87	0,77
II	0,09	0,10	0,06	0,11	0,05	0,03	0,07	0,05
III	0,06	0,03	0,06	0,07	0,03	0,06	0,04	0,01
FRAXA								
IV	0,01	0,02	0,00	0,00	0,01	0,12	0,02	0,06
V	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,12

К – контроль без обработки; FdU – обработка 5-фтордезоксисуридином

Во всех клеточных линиях (как пациентов, так и здоровых контролей) без обработки 5-фтордезоксифторуридином самым распространенным является паттерн локализации I. Он встречается с частотой от 0,83 до 0,89. Доля других паттернов локализации, которые относятся к норме – II и III, намного меньше и составляет от 0,03 до 0,09. Паттерн IV в клетках, не обработанных 5-фтордезоксифторуридином, возникает спорадически, независимо от того, какая это клеточная линия, контрольная или полученная от пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы. Его частота встречаемости не превышает 0,02. Паттерн V в клеточных линиях без воздействия 5-фтордезоксифторуридина не встречается вообще, независимо от клеточной линии. Как при попарном сравнении, так и при объединении показателей нами не выявлено достоверных отличий по распределению паттернов локализации сигналов между клеточными линиями, полученными от пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы и контрольными клетками без обработки 5-фтордезоксифторуридином. Сравнение проводили с использованием критерия χ^2 с поправкой Йейтса и точного критерия Фишера.

Однако после обработки 5-фтордезоксифторуридином картина распределения паттернов локализации значительно меняется. Что касается контрольных клеточных линий, то в них не наблюдается достоверных отличий распределений при воздействии реагента и без такового (при анализе с помощью критерия χ^2 с поправкой Йейтса и точного критерия Фишера). Основные изменения в распределении касаются клеточных линий пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы. Это свидетельствует об отсутствии влияния 5-фтордезоксифторуридина на сайт FRAXA в нормальных клеточных линиях. Однако в линиях клеток пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы после воздействия 5-фтордезоксифторуридина происходило достоверное увеличение паттернов локализации IV и V ($P < 0,001$, точный критерий Фишера) (см. табл. 5), характерных для экспрессии ломкого сайта FRAXA. Высокая статистическая достоверность изменений, происходящих в линиях клеток пациентов, свидетельствует о высокой информативности метода гибридизации с использованием двух зондов после обработки клеток 5-фтордезоксифторуридином для выявления носителей синдрома ломкой X-хромосомы.

4.4. Пример исследования клинического случая умственной отсталости с использованием разработанного подхода визуализации ломких сайтов FRAXA

Обследована семья, в которой один сын является носителем умственной отсталости на фоне синдрома ломкой X-хромосомы, а второй – умственной отсталости неопределенной природы. Их мать анеуплоидна по количеству X-хромосом и имеет маркерные хромосомы, которые произошли из X-хромосомы.

Три члена семьи: мать – СРG10, 43 года, два сибса СРG9 – 24 лет и СРG11 – 19 лет (рис. 23).

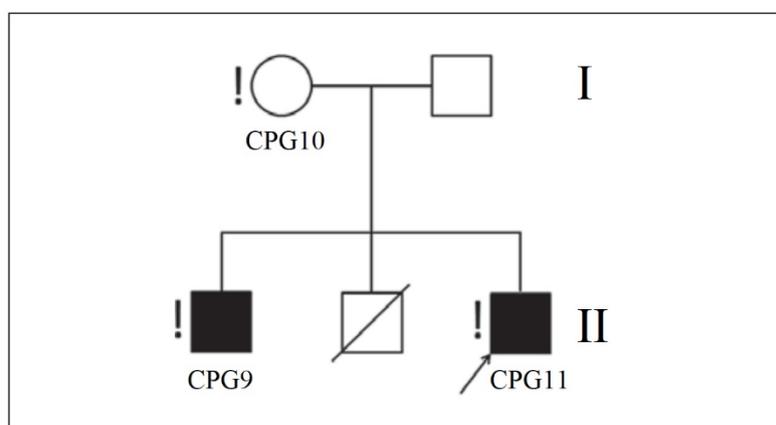


Рисунок 23. Родословная обследованной семьи.

Стрелкой указан пробанд; восклицательными знаками указаны члены семьи с какой-либо патологией.

Третий сын в этой семье также имел умственную отсталость, но ранее совершил суицид. Психологическое обследование пробанда СРG11 показало полное недоразвитие высших психических функций. Было показано снижение кратковременной памяти и скорости запоминания. Кривая репродукции составила 4 6 8 8 7; мнемоническая устойчивость была ниже нормы. Он понимал инструкции, но не мог их запомнить. Ему требовалась помощь в обслуживании себя. Его социальная ориентация была слаборазвита. Тест Векслера показал: вербальный IQ – 58, невербальный IQ – 82, обычный IQ – 67. Прямое исследование его эмоциональных/персональных способностей показало нестабильность, неуверенность в себе, тревожность и неспособность решать существующие

проблемы. Клиническим психологом был поставлен диагноз F70.0 – умственная отсталость легкой степени, неврологом – энцефалопатия сосудистого генеза, синдром внутричерепной гипертензии, эпизодический ночной энурез и дислалия.

CPG9 являлся пациентом психиатрической клиники и результаты его клинического и психиатрического обследования были недоступны, но были получены образцы крови. МРТ обследование CPG10 позволило выявить одиночные мелкие неспецифические (периваскулярные дисциркуляторные) очаги в подкорковой области головного мозга. В правой парагиппокампальной извилине была выявлена небольшая киста. МРТ обследование CPG11 не выявило органических патологий головного мозга. Также присутствует небольшая асимметрия боковых желудочков.

Размер повтора в гене *FMRI* определяли с помощью ПЦР с последующим электрофорезом в агарозном геле. Образец ДНК CPG11 не давал ПЦР продукта, образец ДНК CPG9 дал продукт размером около 30 п.н., и образец ДНК CPG10 дал два продукта размером 20 и 169 п.н. Анализ метилирования показал, что промотор гена *FMRI* метилирован у CPG11 и неметилирован у CPG9 (Приложение 4). Таким образом, можно сделать вывод, что CPG11 носитель метилированной полной мутации, из-за чего не синтезируется протяженный GC-богатый продукт.

Для подтверждения выводов был проведен цитогенетический анализ с использованием разработанного подхода с использованием двух проб: *FMRI* и *GPR50* (рис. 24).

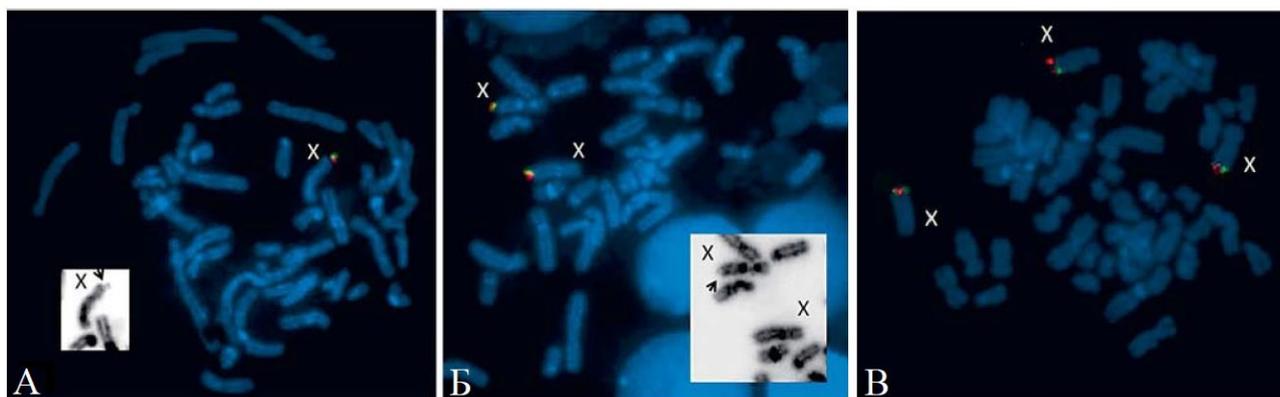


Рисунок 24. Локализация проб *FMR1* (красный) и *GPR50* (зеленый) на метафазных хромосомах пациента CPG11 (А) и CPG10 (Б, В).

На врезках – инвертированная окраска DAPI; стрелкой указан ломких сайт FRA(XA).

Анализ 51 метафазной пластинки пациента CPG9 показал отсутствие ломких сайтов FRA(XA), что подтверждает результаты ПЦР и оценки метилирования. В случае пациента CPG11 анализ 100 метафазных пластинок показал наличие ломкого сайта на 14% X-хромосом (см. рис. 24А), что соответствует синдрому ломкой X-хромосомы. Анализ 124 метафазных пластинок CPG10 позволил установить наличие ломкого сайта в 5% X-хромосом (см. рис 24Б, В) и анеуплоидию по X-хромосоме (см. рис. 24В, рис. 25А, Б, В). Анеуплоидия была также подтверждена с помощью локализации пэйнтинг-проб на X-хромосому (см. рис. 25), что также позволило выявить наличие маркерных хромосом, которые произошли из X-хромосомы (см. рис. 25Б).

Полученные результаты также указывают на то, что крупная премутация размером около 160 триплетов приводит к ломкости хромосом, но с частотой ниже таковой при синдроме ломкой X-хромосомы.

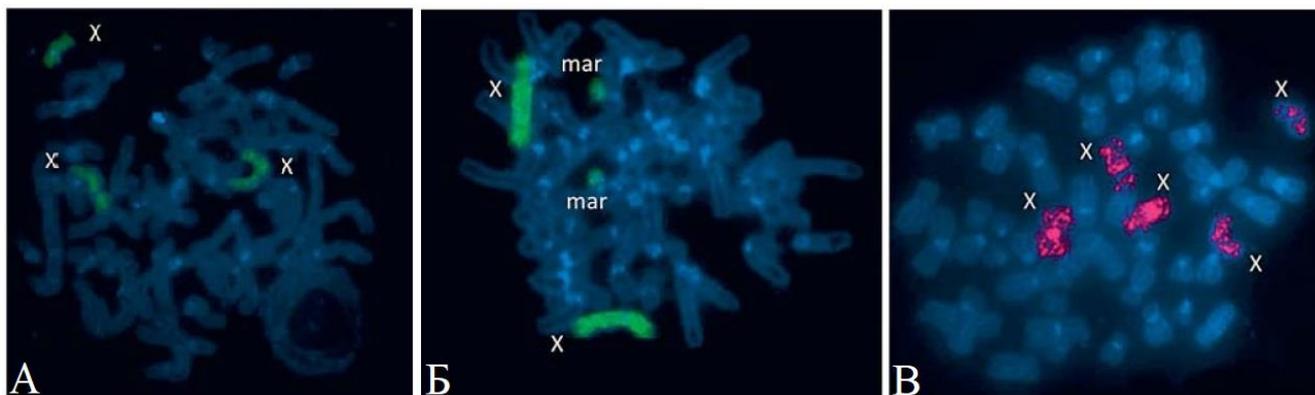


Рисунок 25. Локализация пэйнтинг-пробы хромосомы X на метафазных пластинках пациента СРG10 с тремя X-хромосомами (а), двумя X-хромосомами и маркерной хромосомой (б) и пятью X-хромосомами (в).

4.5. Заключение по главе 4

Разработан подход для визуализации ломкого сайта FRAXA с помощью локализации двух зондов с помощью FISH. Зонды содержат ген *FMR1* в котором находится ломкий сайт FRAXA и ген *GPR50*, расположенный более теломерно. Подход протестирован на модельных клеточных линиях В-лимфоцитов, полученных от пациентов, а также использован при исследовании клинических случаев фраксопатий. Такой метод анализа позволяет выявить не только полную мутацию, но и крупную премутацию, так как при ней также появляется ломкость хромосом.

Выявлены пять паттернов локализации сигналов, три из которых соответствуют норме, т.е. ломкий сайт отсутствует, и два соответствуют FRAXA. Проявление паттернов зависит от условий присутствия или отсутствия 5-фтордезоксифуридина. Так, паттерны, характерные для нормальной X-хромосомы, показывают одинаковую частоту независимо от присутствия ингибитора и типа клеточной линии, а паттерны, характерные для FRAXA, встречаются значительно чаще в присутствии ингибитора и только в линиях, несущих этот ломкий сайт.

Именно такой подход, с использованием двух зондов, позволяет избежать ложноположительных результатов, характерных для FISH, в случае неэффективной гибридизации и потери сигнала. В случае одного зонда такой

результат был бы определен как наличие ломкого сайта. Паттерны расположения сигналов, которые описаны в данной работе, зависят от морфологии сайта FRAXA на метафазных хромосомах и от специфики FISH на отдельных хроматидах. И именно подход с использованием двух зондов позволяет взять в анализ большее число метафазных пластинок по сравнению с использованием одного зонда. Различные проблемы, которые возникают с одним из зондов во время проведения FISH зачастую не касаются второго зонда. Это значительно сокращает время анализа, что очень важно, так как подобный подход требует исследования не менее 100 метафазных пластинок на один образец.

Безусловно, молекулярная диагностика синдрома ломкой X-хромосомы является крайне актуальной задачей. Наиболее точным методом диагностики является ПЦР для определения размера CGG повтора. Существующие методики амплификации протяженных повторенных GC-богатых последовательностей требуют высокой квалификации молекулярного биолога, который их выполняет, и достаточно дорогостоящих реактивов, как, например, высокопроцессивные ДНК-полимеразы. Это делает такой подход недоступным для многих генетических консультаций, в частности в бюджетных организациях здравоохранения. Существующие в продаже наборы для диагностики иностранного производства также крайне дороги и в настоящее время в России не продаются из-за введенных экономических санкций. Это все приводит к поиску альтернативных и недорогих методик диагностики синдрома ломкой X-хромосомы, как, например, анализ метилирования промоторной области гена *FMR1* или анализ цитогенетических особенностей X-хромосом, содержащих сайт FRAXA.

Разработанный молекулярно-цитогенетический подход выявления ломкого сайта FRAXA может служить для диагностики, что было подтверждено анализом ломкости в клеточных линиях и при клиническом случае, либо быть использованным в научно-исследовательских целях при анализе ломкости хромосом.

ГЛАВА 5. МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ ЛОМКОГО САЙТА FRAXA ПРИ СИНДРОМЕ ЛОМКОЙ X-ХРОМОСОМЫ

5.1. Введение

Большинство обычных ломких сайтов могут быть индуцированы афидиколином, ингибитором ДНК-полимеразы α (Lukusa, Fryns, 2008). Поскольку эти сайты представляют собой протяженные АТ-богатые участки, нельзя определить какую-то последовательность, которая отвечает за развитие ломкости в них. Камптотецин – ингибитор топоизомеразы I снижает ломкость афидиколин-индуцируемых ломких сайтов (Arlt, Glover, 2010). Это позволило сделать предположение, что афидиколин приводит к разъединению комплекса ДНК-полимеразы α и топоизомеразы I, в результате образуются протяженные участки одноцепочечной ДНК. Такие участки формируют вторичные структуры, блокирующие репликацию. В результате недорепликации появляется ломкий сайт (Arlt, Glover, 2010). Часто это наблюдается в участках с низким содержанием ориджинов репликации, из-за чего нет запасных ориджинов для завершения репликации района при репликативном стрессе (Ozeri-Galai et al., 2011). Однако есть данные, указывающие на возможное влияние на образование ломкого сайта только низкого содержания ориджинов, без участия вторичных структур (Palakodeti et al., 2010; Letessier et al., 2011).

Редкие ломкие сайты могут быть индуцированы фолатным стрессом или добавлением 5-фтордезоксисуридина. В отличие от обычных ломких сайтов, редкие ломкие сайты локализуются в участках протяженных CGG повторов, которые часто метилированы (Fu et al., 1991; Verkerk et al., 1991). 5-фтордезоксисуридин ингибирует тимидилатсинтазу и, тем самым, нарушает баланс нуклеотидов. Это все приводит к репликативному стрессу. Также этот реагент может инкорпорироваться в ДНК и формировать пары с гуанином (D'Anna et al., 1985; Meyers et al., 2004). Участки CGG повторов могут образовывать различные вторичные структуры, которые могут быть метилированы и блокировать синтез ДНК как *in vitro*, так и *in vivo* (Fry, Loeb, 1994; Mitas et al., 1995; Nadel et al., 1995; Usdin, Woodford, 1995;

Mariappan et al., 1996; Yu et al., 1997; Fojtik, Vorlickova, 2001; Voineagu et al., 2009; Renciuik, Kypr, Vorlickova, 2011). Таким образом, можно предположить, что ломкость хромосом в этом случае является результатом недорепликации участка при репликативном стрессе как это предполагается для обычных ломких сайтов. Только природа репликативного стресса иная. Для понимания этого необходимо провести исследования влияния камптотецина на экспрессию фолатчувствительного ломкого сайта и исследовать наличие оридзинов репликации в таком районе.

5.2. Влияние камптотецина на частоту образования ломких сайтов FRAXA

Камптотецин снижает ломкость хромосом, индуцированную афидиколином, в районах обычных ломких сайтов за счет снижения вероятности образования вторичных структур, препятствующих продвижению репликативной вилки (Arlt, Glover, 2010). В связи с этим было решено исследовать влияние камптотецина на образование ломких сайтов FRAXA, индуцируемых 5-фтордезоксифторуридином. Исследование проводили на иммортализованных линиях В-лимфоцитов пациентов и здоровых контролей с использованием описанного ранее молекулярно-цитогенетического подхода для выявления ломких сайтов FRAXA. Анализировали не менее 100 метафазных пластинок (см. 4.3) и определяли частоту встречаемости ломкого сайта FRAXA. 5-фтордезоксифторуридин в концентрации 0,1 мкМ в отсутствие камптотецина в контрольных линиях GM06895 и GM06865 вызывает образование ломкого сайта FRAXA (экспрессию ломкого сайта FRAXA) с частотой не более 1%. Линия клеток GM06897, которая несет неметилованную полную мутацию по гену *FMR1*, экспрессирует ломкий сайт FRAXA на уровне 6% в тех же условиях. Однако это отличие от контрольных клеточных линий не достоверно.

Иная картина наблюдается в двух клеточных линиях, несущих метилированную полную мутацию по гену *FMR1*: GM03200 и GM04025. Эти клетки экспрессируют ломкий сайт FRAXA на уровне 16-20% (рис. 26). Добавление 3 нМ камптотецина к линиям клеток с повышенной экспрессией FRAXA снижало его частоту на 65% в

линии GM03200 и на 46% в линии GM04025 ($P=0,03$, точный тест Фишера). Добавление 30 нМ камптотецина приводило к дальнейшему снижению экспрессии ломкого сайта FRAXA ($P<0,05$) (см. рис. 26). Снижение частоты образования ломкого сайта FRAXA при добавлении камптотецина отмечено также в линии GM06897 с неметилированной полной мутацией, однако это снижение статистически не достоверно.

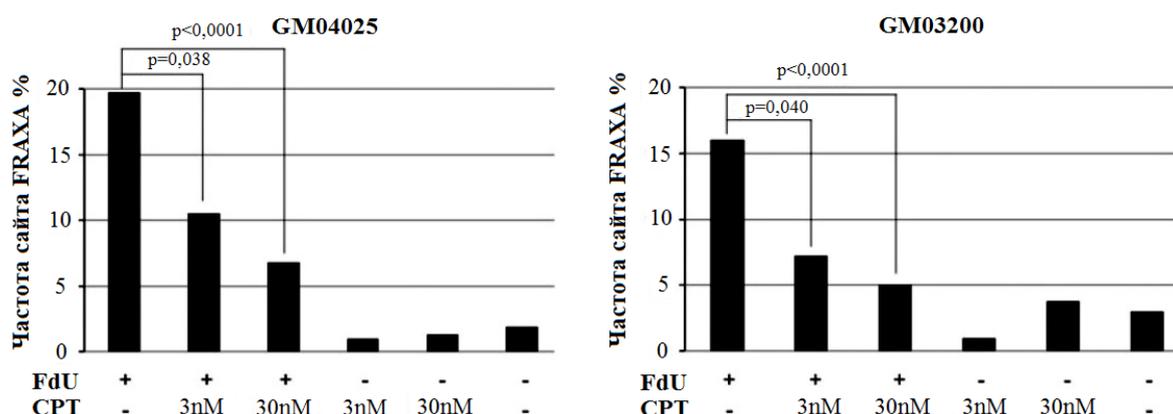


Рисунок 26. Влияние камптотецина (CPT) на экспрессию ломкого сайта FRAXA, индуцируемого 5-фтордезоксисуридином (FdU) в линиях иммортализованных В-лимфоцитов.

Клетки инкубировали с 5-фтордезоксисуридином в присутствии камптотецина или без него в течение 18 часов.

Камптотецин может снижать частоту образования ломкого сайта FRAXA либо повышая устойчивость комплекса ДНК-полимераза/геликаза, либо влияя на способность этого комплекса запускать чекпойнты клеточного цикла, которые не позволяют клетке входить в митоз, давая тем самым дополнительное время на завершение репликации района FRAXA. В опубликованных результатах экспериментов на примере обычных ломких сайтов на В-лимфоцитах не было выявлено какого-либо влияния камптотецина на клеточный цикл (Arlt, Glover, 2010). Был проведен анализ митотического индекса в линии GM04025, который показал, что 5-фтордезоксисуридин в концентрации 0,1 мкМ не снижает количество клеточных делений ($p=0,29$). Однако камптотецин с повышением концентрации

снижал митотический индекс (табл. 6). Исходя из полученных данных можно утверждать, что камптотецин является не только ингибитором топоизомеразы I, но и индуктором чекпойнтов клеточного цикла. В связи с этим было решено исследовать влияние на экспрессию ломкого сайта FRAXA другого индуктора чекпойнтов, который бы не ингибировал репликативный аппарат клетки. Митомицин С включает чекпойнты клеточного цикла, внося повреждения в ДНК и при этом не влияя на активность топоизомеразы I. Установлено, что он снижает митотический индекс (табл. 6) и ломкость хромосом, индуцированную 5-фтордезоксиуридином (рис. 27). Таким образом, и камптотецин в любой концентрации и митомицин С подавляют экспрессию ломкого сайта FRAXA путем внесения повреждений в ДНК и тем самым затормаживая клеточный цикл, что дает клетке время закончить репликацию в районе ломких сайтов FRAXA, которые относятся к труднореплицируемым районам.

Таблица 6. Влияние 5-фтордезоксиуридина (FdU), камптотецина (CPT) и митомицина С (MMC) в разных концентрациях на митотический индекс (МИ) в линии клеток GM04025.

Вещество и концентрация	МИ	P*
FdU	0,54	
FdU+CPT (3нМ)	0,25	0,12
FdU+CPT (30нМ)	0,13	0,01
CPT (3нМ)	0,85	0,21
CPT (30нМ)	0,2	0,04
ДМСО (растворитель)	0,81	0,3
FdU+MMC (0,5мкМ)	0,27	0,07
FdU+MMC (5мкМ)	0,19	0,02
MMC (0,5мкМ)	0,21	0,03

ММС (5мкМ)	0,12	0,01
------------	------	------

*Достоверность различий по сравнению с митотическим индексом при обработке 5-фтордезоксисуридином (точный тест Фишера).

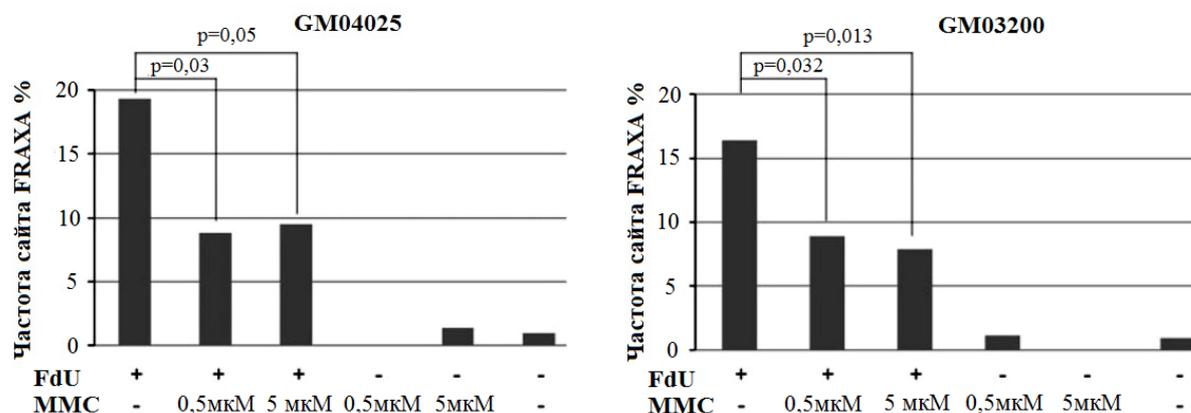


Рисунок 27. Влияние митомицина С (ММС) на экспрессию ломкого сайта FRAXA, индуцируемого 5-фтордезоксисуридином (FdU) в линиях иммортализованных В-лимфоцитов.

Клетки инкубировали с 5-фтодезоксисуридином в присутствии митомицина С или без него в течение 18 часов.

5.3. Активность ориджинов репликации, локализованных в районе CGG повтора, в различных типах клеток

Полученные результаты по способности веществ, повреждающих ДНК, снижать экспрессию ломких сайтов свидетельствует о том, что длинный тракт CGG повторов блокирует продвижение репликативной вилки. Повреждения в ДНК активируют чекпойнты, не давая клетке войти в митоз и, тем самым, давая время закончить репликацию повторенному участку. Для понимания основ блокирования репликативной вилки проведено исследование 5' конца гена *FMR1*. В опубликованных ранее двух независимых исследованиях методом анализа наличия растущих цепей ДНК в фибробластах, полученных от пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы и контрольных клеточных линиях, было установлено наличие ориджинов репликации в этом районе (Brylawski et al., 2007; Gray et al., 2007).

Анализ геномных данных по активности ориджинов репликации путем глубокого секвенирования выделенных растущих цепей ДНК подтвердил наличие инициации репликации в районе гена *FMR1* в различных типах клеток (клетки рака толстой кишки – НСТ116, лейкемическая клеточная линия – К562 и эмбриональные стволовые клетки) (рис. 28). Выявлено наличие трех отдельных пиков количества растущих цепей ДНК (см. рис. 28 I, II и III), указывающих на активность ориджинов репликации на участке длиной 3 т.п.н. в 5' конце гена *FMR1*. Наличие активности ориджинов в этом районе в разных типах клеток указывает на то, что с большой вероятностью ее можно наблюдать и в В-лимфоцитах, полученных от пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы.

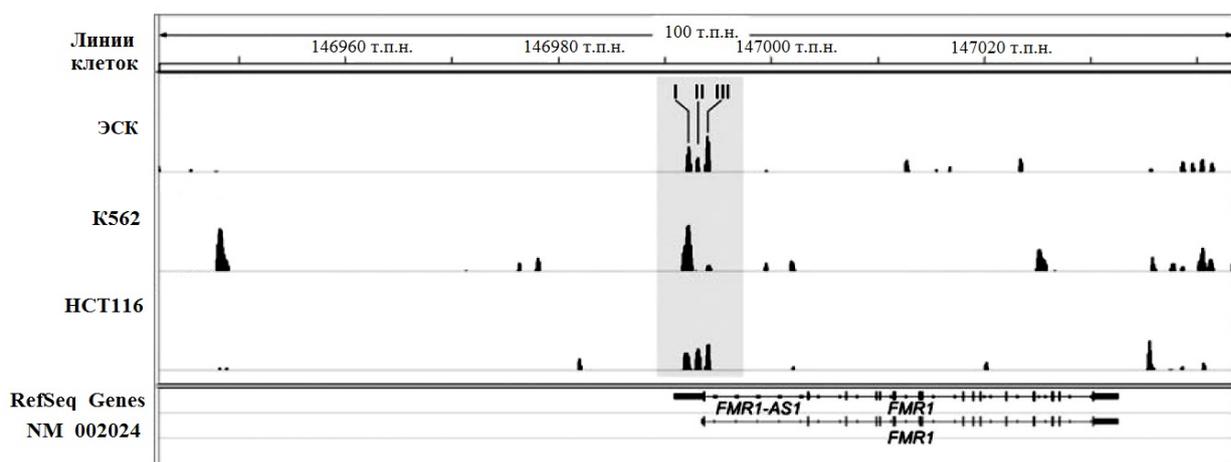


Рисунок 28. Инициация репликации в районе гена *FMR1* в различных клеточных линиях человека.

Показана представленность вновь синтезированных цепей ДНК, определенная путем глубокого секвенирования. Серый блок на схеме показывает 5' район гена *FMR1*. Протяженность этого блока около 3 т.п.н. и в нем видны три ориджина репликации, обозначенные I, II и III. Позиции указаны согласно сборке генома человека GRCh37/hg19.

Более детально участок, содержащий ориджины, представлен на рисунке 29. На изображении ориджин I локализован ближе к центромере. Ориджины I и II локализованы более центромерно относительно точки начала транскрипции.

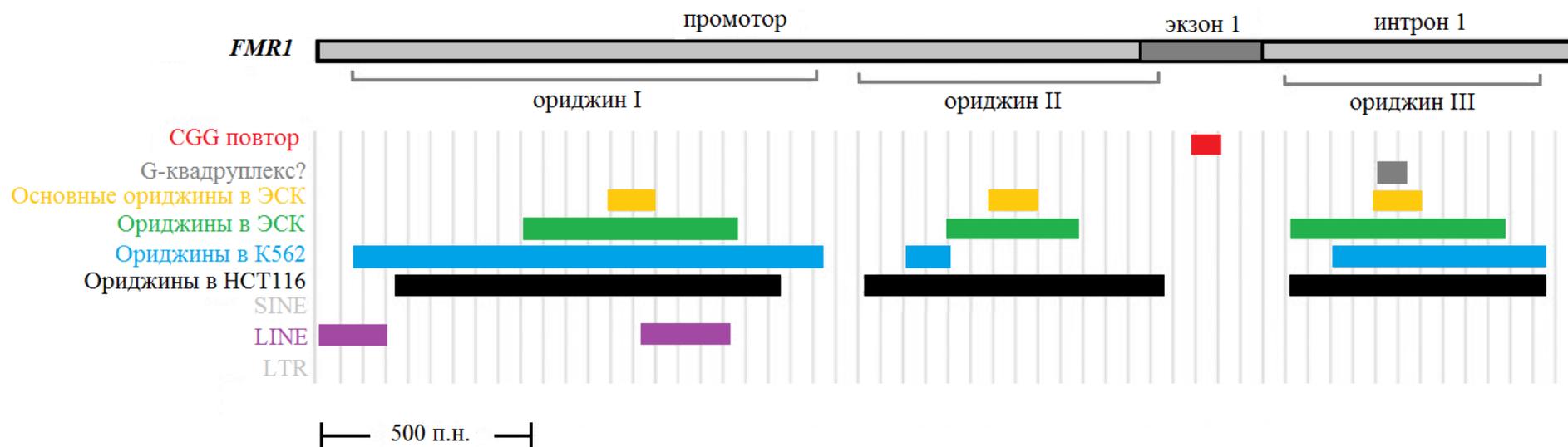


Рисунок 29. Схема участка длиной 3 т.п.н. в 5' районе гена *FMR1*, в котором выявлены три точки инициации репликации. Указаны различные структурные элементы, выявленные по последовательностям в данном районе.

Ориджин III локализован ниже CGG повтора в районе интрона 1. В клетках НСТ116 все три ориджина были разделены очень короткими районами, содержащими повторы. Таким образом, в линии клеток НСТ116 может быть единая зона активации репликации в 5' районе гена *FMRI*. На протяжении десятков тысяч пар нуклеотидов вокруг повтора CGG не наблюдается больше пиков со сравнимой активностью ориджинов репликации (см. рис. 28). Этот район активации репликации используется для удвоения ДНК всего района гена *FMRI*. Согласно опубликованным данным, выявленные три ориджина работают в различных типах клеток с подавлением активности других участков активации репликации (Borowiec, Schildkraut, 2011; Cayrou et al., 2011). Ранее для этого же района нами показаны мотивы ориджинов репликации в эмбриональных стволовых клетках (см. рис. 29). Они имеют GC-содержание 52, 60 и 71% соответственно. Основной ориджин содержит фрагменты древнего ретротранспозона без LTR – L2b из семейства LINE-2 (см. рис. 29). Центромерная часть ориджина I содержит фрагмент другого ретротранспозона L1ME5, который относится к семейству LINE-1. Внедрение фрагментов этих элементов в функциональные части генома человека являются примером того, как автономно реплицирующиеся повторенные элементы, представленные в геноме млекопитающих, в итоге могут быть использованы хозяином. В ранее опубликованных работах предположено, что G-квадруплексы являются нормальной частью ориджинов млекопитающих с G4 мотивами и петлями размером 1-15 нуклеотидов. Например, они обнаружены в 91% ориджинов клеток IMR-90 (Besnard et al., 2012). Оценка 5' конца гена *FMRI* на наличие G4 мотивов и петель таких последовательностей не выявила. Однако последовательность, которая потенциально может формировать G-квадруплекс (5'GGGGTGAGCTGGGGATGGGCGAGGGCCGGCAGGТАCTAGAGCCGGGCGGGAAGGG3') была обнаружена в ориджине III.

5.4. Активация репликации в районе гена *FMR1* в линиях иммортализованных В-лимфоцитов

Оценка количества вновь синтезированных фрагментов ДНК в районе промотора гена *FMR1* проведена в В-лимфоцитах пациентов и в контрольных клеточных линиях в присутствии и отсутствии 5-фтордезоксифторуидина. Оценка проводилась с использованием праймеров, опубликованных ранее (см. табл. 3, рис. 30) (Gray et al., 2007). Были выделены фрагменты ДНК размером 0,5-1 т.п.н. Протяженность исследуемого района составила 17 т.п.н. Следует учесть, что эффективность амплификации в ПЦР зависит от положения и размера CGG повтора, его статуса метилирования и, таким образом, может отличаться в контрольных клеточных линиях и клетках пациентов.

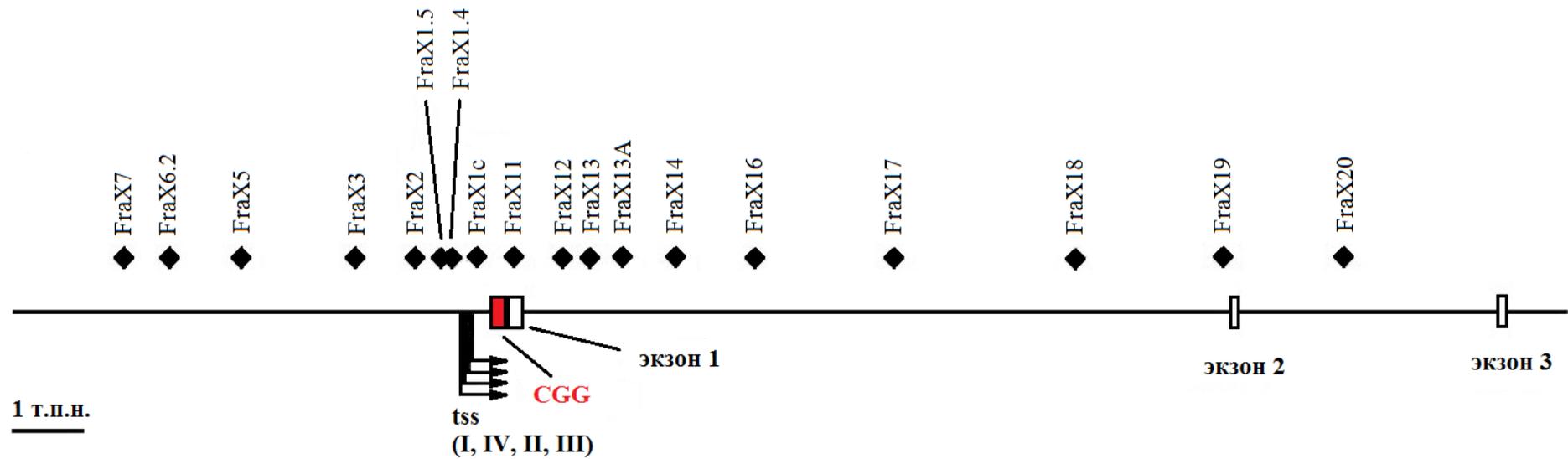


Рисунок 30. Позиции пар праймеров, использованных для анализа представленности вновь синтезированных фрагментов ДНК в 5' районе гена *FMR1*.

FraXN – обозначения пар праймеров, tss – сайты начала транскрипции.

Эффективность ПЦР исследовали в районах, непосредственно прилегающих к 5' и 3' концам CGG повтора. В результате было обнаружено, что эффективность амплификации при использовании в качестве матрицы геномной ДНК не отличалась в линиях клеток пациентов и контрольных клеточных линиях (см. Приложение 2). Таким образом, можно считать, что фактор длины повтора не влиял на результаты эксперимента.

В отсутствие 5-фтордезоксипуридина контрольная клеточная линия GM06895, несущая нормальный аллель гена *FMR1*, показала широкий почти симметричный пик активации репликации, охватывающий CGG повтор на 5' конце гена *FMR1* (рис. 31). Таким образом, в норме в гене *FMR1* в В-лимфоцитах присутствует зона активации репликации, расположенная ближе к теломере относительно ориджина репликации, описанных ранее для фибробластов по такой же методике (Brylawski et al., 2007; Gray et al., 2007). Высота пика, наблюдаемого в В-лимфоцитах, примерно в 20 раз выше таковой для хорошо охарактеризованного ориджина гена *LMNB2*. Этот пик расположен немного выше CGG повтора и совпадает с ориджином II, выявленным методом глубокого секвенирования в других клеточных линиях.

Во второй контрольной клеточной линии GM06865 в исследуемом районе также наблюдался пик активации репликации, однако общая высота пика была ниже, чем в линии GM06895 относительно таковой в гене *LMNB2*. Кроме того, в дополнение к основному пику, расположенному немного ниже CGG повтора, на 5' конце наблюдается небольшой дополнительный пик активации репликации (см. рис. 31).

Премутантная клеточная линия GM06891, несущая 112 CGG повторов, а также особая клеточная линия GM06897, несущая неметилированную полную мутацию размером 477 триплетов, показали профили активации репликации, состоящие из нескольких пиков в одном и том же районе (рис. 32). Кроме того, исследования варианта линии GM06891, в котором произошла экспансия повторов во время культивирования до 183 триплетов, выявили, что ее профиль активации репликации не отличается от исходной клеточной линии.

Профиль активации репликации, показанный для контрольной клеточной линии GM06865, примерно совпадал с данными по локализации ориджинов I, II и III, полученными при анализе генома (см. 5.3.). То, что не наблюдается трех отдельных пиков в других клеточных линиях может быть обусловлено либо разрешающей способностью метода, либо особенностями использования различных ориджинов в этих клеточных линиях. Однако, во всех исследованных культурах район, соответствующий ориджину II, показал наивысший уровень активации репликации в отличие от ориджинов I и III, что говорит о преимущественном использовании именно ориджина II в В-лимфоцитах.

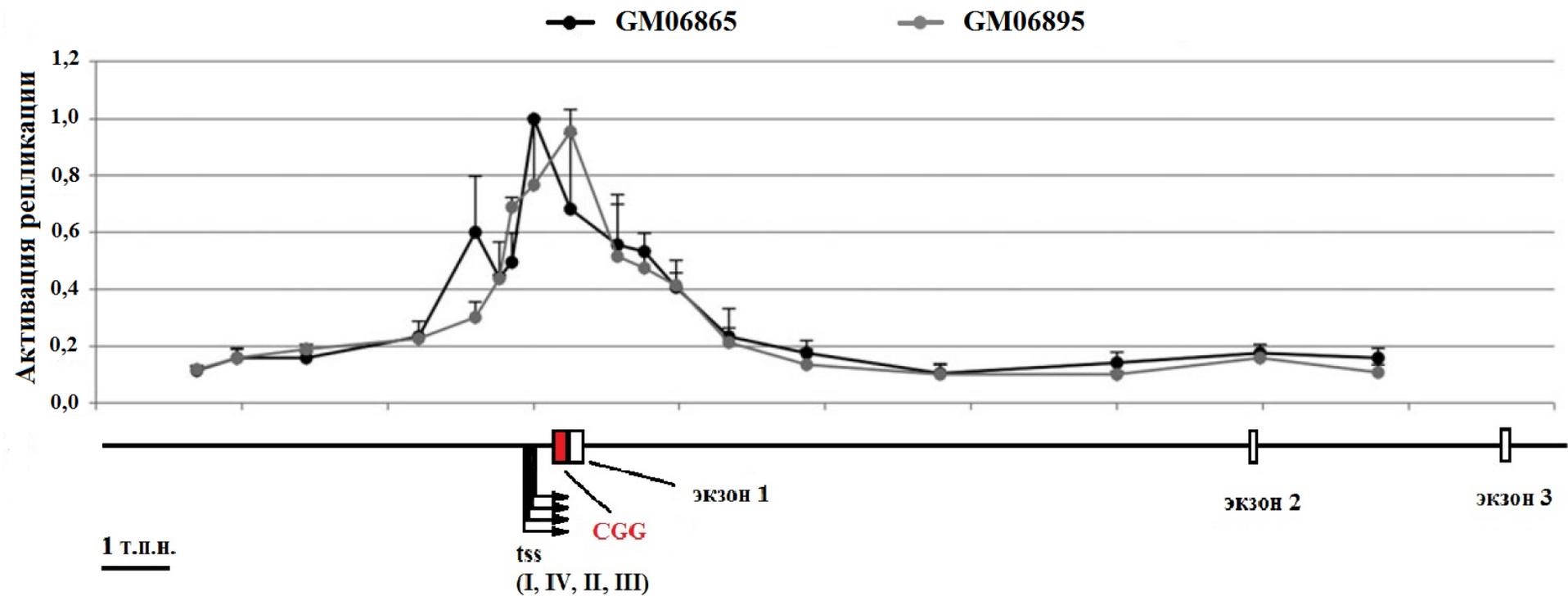


Рисунок 31. Профиль активации репликации в районе гена *FMR1* в контрольных клеточных линиях (tss – сайты начала транскрипции).

Вертикальные отрезки – доверительные интервалы.

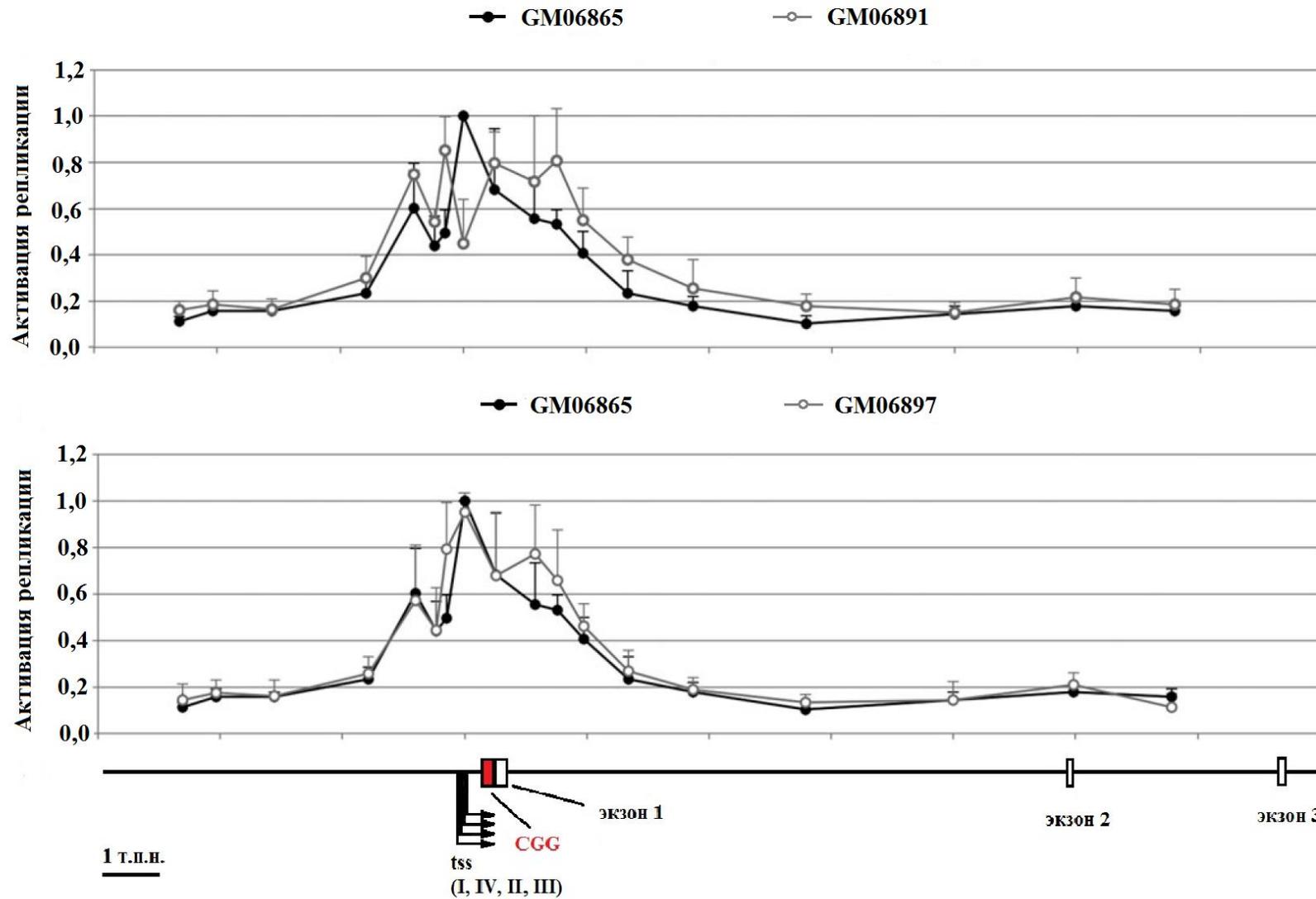


Рисунок 32. (Подпись на следующей странице).

Рисунок 32 (на предыдущей странице). Сравнение профилей активации репликации в премутантной клеточной линии – GM06891, клеточной линии с неметирированной полной мутацией GM06897 и контрольной клеточной линии GM06865.

Разница в длине CGG повтора во всех клеточных линиях не отмечена на схеме. tss – сайты начала транскрипции. Вертикальные отрезки – доверительные интервалы.

Иной характер имеет активация репликации в линиях клеток, несущих полную мутацию: GM03200 и GM04025. В районе ориджина II присутствует провал профилей активации репликации. При этом количество ПЦР продукта непосредственно в районе CGG повтора с 5' конца (праймер F_{gax1C}) было в 13-80 раз ниже, чем в случае контрольной линии клеток, а с 3' конца (праймер F_{gax11}) – в 5-15 раз ниже, чем в контроле. При этом можно увидеть два пика: в районе ориджинов I и III (рис. 33). Снижение количества вновь синтезированных фрагментов в районе F_{gax1C} и F_{gax11} не связано с эффективностью репликации. Таким образом, активация репликации в районе ориджина II, который является основным в контрольных клеточных линиях, подавлена у пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы.

Для исследования влияния 5-фтордезоксисуридина на профили активации репликации был проведен аналогичный эксперимент, но с инкубацией клеток в присутствии 0,1 мкМ реагента в течение 2 и 18 часов. Профили репликации не изменялись по сравнению с необработанными клетками, независимо от времени воздействия реагента (рис. 34). Таким образом, 5-фтордезоксисуридин не создает каких-либо дополнительных трудностей репликации в клеточных линиях пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы.

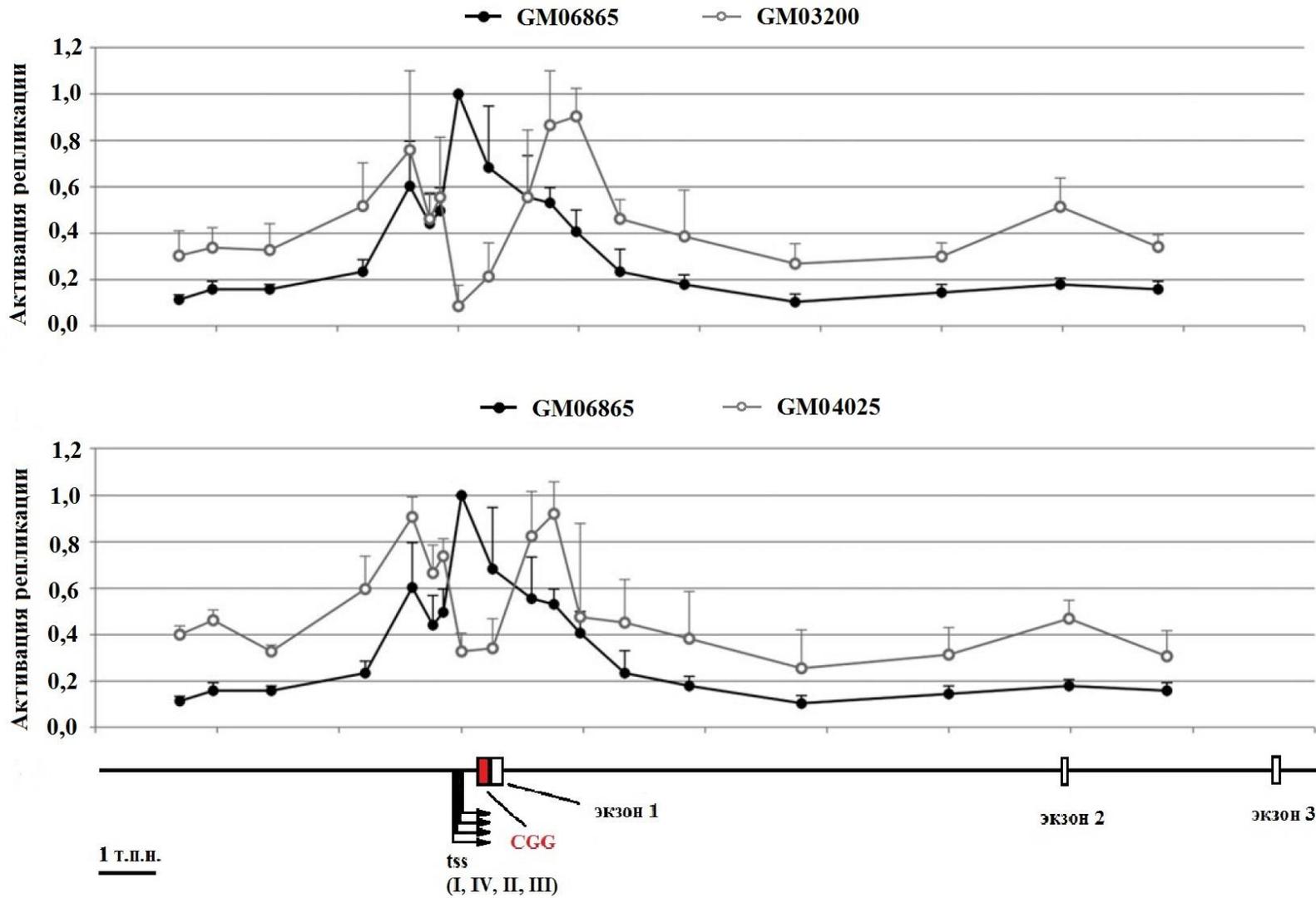


Рисунок 33. (Подпись на странице 171).

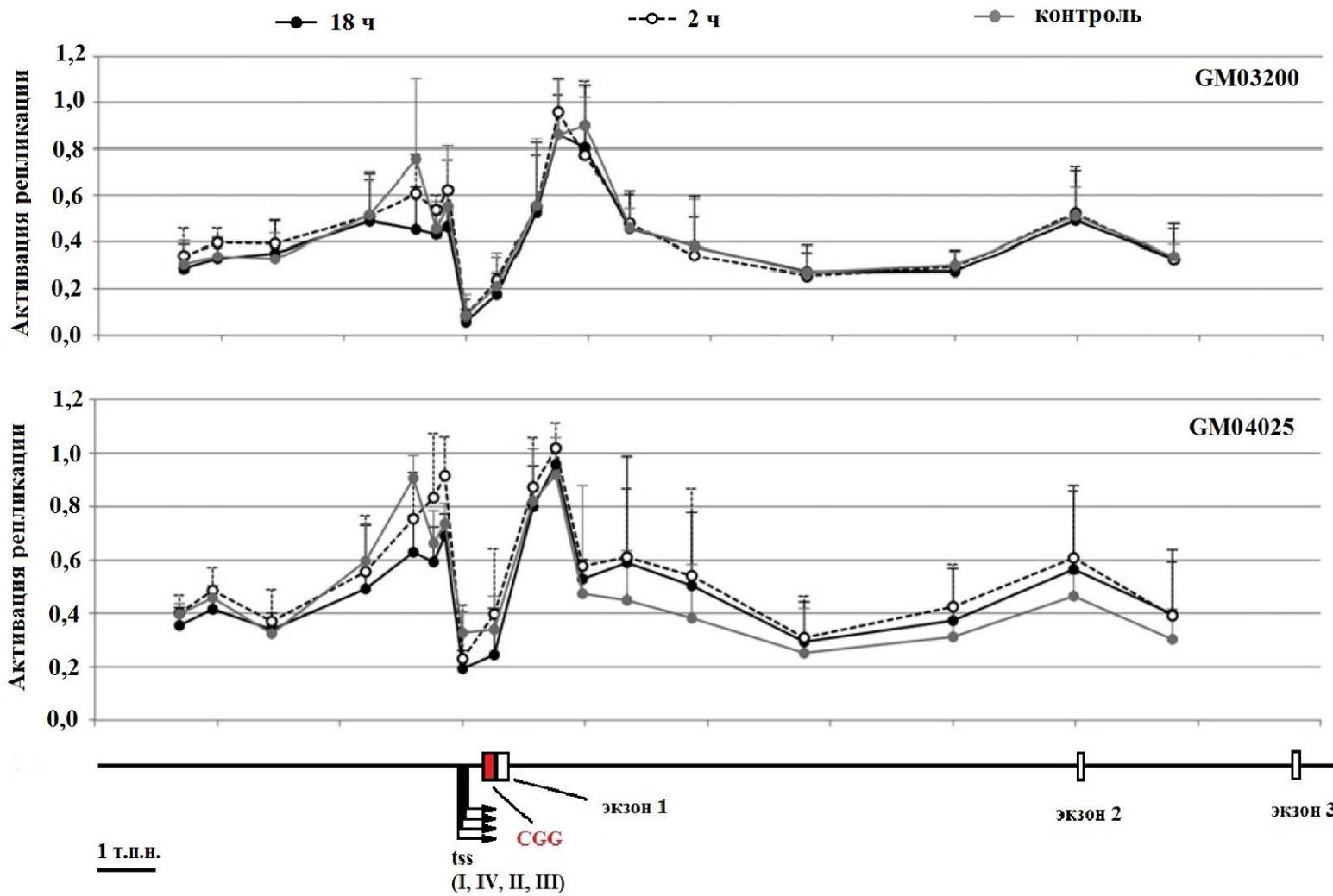


Рисунок 34. (Подпись на странице 171).

Рисунок 33. (На странице 169). Сравнение профилей активации репликации в клеточных линиях с полной мутацией – GM03200 и GM04025 с контрольной клеточной линией GM06865.

Разница в длине CGG повтора во всех клеточных линиях не отмечена на схеме; tss – сайты начала транскрипции; вертикальные отрезки – доверительные интервалы.

Рисунок 34. (На странице 170). Влияние времени инкубации клеток в присутствии 5-фтордезоксипуридина на профили активации репликации в культурах клеток пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы (GM03200 и GM04025) (обозначения как на рис. 33).

5.5. Особенности репликации фолатчувствительных ломких сайтов хромосом

В норме ген *FMRI* реплицируется поздно, а аллели, несущие полную мутацию, реплицируются еще позже. Для понимания того, является ли поздняя репликация общим свойством фолатчувствительных ломких сайтов, проведено исследование времени репликации 23 других фолатчувствительных ломких сайтов, которые экспрессируются в лимфобластоидных клетках (Lukusa, Fryns, 2008). По базам данных (см. 2.2.14.) проанализировано время репликации фолатчувствительных ломких сайтов с точно известной хромосомной локализацией (FRAXA (Verkerk et al., 1991), FRAXE (Gecz et al., 1996; Gu et al., 1996), FRAXF (Parrish et al., 1994; Ritchie et al., 1994), FRA10A (Sarafidou et al., 2004), FRA11A (Debacker et al., 2007), FRA11B (Jones et al., 1995), FRA12A (Winnepeninckx et al., 2007)), в линиях клеток: BG02 (эмбриональные стволовые клетки), C0202-1 (лимфобластоидные клетки) и IMR90 (фибробласты). Все эти линии клеток не экспрессируют исследуемые ломкие сайты. В результате нами установлено, что лишь некоторые из указанных ломких сайтов реплицируются поздно в данных клеточных линиях, в то время как большинство – в ранней S-фазе. Для остальных 16-ти фолатчувствительных ломких сайтов, районы локализации которых не являются точно картированными,

показано, что некоторые из них расположены в ранореплицирующихся районах, другие в позднеореплицирующихся районах, третьи в смешанных районах (табл. 7).

Таблица 7. Время репликации некартированных фолатчувствительных ломких сайтов хромосом

Ломкий сайт	Примерная локализация	Время репликации
FRA1M	1p21.3	Поздняя
FRA2A	2q11.2	Смешанная
FRA2B	2q13	Преимущественно ранняя
FRA2K	2q22.3	Преимущественно поздняя
FRA2L	2p11.2	Смешанная
FRA5G	5q35	Преимущественно ранняя
FRA6A	6p23	Смешанная
FRA7A	7p11.2	Преимущественно ранняя
FRA8A	8q22.3	Ранняя
FRA9A	9p21	Преимущественно поздняя
FRA9B	9q32	Ранняя
FRA12D	12q24.13	Поздняя
FRA16A	16p13.11	Ранняя
FRA18C	18q22.1	Поздняя
FRA19B	19p13	Ранняя
FRA20A	20q11.23	Ранняя
FRA22	22q13	Смешанная

Таким образом, фолатчувствительные ломкие сайты хромосом реплицируются на разных этапах S-фазы клеточного цикла. Поздняя репликация локуса, содержащего CGG повтор, не является фактором, определяющим ломкость хромосом. Следует отметить, что общим свойством всех точно картированных фолатчувствительных ломких сайтов является их расположение в 5' областях генов и наличие одного или нескольких кластеризованных ориджинов (рис. 35).

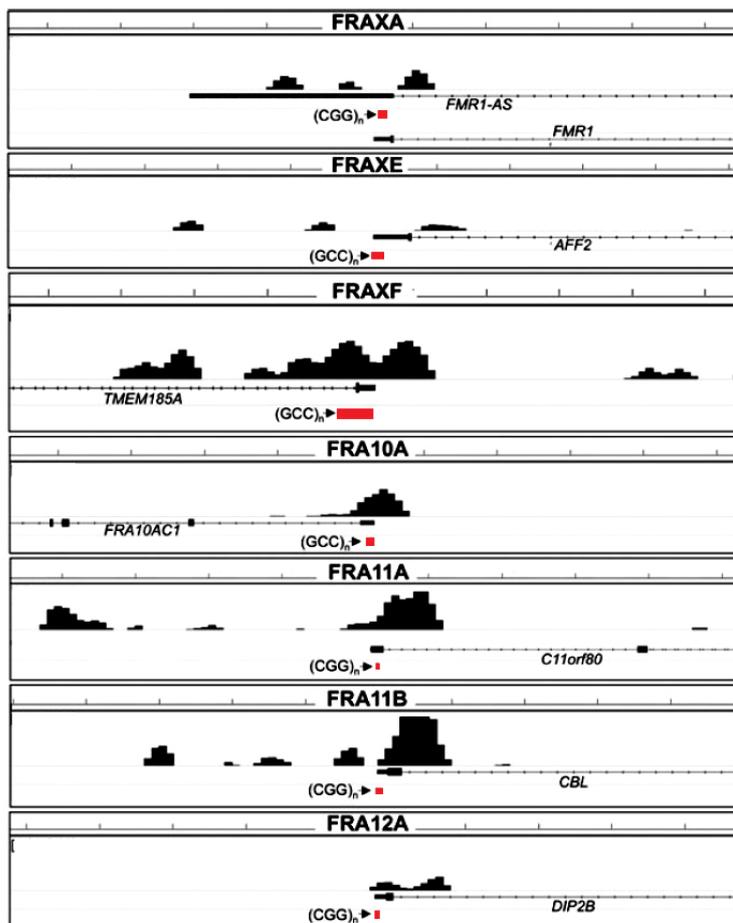


Рисунок 35. Ориджины репликации в районе фолатчувствительных ломких сайтов в эмбриональных стволовых клетках.

Локализация ориджинов установлена путем анализа баз данных результатов глубокого секвенирования вновь синтезированных цепей ДНК. Длина рамки составляет 10 т.п.н., каждый сайт отцентрован по самому активному ориджину.

5.6. Анализ причин ломкости сайта FRAXA

В проведенных ранее исследованиях путем анализа представленности вновь синтезированных цепей ДНК в промоторной области гена *FMRI* в фибробластах были обнаружены ориджины репликации (Brylawski et al., 2007; Gray et al., 2007). Используя такой же подход, в представленном исследовании установлено, что клеточные линии В-лимфоцитов, полученные как от пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы, так и от здоровых контролей, также содержат область активации репликации в промоторной области гена *FMRI*, которая захватывает CGG повтор. Было выявлено три пика активации репликации, что соответствует данным, полученным ранее методом глубокого секвенирования. Эта зона ориджинов является GC богатой (60,1%), а ее 3' конец, в частности ориджин III, соответствует критерию CpG островков с содержанием GC 69% и наблюдаемым/ожидаемым CpG соотношением 80%. Тут расположены сайты начала транскрипции, что характерно для других зон инициации репликации (Sequeira-Mendes et al., 2009; Martin et al., 2011).

В-лимфоциты пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы, в которых нет транскрипции гена *FMRI* и присутствует экспрессия ломкого сайта, показали изменение профиля активации репликации по сравнению с нормальной клеточной линией и неметилированной полной мутацией, которая сохраняет экспрессию гена. Согласно полученным данным, количество вновь синтезированных цепей из центральной зоны активации, соответствующей ориджину II, катастрофически снижается в клеточных линиях пациентов. Это указывает на то, что метилированный повтор влияет на активацию репликации и рост цепей. Однако он не затрагивает активность ориджинов I и III. Поскольку использованный подход позволяет анализировать лишь фрагменты ДНК размером менее 1 т.п.н., а ориджин I расположен на расстоянии 1 т.п.н. от повтора, какие-либо проблемы репликации, стартовавшей с этого ориджина через повтор, не могут быть выявлены данным методом. Предыдущие исследования, проведенные на фибробластах, полученных от пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы, не выявили изменений профилей активации, характерных для этих пациентов. Однако там было показано, что

основным ориджином является ориджин I (Gray et al., 2007). Таким образом, любое влияние повтора на репликацию также не может быть выявлено в пуле фрагментов менее 1 т.п.н. в этом типе клеток. Ориджин III также удален от повтора, как и ориджин II, таким образом, повтор должен влиять на инициацию репликации на ориджине III, как и на ориджине II. Однако полученные в данной работе результаты говорят об обратном. Повтор имеет разное влияние на ориджины II и III, а это наиболее используемые ориджины на 5' конце гена *FMRI* в В-лимфоцитах в норме и у пациентов. Известно, что доминирующий ориджин подавляет активацию соседних ориджинов (Borowiec, Schildkraut, 2011; Cayrou et al., 2011). В результате можно наблюдать ломкий сайт, так как для завершения репликации требуются дополнительные точки инициации репликации.

Ранее было сделано предположение, что в районах ломких сайтов хромосом существуют проблемы репликации при нормальных физиологических условиях и ингибировании активности белков репарации, таких как АТМ и АТР (Kumari et al., 2009). Полученные данные подтверждают то, что нарушенный профиль активации репликации наблюдается как в присутствии, так и в отсутствии 5-фтордезоксисуридина. Однако причина возникающих проблем репликации остается неясной. Поскольку транскрипция аллелей с полной мутацией подавлена, вероятно, ориджин II является чувствительным к транскрипционному статусу гена *FMRI*, в то время как ориджин I и ориджин III не чувствительны. Однако факт того, что весь 5' конец гена включает в себя зону инициации репликации и глубоко метилирован опровергает гипотезу о том, что ориджин II ингибирован, а ориджины I и III остаются активными. В ряде исследований установлено, что транскрипционный статус не является определяющим для активности ориджинов (Cohen et al., 2003; Gomez, Brockdorff, 2004; Chastain et al., 2006; Brylawski et al., 2007). Связь между активностью ориджинов и уровнем транскрипции была обнаружена в эмбриональных стволовых клетках мыши (Sequeira-Mendes et al., 2009). Однако в таких клетках ген *FMRI* активен даже в случае полной мутации. Таким образом, гетерохроматинизация района и подавление экспрессии гена не объясняет причин подавления активности ориджина II.

Альтернативным объяснением причин подавления активации репликации может служить работа 1995 года, в которой установили, что CGG повтор формирует вторичные структуры, которые блокируют синтез ДНК *in vitro* (Usdin, Woodford, 1995). Остановка репликативной вилки также наблюдалась в клонированном CGG повторе в трансфицированных клетках приматов (Voineagu et al., 2009). Во время репликации, стартующей с ориджина II, CGG повтор будет находиться на отстающей цепи. Нахождение его именно на отстающей цепи делает остановку репликативной вилки более критичной, чем на лидирующей CGG цепи, что продемонстрировано на примере бактерий и грибов (Samadashwily et al., 1997; Pelletier et al., 2003). Это свидетельствует о том, что CGG повтор формирует более стабильные вторичные структуры, чем CGG повтор, и тем самым оказывает большее влияние на репликативную вилку. Когда происходит активация репликации на ориджине III, т.е. ниже повтора, CGG будет находиться на отстающей цепи. Таким образом, ориджин III не будет так чувствителен к присутствию повтора как ориджин II. Любые проблемы репликации будут усугубляться фактом того, что благодаря близости ориджина II CGG повтор будет реплицироваться с помощью ДНК-полимеразы α , той самой, которая участвует в инициации репликации. Эта полимераза менее процессивна, чем δ или ϵ – полимеразы, участвующие в более поздних этапах репликации, и поэтому она с большей вероятностью не может пройти участки со сформированными вторичными структурами (Focher et al., 1989; Weiser et al., 1991). Таким образом, наличие повтора оказывает большее влияние именно на ориджин II, чем на более дистально расположенные ориджины репликации.

Обработка клеток пациентов 5-фтордезоксифторуридином индуцирует образование ломких сайтов FRAXA, при этом не меняя профиля активации репликации. Это свидетельствует о том, что 5-фтордезоксифторуридин не усугубляет проблем репликации, которые уже существуют в районе ломкого сайта. Действие реагента скорее всего не прямое, а опосредовано нарушением баланса нуклеотидов, что влияет на репликацию в целом в клетке. Более медленная репликация по причине нарушения баланса нуклеотидов приводит к увеличению числа клеток, которые

вошли в митоз до завершения репликации локуса FRAXA. Если это так, то обработка камптотецином снижает ломкость хромосом не из-за того, что снижает количество нарушений ДНК, блокирующих репликативную вилку, как предполагалось для обычных ломких сайтов (Arlt, Glover, 2010). Ломкость хромосом снижается посредством эффективного включения клеточных чекпойнтов, которые не дают клетке перейти к митозу и, тем самым, дают время на завершение репликации CGG повтора. Это подтверждается тем фактом, что митомицин С, который не взаимодействует с топоизомеразой I, имеет аналогичный эффект снижения ломкости сайта FRAXA. Также это соответствует ранее полученным данным о том, что UCN-01, ингибитор CHK1, важной чекпойнткиназы S-фазы клеточного цикла, повышает ломкость хромосом в локусе FRAXA. Причина повышения ломкости заключается в отсутствии контроля в чекпойнте, клетки быстрее входят в митоз (Kumari et al., 2009). Исходя из этого, можно предложить модель образования ломкого сайта FRAXA, которая основана на том, что в районе экспансии CGG повтора подавлена инициация репликации, а общее замедление процесса удвоения ДНК в клетке в результате добавления 5-фтордезоксифторуридина приводит к недорепликации и образованию разрывов на хромосомах (рис. 36).

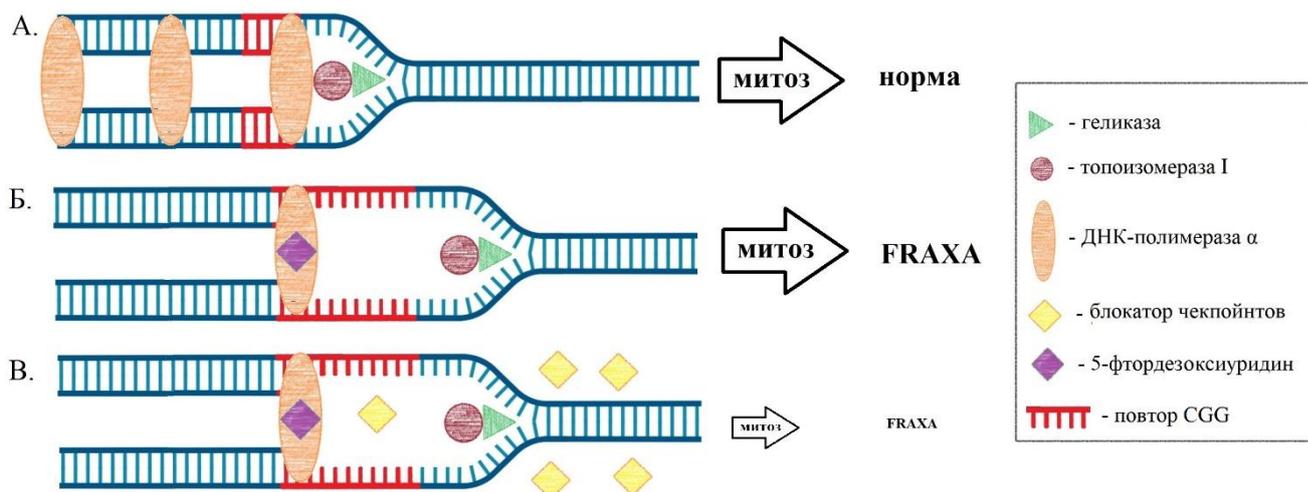


Рисунок 36. Модель образования ломкого сайта FRAXA.

А – при нормальном размере повтора движение комплекса геликаза/топоизомеразы I соответствует активности инициации репликации и ДНК-полимеразы I, идет нормальное удвоение ДНК. Б – при увеличенном повторе и добавлении 5-фтордезоксифторуридина идет общее подавление репликации и инициации репликации, при этом, что инициаторная активность и так снижена в районе ломкого сайта. При этом продолжается работа комплекса геликаза/топоизомеразы I и происходит недорепликация расплавленных участков. Как результат участок не успевает реплицироваться во время митоза и образуется ломкий сайт FRAXA. В – при ситуации аналогичной Б, но в присутствии любого ингибитора прохождения чекпойнтов снижается количество клеток, перешедших к делению, тем самым появляется запас времени на репликацию участка повтора и количество ломких сайтов FRAXA снижается.

Другие 23 фолатчувствительных сайта имеют молекулярную основу, сходную с сайтом FRAXA. Такие сайты, если они расположены в районах ранней репликации, зачастую имеют CGG тракты намного длиннее, чем тот, который присутствует в сайте FRAXA. В результате формируются вторичные структуры, приводящие к более серьезным нарушениям репликации и, таким образом, требующие большего времени для завершения S-фазы. В результате несмотря на более раннее начало репликации эти ломкие сайты также не успевают ее закончить до начала митоза. Интересно, что не только FRAXA, но другие фолатчувствительные ломкие сайты расположены в 5' промоторных районах генов в области ориджинов репликации (Chastain et al., 2006). Все они ассоциированы с повтор-опосредованным метилированием. Вероятно, расположение этих локусов в

5'-UTR генов и определяет образование ломких сайтов, так как повтор реплицируется чаще всего с помощью низкопроцессивной ДНК-полимеразы α из-за близости расположения ориджинов репликации.

Факт того, что даже в отсутствие 5-фтордезоксисуридина есть затруднение репликации в районе FRAXA, позволяет предположить, что ломкость хромосом – это не просто артефакт, присутствующий *in vitro*. Женщины, носительницы метилированной полной мутации по гену *FMRI*, очень часто являются носительницами мозаичного синдрома Шерешевского-Тернера, при котором теряется X-хромосома, несущая мутантный аллель (Dobkin et al., 2009). Это может являться последствием ломкости хромосом и появления разрыва в районе FRAXA. Слияние двух сестринских хроматид после разрыва приводит к образованию дицентрической хромосомы, которая теряется при клеточном делении. Однако нет данных о потере хромосом, несущих другие ломкие сайты, что, вероятно, связано с тем, что потеря аутосом, в отличие от X-хромосомы, является летальной для клетки.

ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ДЕАЦЕТИЛАЗ ГИСТОНОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА *FMRI*

6.1. Необходимость разработки подходов для реактивации гена *FMRI*

Исследование молекулярных механизмов развития любого заболевания имеет конечной целью разработку средств для его излечения. Разработки методов терапии синдрома ломкой X-хромосомы ведутся практически с момента его открытия и описания причин его развития. Один из таких методов – это симптоматическая терапия. Некоторые симптомы могут быть подавлены антагонистами рецептора Gp1mGlu, либо агонистами рецепторов γ -аминомасляной кислоты (D’Hulst, Кооу, 2007). Стандартная клиническая практика включает лечение пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы с использованием препаратов фолиевой кислоты (Rueda et al., 2011). Также есть работы, указывающие на определенный симптоматический эффект миноциклина в лечении таких пациентов (Mila et al., 2017). Описанные подходы имеют один и тот же общий недостаток, такая терапия не влияет на молекулярный механизм развития заболевания и не восстанавливает экспрессию гена *FMRI*. Поиск лекарственных средств, которые бы восстанавливали экспрессию данного гена, безусловно, является очень актуальной проблемой в исследовании фраксопатий.

Развитие терапевтических подходов для лечения синдрома ломкой X-хромосомы, которые бы затрагивали молекулярный механизм развития заболевания, включает в себя поиск веществ, способных ингибировать ферменты, отвечающие за гетерохроматинизацию. Именно гетерохроматинизация является причиной выключения экспрессии гена *FMRI*. Один из таких подходов включает использование 5-азадезоксцитидина – ингибитора ДНК-метилтрансфераз. Известно, что это вещество активирует экспрессию гена *FMRI* в клеточных линиях, полученных от пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы (Chiurazzi et al., 1998; Tabolacci et al., 2016b). Недостатком использования этого вещества является его крайне высокая цитотоксичность, что выводит его из ряда потенциальных

терапевтических агентов. Дополнительно проводятся исследования других ферментов модификации хроматина – деацетилаз гистонов. Слабое, но очевидное реактивирующее влияние на ген *FMRI* было показано для трех ингибиторов деацетилаз гистонов: 4-фенилбутирата, бутирата натрия и трихостатина А. Однако из-за крайне низкого реактивирующего эффекта эти ингибиторы также не могут быть использованы в клинической практике (Chiurazzi et al., 1999). Бутираты являются производными масляной кислоты, в то время как трихостатин А является гидроксамовой кислотой.

На сегодня три ингибитора деацетилаз гистонов одобрены FDA (Food and Drug Administration, США) как лекарства для лечения рака: вориностат, белиностат и ромидепсин. Вориностат и белиностат относятся к гидроксамовым кислотам. Таким образом, они аналогичны по своей структуре и принципу действия трихостатину А, и ингибируют деацетилазы гистонов I и II классов. Ромидепсин – это дипептид, ингибирующий деацетилазы гистонов I класса. Именно ингибиторы гистоновых деацетилаз рассматриваются как наиболее перспективные реактиваторы подавленной экспрессии гена *FMRI* для возможного внедрения в клиническую практику (Tabolacci, Chiurazzi, 2013).

6.2. Влияние 5-азадезоксцитидина на экспрессию гена *FMRI*

Для данной части работы были взяты четыре клеточных линии: две контрольных линии клеток – GM06895 и GM06865, и две линии клеток от пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы – GM04025 и CPG7. Для всех клеток был характерен нормальный кариотип $2n=46$, и ожидаемый уровень экспрессии гена *FMRI*. Для того, чтобы показать возможность реактивации этого гена в исследуемых клеточных линиях пациентов была проведена обработка клеток известным реактиватором – 5-азадезоксцитидином, который ингибирует ДНК-метилтрансферазы и, тем самым, снижает гетерохроматинизацию. Реактивация гена *FMRI* была обнаружена во всех исследуемых клеточных линиях (табл. 8). Следует отметить, что в линии клеток пациента GM04025 реактивация происходит до уровня экспрессии в контрольных клеточных линиях без обработки. В линии

клеток пациента CPG7 также наблюдали достоверную реактивацию, однако, на более низком уровне.

Таблица 8. Экспрессия гена *FMRI* в различных линиях клеток в зависимости от обработки реагентами.

Линия клеток	5-азадезоксцитидин		Ингибиторы деацетилаз гистонов			
	Контроль	Эксперимент	Контроль	ДМСО	Трихостатин А	Вориноста
GM06895	1,02±0,3	12,09±3,27	1,00±0,11	1,11±0,05	1,36±0,15	1,41±0,08
GM06865	5,57±1,19	10,48±0,22	9,50±2,85	7,36±1,10	9,85±1,86	6,05±2,59
GM04025	0	4,97±0,20	0	0	0,06±0,01	0,14±0,07
CPG7	0	0,30±0,05	0	0	0	0

Интересно, что после обработки 5-азадезоксцитидином контрольных клеточных линий в них также значительно увеличивался уровень экспрессии гена *FMRI*. Вероятно, это связано с тем, что в культуре частично представлены клетки с метилированными промоторами этого гена и в них экспрессии не происходит, тогда как обработка ингибитором ДНК-метилтрансфераз приводит к деметилированию промоторов в большей части клеточной популяции и повышению экспрессии в двух контрольных линиях почти до одного уровня. Во всех культурах клеток произошло значительное снижение жизнеспособности. Так в линии CPG7 она снизилась до 85%, в то время как в линии GM04025 жизнеспособность после обработки составила 68% от исходной. Эти данные еще раз подтверждают цитотоксичность 5-азадезоксцитидина.

6.3. Влияние ромидепсина и вориностата на экспрессию гена *FMRI*

Ключевым вопросом в исследовании влияния различных реагентов на клеточные процессы является подбор оптимальной концентрации для получения максимального положительного эффекта при минимальном отрицательном

влиянии. В ранее опубликованных исследованиях ромидепсин использовали для функционального анализа, и его оптимальная концентрация варьировала от 10 до 500 нМ (Mizutani et al., 2010). При использовании вориностата для функционального анализа его концентрация варьировала от 100 нМ до 5 мкМ (Yu et al., 2011). Исходя из этого, нами была изучена реактивирующая активность ромидепсина в концентрациях от 15 до 250 нМ. Концентрация вориностата варьировала от 0,25 до 5 мкМ. Во всех предыдущих исследованиях время обработки ромидепсином варьировало от 4 до 72 часов (Mizutani et al., 2010), а вориностатом от 1 до 96 часов (Yu et al., 2011). Основываясь на максимальном времени инкубации и выбранных концентрациях, инкубацию проводили в течение 72 часов. Подбор концентрации осуществляли на клеточной линии GM04025, так как в работах с 5-азадезоксцитидином она показала самую низкую жизнеспособность. Для каждой использованной концентрации оценивали жизнеспособность клеток и измеряли уровень мРНК гена *FMR1*. Ромидепсин не активировал экспрессию этого гена, более того инкубация с реактивом в высоких концентрациях приводила к полной гибели клеточной культуры. Таким образом, предварительные эксперименты показали, что ромидепсин не может быть использован как терапевтический активатор гена *FMR1* ввиду отсутствия детектируемого уровня мРНК гена и крайне высокой цитотоксичности реактива. В отличие от этого вориностат активировал экспрессию гена *FMR1* при концентрации 5 мкМ, однако высокая цитотоксичность все равно наблюдалась.

В эксперименте клеточные линии инкубировали с вориностатом в течение 72 часов. Для контроля клетки инкубировали с трихостатином А – хорошо известным ингибитором деацетилаз гистонов, который реактивирует экспрессию *FMR1* в клеточных линиях (Chiurazzi et al., 1999). В линиях GM06865 и GM06895 не было выявлено статистически значимых различий в экспрессии гена *FMR1* в присутствии и в отсутствии трихостатина А ($P > 0,05$) (см. табл. 8). Что касается инкубации с вориностатом, только линия GM06895 показала незначительное достоверное увеличение экспрессии гена *FMR1* ($P < 0,05$). В клеточной линии CPG7 детектируемый транскрипт *FMR1* не обнаружен как в ответ на обработку

вориностатом, так и трихостатином А (см. табл. 8). Однако вторая клеточная линия пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы GM04025 показала реактивацию гена *FMR1* в ответ на инкубацию как с трихостатином А, так и с вориностатом. Но разница в уровне экспрессии между двумя реактивами не была статистически достоверной ($P > 0,05$). Уровень экспрессии гена *FMR1* в линии GM04025 после обработки трихостатином А и вориностатом составил 6% и 14% от уровня экспрессии этого гена в контрольной линии GM06895. Все культуры клеток показали статистически достоверное снижение жизнеспособности в ответ на обработку как трихостатином А, так и вориностатом (рис. 37). Вориностат достоверно более цитотоксичный по сравнению с трихостатином А во всех клеточных линиях, за исключением GM04025, где различия не достоверны. Жизнеспособность контрольных клеточных линий выше по сравнению с линиями пациентов, в ответ на обработку ингибитором деацетилаз гистонов происходило менее выраженное снижение жизнеспособности (рис. 37). Вестерн-блот анализ показал незначительное увеличение количества белка FMRP в контрольных клеточных линиях в ответ на обработку ингибитором деацетилаз гистонов (рис. 38). Однако в клетках пациентов, в присутствии ингибиторов, белок не детектировался, даже если синтезировалась мРНК гена *FMR1*.

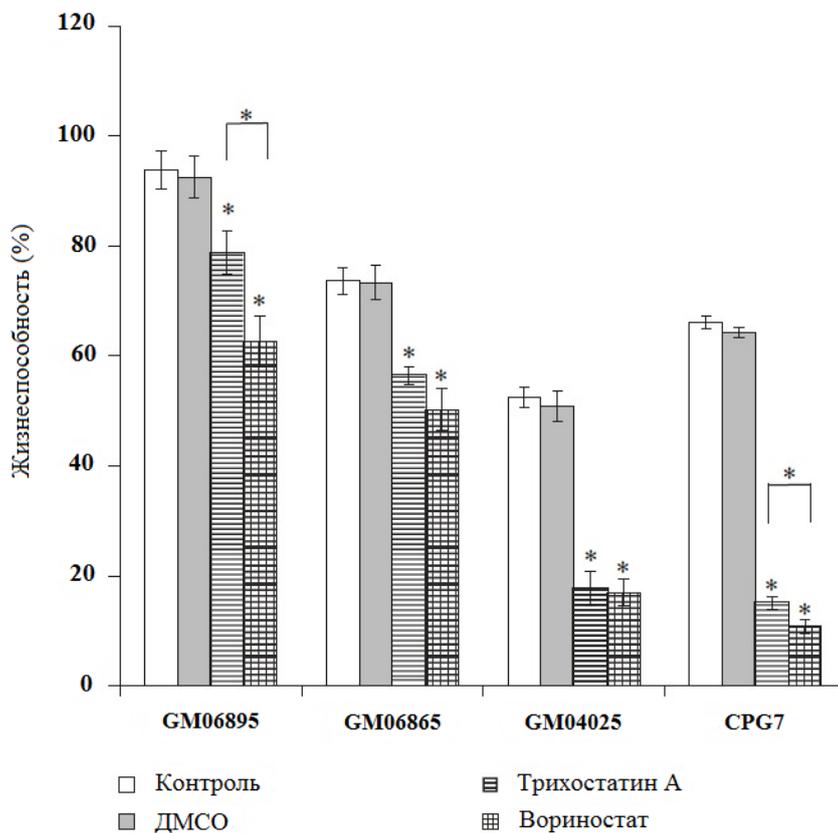


Рисунок 37. Жизнеспособность клеточных линий после обработки ингибиторами деацетилаз гистонов (* P<0,05).

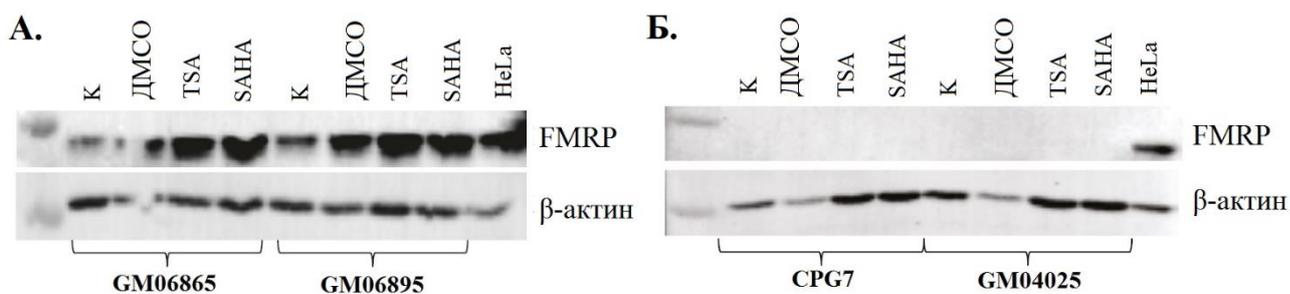


Рисунок 38. Уровень белка FMRP в контрольных клеточных линиях (А) и в линиях клеток пациентов (Б) после обработки ингибиторами деацетилаз гистонов: TSA – трихостатина А и SAHA – вориностага.

6.4. Перспективы использования ингибиторов деацетилаз гистонов в качестве потенциальных терапевтических препаратов для борьбы с фраксопатиями

Исследования реактивирующей способности деацетилаз гистонов позволяет приблизиться к решению двух вопросов: разработке подходов для терапии синдрома ломкой X-хромосомы и пониманию механизмов подавления экспрессии гена *FMRI*. Инкубация клеток с ромидепсином в повышающихся концентрациях приводила к полной гибели клеток без активации экспрессии гена *FMRI*. В отличие от этого вориностат в концентрации 5 мкМ активировал экспрессию гена *FMRI* в клеточной линии GM04025, полученной от пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы. Ромидепсин и вориностат являются ингибиторами деацетилаз гистонов I класса. Вориностат дополнительно ингибирует деацетилазы гистонов II класса. Активация гена *FMRI* с помощью вориностата и отсутствие активации с помощью ромидепсина, вероятно, указывает на то, что деацетилазы гистонов II, а не I класса, играют определенную роль в гетерохроматинизации промотора гена *FMRI*.

Вориностат активирует экспрессию гена *FMRI* в клеточной линии GM04025 на низком уровне. Аналогичный низкий уровень активации был показан ранее для другого ингибитора деацетилаз гистонов – трихостатина А (Chiurazzi et al., 1999). В линии GM04025 оба ингибитора активируют экспрессию гена *FMRI* на примерно одинаковом уровне без статистически значимых отличий ($P > 0,05$).

Повышение уровня экспрессии гена *FMRI* в нормальных клеточных линиях в ответ на обработку 5-азадезоскицитидином свидетельствует о том, что культура клеток гетерогенна по уровню метилирования промоторной области гена *FMRI*. Две контрольных клеточных линии имели различный уровень экспрессии гена до обработки реагентом и одинаковый уровень после инкубации с 5-azadC. Это говорит о том, что после обработки снимается метилирование в промоторной области тех клеток культуры, где оно было. В результате все клетки, присутствующие в культуре, продуцируют мРНК.

Активация гена *FMRI* с помощью ингибиторов ДНК-метилтрансфераз значительно выше, чем с помощью ингибиторов деацетилаз гистонов. Это установлено как в данной работе, так и в ряде предыдущих исследований других авторов (Chiurazzi et al., 1998; Chiurazzi et al., 1999). Следовательно, метилирование ДНК играет ключевую роль в подавлении экспрессии генов, дальнейшее деацетилирование гистонов является последствием метилирования ДНК. Крайне высокая цитотоксичность ингибиторов деацетилаз гистонов при их низком реактивирующем эффекте на ген *FMRI* исключает их дальнейшее рассмотрение в качестве вероятных терапевтических агентов для лечения синдрома ломкой X-хромосомы.

Также следует учесть еще один вариант механизма инактивации гена *FMRI*, который был предложен ранее. Транскрипция 5'-UTR гена *FMRI* приводит к формированию R-петли в районе GC-богатой ДНК, а ее взаимодействие с РНК приводит к формированию РНК:ДНК гибрида. Такие структуры включают гиперметилирование промотора гена *FMRI* (Colak et al., 2014; Loomis et al., 2014). Дальнейшее исследование этого механизма, вероятно, позволит найти новые подходы к терапии синдрома ломкой X-хромосомы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено комплексное молекулярно-генетическое исследование фраксопатий на модельных объектах – культуре клеток и лабораторных мышах, и на образцах тканей, полученных от пациентов с этими заболеваниями. Любое исследование наследственных заболеваний включает в себя ряд направлений, задача которых – определить природу и механизмы развития заболевания, провести эпидемиологический анализ, разработать эффективные технологии диагностики, профилактики и лечения. Это же касается и фраксопатий. Известно, что развитие этих заболеваний связано с экспансией повторов CGG в промоторной области гена *FMRI*. Она приводит к гетерохроматинизации и прекращению экспрессии гена. В результате перестает нарабатываться РНК-связывающий белок FMRP, который необходим для правильного развития нейронов. При этом существуют премутантные состояния, при которых нарушается баланс между уровнем мРНК гена *FMRI* и белка FMRP, что приводит к ряду клинических последствий. Экспансия повторов приводит еще к ряду последствий, таких как нарушение путей микроРНК, изменение транскрипции и трансляции всего локуса и образование ломкого сайта FRAXA на X-хромосоме. Образование этого ломкого сайта может приводить к развитию мозаичного синдрома Шерешевского-Тёрнера у женщин.

В представленной работе было проведено исследование соматической нестабильности при фраксопатиях. Удалось показать, что соматическая экспансия происходит в различных органах лабораторных мышей, моделей премутации, в разной степени. Она максимальная в клетках головного мозга, печени и несоматических клетках семенников. Это крайне важно для понимания развития заболевания у человека. Размер повтора определяет остроту симптомов. Соматическая экспансия, например, в головном мозге, может повышать клинические проявления заболевания, а сокращения повтора могут приводить к снижению остроты симптомов. Следует учитывать, что в случае работы с пациентами проводится анализ размера повтора CGG в образцах периферической венозной крови. Как показали результаты, полученные на модельных мышах, размер повтора в головном мозге при этом будет больше, за счет соматической

экспансии. Анализ посмертных образцов головного мозга пациентов с синдромом атаксии/тремора, ассоциированного с ломкой X-хромосомой, подтвердил наличие соматической экспансии в головном мозге человека.

Анализ образцов крови пациентов с фраксопатиями из ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница №1» выявил практически во всех образцах наличие соматического мозаицизма по размеру повтора CGG. Для оценки этого мозаицизма нами был разработан критерий – «индекс соматической нестабильности», который учитывает медиану длин всех аллелей и разброс значений этих длин. Индекс соматической нестабильности коррелирует с нарушениями функциональной коннективности между отделами головного мозга пациентов с фраксопатиями, что и отражает влияние длины повтора и соматической экспансии на остроту проявления симптомов, в частности на когнитивные способности.

Молекулярно-генетическая диагностика фраксопатий направлена в первую очередь на определение размера повтора, что наиболее информативно. Однако, крайне высокое GC-содержание промоторной области гена *FMR1* делает амплификацию этого участка нетривиальной задачей. Использование Саузерн-блот гибридизации для определения размера CGG повтора не позволяет точно его установить, что особенно важно для пограничных состояний и требует большого количества образца, что не всегда доступно. Альтернативный подход, при котором определяют наличие метилирования, прост в выполнении, однако наименее информативен из-за соматического мозаицизма. Мы разработали подход для визуализации ломкого сайта FRAXA с помощью FISH, который может быть использован для диагностики. Он заключается в локализации двух зондов, один из которых содержит ген *FMR1* и маркирует локус FRAXA, а второй содержит ген *GPR50* и маркирует дистальный участок хромосомы, который теряется при образовании ломкого сайта. Использование именно такого подхода позволяет значительно повысить информативность результатов гибридизации. Было описано пять паттернов локализации сигналов от двух зондов и достоверное повышение паттернов, характерных для ломкого сайта, у пациентов с синдромом ломкой X-

хромосомы при добавлении 5-фтордезоксидуридина к культивируемым клеткам. Разработанный подход был успешно использован для диагностики более 150 пациентов, обратившихся в ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница №1» с подозрением на синдром ломкой X-хромосомы.

Имея в руках инструмент визуализации ломкого сайта FRAXA, мы исследовали механизм его образования. Было показано, что в промоторной области гена *FMR1* в В-лимфоцитах находится зона активации репликации, которая содержит три ориджина с основным вторым ориджином. В клетках пациентов с полной мутацией катастрофически снижена активность основного ориджина, из-за чего затруднена репликация участка повтора. При фолатном стрессе снижается общий уровень репликации в клетке, в результате чего повтор CGG не успевает реплицироваться до вхождения клетки в митоз, образуется ломкий сайт. Эффект снижения ломкости при добавлении ингибиторов чекпойнтов связан с тем, что в митоз входит меньшее количество клеток с недореплицированным повтором.

В заключительной части работы была исследована возможность использования одобренных FDA ингибиторов деацетилаз гистонов – ромидепсина и вориностата – в качестве терапевтических агентов для борьбы с фраксопатиями для реактивации экспрессии гена *FMR1*. Результаты показали крайне низкую реактивирующую способность этих веществ, которая значительно уступала таковой у ингибиторов ДНК-метилтрансфераз. Это объясняется превалирующей ролью метилирования ДНК при подавлении экспрессии гена *FMR1*. Таким образом, мы считаем, что дальнейшее исследование деацетилаз гистонов в качестве агентов для терапии фраксопатий не имеет смысла. А развитие современных генотерапевтических подходов открывает новые возможности в поиске методов лечения этих заболеваний, например, с помощью удаления увеличенного повтора с использованием системы CRISPR/Cas9 или реактивации экспрессии гена *FMR1* путем доставки его рабочей копии к целевым клеткам.

ВЫВОДЫ

1. Соматическая экспансия повторов CGG у модельных мышей с премутацией по гену *fmr1* зависит от возраста и происходит преимущественно в головном мозге, печени и несоматических клетках семенников. В различных отделах головного мозга уровень экспансии разный, наиболее высокий в миндалевидном теле. Уровень экспансии не коррелирует с пролиферативной активностью клеток, уровнем транскрипции гена *fmr1* и уровнем белков Msh2, Msh3 и Msh6.

2. Соматическая экспансия повторов CGG выявлена в культурах клеток В-лимфоцитов человека с премутацией по гену *FMRI* и в головном мозге пациентов с синдромом атаксии/тремора, ассоциированного с ломкой X-хромосомой.

3. Разработана методика расчёта индекса соматической нестабильности у пациентов с фраксопатиями на основе медианы и разброса значений длин всех аллелей в образце. Установлена корреляция индекса соматической нестабильности и степени изменений функциональной коннективности отделов головного мозга пациентов с фраксопатиями.

4. Разработан подход для визуализации ломкого сайта FRAXA с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации с использованием двух зондов, несущих последовательности генов *FMRI* и *GPR50*. Выявлены 5 паттернов локализации, 3 из которых соответствуют норме, а два – наличию ломкого сайта. Показано достоверное увеличение количества паттернов, характерных для FRAXA, в клеточных линиях пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы при добавлении 5-фтордезоксифуридина.

5. Показано, что в промоторной области гена *FMRI* в В-лимфоцитах человека расположена зона активации репликации, представленная тремя ориджинами, обозначенными I, II и III. В клеточных линиях с полной мутацией по гену *FMRI* происходит значимое снижение активности доминирующего в норме ориджина II, что приводит к формированию ломкого сайта FRAXA вследствие незавершенной репликации.

6. 5-фтордезоксифуридин снижает эффективность репликации в клетке в целом из-за чего GC-богатый сайт FRAXA не успевает завершить репликацию при

вхождении клетки в митоз. Камптотецин и митомицин С выступают в роли блокаторов чекпойнтов и снижают количество делящихся клеток, что приводит к увеличению времени на репликацию FRAXA и снижению ломкости.

7. Исследование ингибиторов деацетилаз гистонов как реактиваторов экспрессии гена *FMRI* показало, что:

- ромидепсин не реактивирует экспрессию гена *FMRI*, а повышение концентрации реагента приводит к гибели клеток;

- вориностат реактивирует экспрессию гена *FMRI* на низком уровне.

Ингибиторы деацетилаз гистонов не могут рассматриваться как перспективные терапевтические агенты для борьбы с фраксопатиями.

8. Ингибиторы ДНК-метилтрансфераз имеют значительно больший реактивирующий эффект на ген *FMRI* в отличие от ингибиторов деацетилаз гистонов, что, вероятно, указывает на преобладающее значение метилирования ДНК в подавлении экспрессии этого гена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Разин Р.В. Хроматин и регуляция транскрипции. // Молекулярная биология. 2007. Т. 41. № 3. С. 387-394.

Стрельников В.В., Немцова М.В., Чеснокова Г.Г., Кулешов И.П., Залетаев Д.В. Диагностика синдрома Мартина-Белл на основе анализа структурно-функциональных изменений 5'-нетранслируемой области гена *FMR1*. // Молекулярная биология. 1999. Т. 33. № 2. С. 330-336.

Сучкова И.О., Баранова V.B., Кустова М.Е., Кислякова V.B., Васильев В.Б., Сломинская Н.О., Аленина Н.В., Паткин Е.Л. Сателлитная ДНК индуцирует гетерохроматинизацию хромосомной ДНК реципиента в клетках трансателлитной мышинной эмбриональной тератокарциномы. // Цитология. 2004. Т. 46. № 1. С. 53-61.

Толмачева Е.Н., Назаренко Р.А. Полиморфизм тринуклеотидных повторов локусов *FRAXA* и *FRAHE* у жителей г. Томска. // Генетика. 2002. Т. 38. № 2. С. 268-273.

Шацких А.Р., Гвоздев В.А. Формирование гетерохроматина и транскрипция в связи с *транс*-активацией генов и их пространственной организацией в ядре. // Биохимия. 2013. Т. 78. № 6. С. 784-794.

Abu Diab M., Mor-Shaked H., Cohen E., Cohen-Hadad Y., Ram O., Epsztejn-Litman S., Eiges R. The G-rich repeats in *FMR1* and *C9orf72* loci are hotspots for local unpairing of DNA. // Genetics. 2018. V. 210. P. 1239–1252.

Allen E.G., Sullivan A.K., Marcus M., Small C., Dominguez C., Epstein M.P., Charen K., He W., Taylor K.C., Sherman S.L. Examination of reproductive aging milestones among women who carry the *FMR1* premutation. // Hum. Reprod. 2007. V. 22. N. 8. P. 2142–2152.

Ambroziak W., Kozirowski D., Duszyc K., Gorka-Skoczylas P., Potulska-Chromik A., Slawek, J., Hoffman-Zacharska D. Genomic instability in the *PARK2* locus is associated with Parkinson's disease. // J. Appl. Genet. 2015. V. 56. P. 451–461.

Arlt M.F., Glover T.W. Inhibition of topoisomerase I prevents chromosome breakage at common fragile sites. // *DNA Repair (Amst)*. 2010. V. 9. N. 6. P. 678–689.

Arsenault J., Gholizadeh S., Niibori Y., Pacey L.K., Halder S.K., Koxhioni E., Konno A., Hirai H., Hampson D. R. FMRP expression levels in mouse central nervous system neurons determine behavioral phenotype. // *Hum. Gene Ther.* 2016. V. 27. N. 12. P. 982–996.

Ashley-Koch A.E., Robinson H., Glicksman A.E., Nolin S.L., Schwartz C.E., Brown W.T., Turner G., Sherman S.L. Examination of factors associated with instability of the *FMR1* CGG repeat. // *Am. J. Hum. Genet.* 1998. V. 63. P. 776–785.

Atsma F., Bartelink M.-L.E.L., Grobbee D.E., van der Schouw Y.T. Postmenopausal status and early menopause as independent risk factors for cardiovascular disease: a meta-analysis. // *Menopause*. 2006. V. 13. N. 2. P. 265–279.

Bailey D.B. Jr., Raspa M., Olmsted M., Holiday D.B. Co-occurring conditions associated with *FMR1* gene variations: findings from a national parent survey. // *Am. J. Med. Genet. A*. 2008. V. 146A. P. 2060–2069.

Bakker C.E., de Diego Otero Y., Bontekoe C., Ragho P., Luteijn T., Hoogeveen A.T., Oostra B.A., Willemsen R. Immunocytochemical and biochemical characterization of FMRP, FXR1P, and FXR2P in the mouse. // *Exp. Cell Res.* 2000. V. 258. N. 1. P. 162–170.

Barlow J.H., Faryabi R.B., Callen E., Wong N., Malhowski A., Chen H.T., et al. Identification of early replicating fragile sites that contribute to genome instability. // *Cell*. 2013. V. 152. P. 620–632.

Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. // *Cell*. 2004. V. 116. P. 281–297.

Bednarek A.K., Laflin K.J., Daniel R.L., Liao Q., Hawkins K.A., Aldaz C.M. WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3–24.1, a region frequently affected in breast cancer. // *Cancer Res.* 2000. V. 60. N. 8. P. 2140–2145.

Bekdash R.A. Early life nutrition and mental health: The role of DNA methylation. // *Nutrients*. 2021. V. 13. P. 3111.

Besnard E., Babled A., Lapasset L., Milhavet O., Parrinello H., Dantec C., Marin J.M., Lemaitre J.M. Unraveling cell type-specific and reprogrammable human replication origin signatures associated with G-quadruplex consensus motifs. // *Nature structural & molecular biology*. 2012. V. 19. N. 8. P. 837–844.

Bettencourt C., Hensman-Moss D., Flower M., Wiethoff S., Brice A., Goizet C., Stevanin G., et al. DNA repair pathways underlie a common genetic mechanism modulating onset in polyglutamine diseases. // *Ann. Neurol*. 2016. V. 79. P. 983–990.

Biancalana V., Glaeser D., McQuaid S., Steinbach P. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of fragile X syndrome and other fragile X-associated disorders. // *Eur. J. Hum. Genet*. 2015. V. 23. N. 4. P. 417–425.

Bistulfi G., Vandette E., Matsui S.-I., Smiraglia D.J. Mild folate deficiency induces genetic and epigenetic instability and phenotype changes in prostate cancer cells. // *BMC Biol*. 2010. V. 8. P. 6.

Bjerregaard V.A., Garribba L., McMurray C.T., Hickson I.D., Liu Y. Folate deficiency drives mitotic missegregation of the human FRAXA locus. // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2018. V. 115. P. 13003–13008.

Blin M., Le Tallec B., Nahse V., Schmidt M., Brossas C., Millot G. A., Prioleau M. N., Debatisse M. Transcription-dependent regulation of replication dynamics modulates genome stability. // *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2019. V. 26. P. 58–66.

Blount B.C., Ames B.N. DNA damage in folate deficiency. // *Baillieres Clin. Haematol*. 1995. V. 8. P. 461–478.

Blount B.C., Mack M.M., Wehr C.M., MacGregor J.T., Hiatt R.A., Wang G., Wickramasinghe S.N., Everson R.B., Ames B.N. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: Implications for cancer and neuronal damage. // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1997. V. 94. P. 3290–3295.

Bohman R., Tamura C.T., Doolittle M.H., Cascarano J. Growth and aging in the rat:

changes in total protein, cellularity, and polyploidy in various organs. // J. Exp. Zool. 1985. V. 233. P. 385–396.

Bonarrigo F.A., Russo S., Vizziello P., Menni F., Cogliati F., Giorgini V., Monti F., Milani D. Think about it: *FMRI* gene mosaicism. // J. Child Neurol. 2014. V. 29. N. 9. P. NP74-NP77.

Bora E., Yücel M., Fornito A., Pantelis C., Harrison B.J., Cocchi L., Pell G., Lubman D. White matter microstructure in opiate addiction. // Addictio Biol. 2012. V. 17. P. 141–148.

Borowiec J.A., Schildkraut C.L. Open sesame: activating dormant replication origins in the mouse immunoglobulin heavy chain (*Igh*) locus. // Current opinion in cell biology. 2011. V. 23. P. 3. P. 284–292.

Bourgeois J.A., Coffey S.M., Rivera S.M., Hessel D., Gane L.W., Tassone F., et al. A review of fragile X premutation disorders: expanding the psychiatric perspective. // J. Clin. Psychiatry. 2009. V. 70. P. 852–862.

Bourgeois J.A., Seritan A.L., Casillas E.M., Hessel D., Schneider A., Yang Y., Kaur I., Cogswell J.B., Nguyen D.V., Hagerman R.J. Lifetime prevalence of mood and anxiety disorders in fragile X premutation carriers. // J. Clin. Psychiatry. 2011. V. 72. P. 175–182.

Braat S., D'Hulst C., Heulens I., De Rubeis S., Mientjes E., Nelson D.L., Willemsen R., Bagni C., Van Dam D., De Deyn P.P., Kooy R.F. The GABAA receptor is an FMRP target with therapeutic potential in fragile X syndrome. // Cell Cycle. 2015. V. 14. N. 18. P. 2985–2995.

Brendel C., Mielke B., Hillebrand M., Geartner J., Huppke P. Methotrexate treatment of FraX fibroblasts results in *FMRI* transcription but not in detectable FMR1 protein levels. // Journal of Neurodevelopmental Disorders. 2013. V. 5. N. 1. P. 23.

Brison O., El-Hilali S., Azar D., Koundrioukoff S., Schmidt M., Nahse V., et al. Transcription-mediated organization of the replication initiation program across large genes sets common fragile sites genome-wide. // Nat. Commun. 2019. V. 1. P. 5693.

Bryan D.S., Ransom M., Adane B., York K., Hesselberth J.R. High resolution mapping of modified DNA nucleobases using excision repair enzymes. // *Genome Res.* 2014. V. 24. P. 1534–1542.

Brylawski B.P., Chastain P.D. 2nd, Cohen S.M., Cordeiro-Stone M., Kaufman D.G. Mapping of an origin of DNA replication in the promoter of fragile X gene *FMR1*. // *Experimental and molecular pathology.* 2007. V. 82. N. 2. P. 190–196.

Budworth H., McMurray C.T. A brief history of triplet repeat diseases. In: *Trinucleotide repeat protocols.* P. 3–17. Springer protocols. Springer, NY.: Humana press. 2013.

Burrow A.A., Marullo A., Holder L.R., Wang Y.-H. Secondary structure formation and DNA instability at fragile site FRA16B. // *Nucleic Acids Res.* 2010. V. 38. N. 9. P. 2865–2877.

Buskila D., Sarzi-Puttini P. Fibromyalgia and autoimmune diseases: the pain behind autoimmunity. // *Isr. Med. Assoc. J.* 2008. V. 10. P. 77–78.

Cannavo E., Sanchez A., Anand R., Ranjha L., Hugener J., Adam C., Acharya A., Weyland N., Aran-Guiu X., Charbonnier J.B., et al. Regulation of the MLH1-MLH3 endonuclease in meiosis. // *Nature.* 2020. V. 586. P. 618–622.

Casella M., Lucarelli M., Simili M., Beffy P., Del Carratore R., Minichilli F., Chisari C., Simi S. Spontaneous chromosome loss and colcemid resistance in lymphocytes from patients with myotonic dystrophy type 1. // *Cytogenet. Genome Res.* 2003. V. 100. N. 1–4. P. 224–229.

Cayrou C., Coulombe P., Vigneron A., Stanojic S., Ganier O., Peiffer I., Rivals E., Puy A., Laurent-Chabalier S., Desprat R., Méchali M. Genome-scale analysis of metazoan replication origins reveals their organization in specific but flexible sites defined by conserved features. // *Genome research.* 2011. V. 21. N.9. P. 1438–1449.

Cecconi M., Forzano F., Rinaldi R., Cappellacci S., Grammatico P., Faravelli F., Dagna Bricarelli F., Di Maria E., Grasso M. A single nucleotide variant in the *FMR1* CGG repeat results in a "Pseudodeletion" and is not associated with the fragile X

syndrome phenotype. // *J. Mol. Diagn.* 2008. V. 10. P. 272–275.

Cha J., DeDora D., Nedic S., Ide J., Greenberg T., Hajcak G., Mujica-Parodi L.R.. Clinically anxious individuals show disrupted feedback between inferior frontal gyrus and prefrontal-limbic control circuit. // *J. Neurosci.* 2016. V. 36. P. 4708–4718.

Chan P.K., Torres R., Yandim C., Law P. P., Khadayate S., Mauri M., Grosan C., Chapman-Rothe N., Giunti P., Pook M., Festenstein, R. Heterochromatinization induced by GAA-repeat hyperexpansion in Friedreich's ataxia can be reduced upon HDAC inhibition by vitamin B3. // *Hum. Mol. Genet.* 2013. V. 22. N. 13. P. 2662–2675.

Chandler S.P., Kansagra P., Hirst M.C. Fragile X (CGG)_n repeats induce a transcriptional repression in cis upon a linked promoter: evidence for a chromatin mediated effect. // *BMC Mol. Biol.* 2003. V. 4. P. 3.

Chang D.K., Ricciardiello L., Goel A., Chang C.L., Boland C.R. Steady-state regulation of the human DNA mismatch repair system. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 18424–18431.

Chastain P.D. 2nd, Cohen S.M., Brylawski B.P., Cordeiro-Stone M., Kaufman D.G. A late origin of DNA replication in the trinucleotide repeat region of the human FMR2 gene. // *Cell cycle.* 2006. V. 5. N. 8. P. 869–872.

Chen H., Nomi J.S., Uddin L.Q., Duan, X., Chen H.. Intrinsic functional connectivity variance and state-specific under-connectivity in autism. // *Hum. Brain Mapp.* 2017. V. 38. P. 5740–5755.

Chen Y.-H., Keegan S., Kahli M., Tonzi P., Fenyö D., Huang T.T., Smith D.J. Transcription shapes DNA replication initiation and termination in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2019. V. 26. N. 1. P. 67–77.

Chiurazzi P., Pomponi M.G., Willemsen R., Oostra B. A., Neri G. In vitro reactivation of the *FMR1* gene involved in fragile X syndrome. // *Hum. Mol. Genet.* 1998. V. 7. N. 1. P. 109–113.

Chiurazzi P., Pomponi M.G., Pietrobono R., Bakker C.E., Neri G., Oostra B.A. Synergistic effect of histone hyperacetylation and DNA demethylation in the reactivation

of the *FMRI* gene. // *Hum. Mol. Genet.* 1999. V. 8. N. 12. P. 2317–2323.

Chonchaiya W., Nguyen D.V., Au J., Campos L., Berry-Kravis E.M., Lohse K., Mu Y., Utari A., Hervey C., Wang L., Sorensen P., Cook K., Gane L., Tassone F., Hagerman R.J. Clinical involvement in daughters of men with fragile X-associated tremor ataxia syndrome. // *Clin. Genet.* 2010. V. 78. P. 38–46.

Chong S.S., McCall A.E., Cota J., Subramony S.H., Orr H.T., Hughes M.R., Zoghbi H.Y. Gametic and somatic tissue-specific heterogeneity of the expanded SCA1 CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. // *Nat. Genet.* 1995. V. 10. N. 3. P. 344–350.

Christman J.K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: Mechanistic studies and their implications for cancer therapy. // *Oncogene.* 2002. V. 21. N. 35. P. 5483–5495.

Cilli P., Ventura I., Minoprio A., Meccia E., Martire A., Wilson S.H., Bignami M., Mazzei F. Oxidized dNTPs and the OGG1 and MUTYH DNA glycosylases combine to induce CAG/CTG repeat instability. // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. P. 5190–5203.

Ciosi M., Maxwell A., Cumming S.A., Hensman Moss D.J., Alshammari A.M., Flower M.D., Durr A., Leavitt B.R., Roos R.A.C., TRACK-HD team, Enroll-HD team, Holmans P., Jones L., Langbehn D.R., Kwak S., Tabrizi S.J., Monckton D.G. A genetic association study of glutamine-encoding DNA sequence structures, somatic CAG expansion, and DNA repair gene variants, with Huntington disease clinical outcomes. // *EBioMedicine.* 2019. V. 48. P. 568–580.

Clark R.M., De Biase I., Malykhina A.P., Al-Mahdawi S., Pook M., Bidichandani S.I. The GAA triplet-repeat is unstable in the context of the human FXN locus and displays age-dependent expansions in cerebellum and DRG in a transgenic mouse model. // *Hum. Genet.* 2007. V. 120. P. 633–640.

Clifford S., Dissanayake C., Bui Q.M., Huggins R., Taylor A.K., Loesch D.Z. Autism spectrum phenotype in males and females with fragile X full mutation and premutation. // *J. Autism Dev. Disord.* 2007. V. 37. P. 738–747.

Coffee B., Zhang F., Warren S.T., Reines D. Acetylated histones are associated with

FMRI in normal but not fragile X-syndrome cells. // Nat. Genet. 1999. V. 22. N. 1. P. 98–101.

Coffee B., Zhang F., Ceman S., Warren S.T., Reines, D. Histone modifications depict an aberrantly heterochromatinized *FMRI* gene in fragile x syndrome. // Am. J. Hum. Genet. 2002. V. 71. N. 4. P. 923–932.

Coffee B., Keith K., Albizua I., Malone T., Mowrey J., Sherman S.L., Warren S.T. Incidence of Fragile X Syndrome by newborn screening for methylated *FMRI* DNA. // Am. J. Hum. Genet. 2009. V. 85. N. 4. P. 503–514.

Coffey S., Cook K., Tartaglia N. Expanded clinical phenotype of women with the *FMRI* premutation. // Am. J. Med. Genet. A. 2008. V. 146A. P. 1009–1016.

Cogram P., Deacon R.M.J., Warner-Schmidt J.L., von Schimmelmann M.J., Abrahams B.S., During M.J. Gaboxadol normalizes behavioral abnormalities in a mouse model of Fragile X Syndrome. // Front. Behav. Neurosci. 2019. V. 13. P. 1–9.

Cohen S.M., Brylawski B.P., Cordeiro-Stone M., Kaufman D.G. Same origins of DNA replication function on the active and inactive human X chromosomes. // Journal of cellular biochemistry. 2003. V. 88. N. 5. P. 923–931.

Cohen S., Guenolé A., Marnef A., Clouaire T., Puget N., Rocher V., Arnould C., Aguirrebengoa M., Genais M., Vernekar D., Mourad R., Borde V., Legube G. BLM-dependent break-induced replication handles double-strand breaks in transcribed chromatin upon impaired RNA:DNA hybrids dissolution. // bioRxiv. 2020. 05.13.093112.

Colak D., Zaninovic N., Cohen M.S., Rosenwaks Z., Yang W.Y., Gerhardt J., Disney M.D., Jaffrey S.R. Promoter-bound trinucleotide repeat mRNA drives epigenetic silencing in fragile X syndrome. // Science. 2014. V. 343. P. 1002–1005.

Collins S.C., Bray S.M., Suhl J.A., Cutler D.J., Coffee B., Zwick M.E., Warren S.T. Identification of novel *FMRI* variants by massively parallel sequencing in developmentally delayed males. // Am. J. Med. Genet. A. 2010. V. 152A. N. 10. P. 2512–2520.

Cordeiro L., Abucayan F., Hagerman R., Tassone F., Hessler D. Anxiety disorders in fragile X premutation carriers: preliminary characterization of probands and non-probands. // *Intractable Rare Dis. Res.* 2015. V. 4. P. 123–130.

Crossley M.P., Bocek M., Cimprich K.A. R-loops as cellular regulators and genomic threats. // *Mol. Cell.* 2019. V. 73. N. 3. P. 398–411.

Cumming S.A., Hamilton M.J., Robb Y., Gregory H., McWilliam C., Cooper A., Adam B., et al. *De novo* repeat interruptions are associated with reduced somatic instability and mild or absent clinical features in myotonic dystrophy type 1. // *Eur. J. Hum. Genet.* 2018. V. 26. P. 1635–1647.

D’Anna J.A., Crissman H.A., Jackson P.J., Tobey R. Time-dependent changes in H1 content, H1 turnover, DNA elongation, and the survival of cells blocked in early S phase by hydroxyurea, aphidicolin, or 5-fluorodeoxyuridine. // *Biochemistry.* 1985. V. 24. P. 5020–5026.

Das S.K., Kunkel T.A., Loeb L.A. Effects of altered nucleotide concentrations on the fidelity of DNA replication. // *Basic Life Sci.* 1985. V. 31. P. 117–126.

Debacker K., Winnepenninckx B., Longman C., Colgan J., Tolmie J., Murray R., van Lwijk R., Scheers S., Fitzpatrick D., Kooy F. The molecular basis of the folate-sensitive fragile site FRA11A at 11q13. // *Cytogenetic and genome research.* 2007. V. 119. N. 1-2. P. 9–14.

Debatisse M., Rosselli F. A journey with common fragile sites: From S phase to telophase. // *Genes Chromosomes Cancer.* 2019. V. 58. P. 305–316.

De Biase I., Rasmussen A., Endres D., Al-Mahdawi S., Monticelli A., Cocozza S., Pook M., Bidichandani S.I. Progressive GAA expansions in dorsal root ganglia of Friedreich’s ataxia patients. // *Ann. Neurol.* 2007. V. 61. N. 1. P. 55–60.

De Graaff E., Rouillard P., Willems P.J., Smits A.P., Rousseau F., Oostra B.A. Hotspot for deletions in the CGG repeat region of *FMR1* in fragile X patients. // *Hum. Mol. Genet.* 1995. V. 4. P. 45–49.

De Graaff E., de Vries B.B., Willemsen R., van Hemel J.O., Mohkamsing S., Oostra

B.A., van den Ouweland A.M. The fragile X phenotype in a mosaic male with a deletion showing expression of the FMR1 protein in 28% of the cells. // *Am. J. Med. Genet.* 1996. V. 64. P. 302–308.

Deissler H., Behn-Krappa A., Doerfler W. Purification of nuclear proteins from human HeLa cells that bind specifically to the unstable tandem repeat (CGG)_n in the human *FMRI* gene. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. N. 8. P. 4327–4334.

Deissler H., Wilm M., Genç B., Schmitz B., Ternes T., Naumann F., Mann M., Doerfler W. Rapid protein sequencing by tandem mass spectrometry and cDNA cloning of P20-CGGBP a novel protein that binds to the unstable triplet repeat 5'-D (CGG) N-3' in the human *FMRI* gene. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 16761-16768.

Dekaban, A. Persisting clone of cells with an abnormal chromosome in a woman previously irradiated. // *J. Nucl. Med.* 1965. V. 6. N. 10. P. 740–746.

De Luca G., Russo M.T., Degan P., Tiveron C., Zijno A., Meccia E., et al. A role for oxidized DNA precursors in Huntington's disease-like striatal neurodegeneration. // *PLoS Genet.* 2008. V. 4. P. e1000266.

DeMarco B., Stefanovic S., Williams A., Moss K.R., Anderson B.R., Bassell G.J., Mihailescu M.R. FMRP – G-quadruplex mRNA – miR-125a interactions: implications for miR-125a mediated translation regulation of PSD-95 mRNA. // *PLoS ONE.* 2019. V. 14. P. 1–24.

Denison S.R., Callahan G., Becker N.A., Phillips L.A., Smith, D.I. Characterization of FRA6E and its potential role in autosomal recessive juvenile parkinsonism and ovarian cancer. // *Genes Chromosomes Cancer.* 2003. V. 38. P. 40–52.

D'Hulst C., Kooy R.F. Fragile X syndrome: From molecular genetics to therapy. // *J. Med. Genet.* 2009. V. 46. N. 9. P. 577–584.

Dobkin C., Radu G., Ding X.H., Brown W.T., Nolin S.L. Fragile X prenatal analyses show full mutation females at high risk for mosaic Turner syndrome: Fragile X leads to chromosome loss. // *Am. J. Med. Genet. Part A.* 2009. V. 149. N. 10. P. 2152–2157.

Dobson T., Kube E., Timmerman S., Krushel L.A.. Identifying intrinsic and extrinsic

determinants that regulate internal initiation of translation mediated by the *FMRI* 5' leader. // *BMC Mol. Biol.* 2008. V. 9. P. 89.

Dolskiy A.A., Yarushkin A.A., Grishchenko I.V., Lemskaya N.A., Pindyurin A.V., Boldyreva L.V., Pustyl'nyak V.O., Yudkin D.V. miRNA expression and interaction with the 3'UTR of *FMRI* in FRAXopathy pathogenesis. // *Non-coding RNA Research.* 2021. V. 6. N. 1. P. 1-7.

Durkin S.G., Glover T.W. Chromosome Fragile Sites. // *Annu. Rev. Genet.* 2007. V. 41. N. 1. P. 169–192.

Duthie S.J., McMillan P. Uracil misincorporation in human DNA detected using single cell gel electrophoresis. // *Carcinogenesis.* 1997. V. 18. P. 1709–1714.

Duthie S.J., Hawdon A. DNA instability (strand breakage, uracil misincorporation, and defective repair) is increased by folic acid depletion in human lymphocytes in vitro. // *FASEB journal.* 1998. V. 12. N. 14. P. 1491–1497.

Edbauer D., Neilson J.R., Foster K.A., Wang C.F., Seeburg D.P., Batterton M.N., Tada T., Dolan B.M., Sharp P.A., Sheng M. Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. // *Neuron.* 2010. V. 65. N. 3. P. 373–384.

Eichler E.E., Holden J.J., Popovich B.W., Reiss A.L., Snow K., Thibodeau S.N., Richards C.S., Ward P.A., Nelson D.L. Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the *FMRI* gene. // *Nat. Genet.* 1994. V. 8. N. 1. P. 88–94.

Entezam A., Biacsi R., Orrison B., Saha T., Hoffman G.E., Grabczyk E., Nussbaum R.L., Usdin K. Regional FMRP deficits and large repeat expansions into the full mutation range in a new fragile X premutation mouse model. // *Gene.* 2007. V. 395. P. 125–134.

Entezam A., Usdin K. ATR protects the genome against CGG*CCG-repeat expansion in fragile X premutation mice. // *Nucleic Acids Res.* 2008. V. 36. P. 1050–1056.

Entezam A., Usdin K. ATM and ATR protect the genome against two different types of tandem repeat instability in fragile X premutation mice. // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37. P. 6371–6377.

Entezam A., Lokanga A.R., Le W., Hoffman G., Usdin K. Potassium bromate, a potent DNA oxidizing agent, exacerbates germline repeat expansion in a fragile X premutation mouse model. // *Hum. Mutat.* 2010. V. 31. P. 611–616.

Erbs E., Fenger-Gron J., Jacobsen C.M., Lildballe D.L., Rasmussen M. Spontaneous rescue of a *FMRI* repeat expansion and review of deletions in the *FMRI* non-coding region. // *Eur. J. Med. Genet.* 2021. V. 64. P. 104244.

Fan H., Booker J.K., McCandless S.E., Shashi V., Fleming A., Farber R.A. Mosaicism for an *FMRI* gene deletion in a fragile X female. // *Am. J. Med. Genet.* 2005. V. 136. P. 214–217.

Farzin F., Perry H., Hessel D., Loesch D., Cohen J., Bacalman S., Gane L., Tassone F., Hagerman P., Hagerman R. Autism spectrum disorders and attention-deficit/hyperactivity disorder in boys with the fragile X premutation. // *Journal of developmental and behavioral pediatrics.* 2006. V. 27. N. 2 Suppl. P. S137–S144.

Fechter A., Buettel I., Kuehnel E., Savelyeva L., Schwab M. Common fragile site FRA11G and rare fragile site FRA11B at 11q23.3 encompass distinct genomic regions. // *Genes Chromosom. Cancer.* 2007. V. 46. P. 98–106.

Feng W., Chakraborty A. Fragility extraordinaire: Unsolved mysteries of chromosome fragile sites. // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2017. V. 1042. P. 489–526.

Ferreira S.I., Pires L.M., Ferrão J., Sá J., Serra A., Carreira I.M. Mosaicism for *FMRI* gene full mutation and intermediate allele in a female foetus: a postzygotic retraction event. // *Gene.* 2013. V. 527. N. 1. P. 421–425.

Filipovic-Sadic S., Sah S., Chen L., Krosting J., Sekinger E., Zhang W., Hagerman P.J., Stenzel T.T., Hadd A.G., Latham G.J., Tassone, F. A novel *FMRI* PCR method for the routine detection of low abundance expanded alleles and full mutations in fragile X syndrome. // *Clin. Chem.* 2010. V. 56. N. 3. P. 399–408.

Flower, M. Genetic Variation in DNA Repair Proteins Modifies the Course of Huntington's Disease. Doctoral thesis (Ph.D). UCL (University College London). 2019.

Focher F., Gassmann M., Hafkemeyer P., Ferrari E., Spadari S., Hübscher U. Calf thymus DNA polymerase delta independent of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). // *Nucleic acids research*. 1989. V. 17. N. 5. P. 1805–1821.

Foiry L., Dong L., Savouret C., Hubert L., te Riele H., Junien C., Gourdon G. Msh3 is a limiting factor in the formation of intergenerational CTG expansions in DM1 transgenic mice. // *Hum. Genet*. 2006. V. 119. P. 520–526.

Fojtik P., Vorlickova M. The fragile X chromosome (GCC) repeat folds into a DNA tetraplex at neutral pH. // *Nucleic Acids Res*. 2001. V. 29. P. 4684–4690.

Fortune M.T., Vassilopoulos C., Coolbaugh M.I., Siciliano M.J., Monckton D.G. Dramatic, expansion-biased, age-dependent, tissue-specific somatic mosaicism in a transgenic mouse model of triplet repeat instability. // *Hum. Mol. Genet*. 2000. V. 9. N. 3. P. 439–445.

Freese E. The specific mutagenic effect of base analogues on Phage T4. // *J. Mol. Biol*. 1959. V. 1. P. 87–105.

Freudenreich C.H. Chromosome fragility: Molecular mechanisms and cellular consequences. // *Front. Biosci*. 2007. V. 12. N. 13. P. 4911–4924.

Fry M., Loeb L.A. The fragile X syndrome d(CGG)(n) nucleotide repeats form a stable tetrahelical structure. // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1994. V. 91. N. 11. P. 4950–4954.

Fu Y.H., Kuhl D.P., Pizzuti A., Pieretti M., Sutcliffe J.S., Richards S., Verkerk A.J., Holden J.J., Fenwick R.G. Jr, Warren, S.T. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. // *Cell*. 1991. V. 67. N. 6. P. 1047–1058.

Gallagher J.C. Effect of early menopause on bone mineral density and fractures. // *Menopause*. 2007. V. 14. N. 3. P. 567–571

Gantois I., Bakker C.E., Reyniers E., Willemsen R., D'Hooge R., De Deyn P.P., Oostra B.A., Kooy R.F. Restoring the phenotype of fragile X syndrome: insight from the mouse model. // *Curr. Mol. Med*. 2001. V. 1. N. 4. P. 447–455.

Garber K., Smith K.T., Reines D., Warren S.T. Transcription, translation and fragile

X syndrome. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2006. V. 16. N. 3. P. 270–275.

Garber K.B., Visootsak J., Warren S.T. Fragile X syndrome. // *Eur. J. Hum. Genet.* 2008. V. 16. N. 6. P. 667–672.

Garribba L., Bjerregaard V.A., Goncalves Dinis M.M., Ozer O., Wu W., Sakellariou D., Pena-Diaz J., Hickson I.D., Liu Y. Folate stress induces SLX1- and RAD51-dependent mitotic DNA synthesis at the fragile X locus in human cells. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2020. V. 117. P. 16527–16536.

Gazy I., Hayward B., Potapova S., Zhao X., Usdin K. Double-strand break repair plays a role in repeat instability in a fragile X mouse model. // *DNA Repair.* 2019. V. 74. P. 63–69.

Gecz J., Gedeon A.K., Sutherland G.R., Mulley J.C. Identification of the gene *FMR2*, associated with FRAXE mental retardation. // *Nature genetics.* 1996. V. 13. N. 1. P. 105–108.

Genetic Modifiers of Huntington's Disease (GeM-HD) Consortium. CAG repeat not polyglutamine length determines timing of Huntington's Disease onset. // *Cell.* 2019. V. 178. N. 4. P. 887–900.

Genschel J., Littman S.J., Drummond J.T., Modrich P. Isolation of MutSbeta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutSbeta and MutSalpha. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 19895–19901.

Gerhardt J., Tomishima M.J., Zaninovic N., Colak D., Yan Z., Zhan Q., Rosenwaks Z., Jaffrey S.R., Schildkraut C.L. The DNA replication program is altered at the *FMR1* locus in fragile X embryonic stem cells. // *Mol. Cell.* 2014. V. 53. P. 19–31.

Gholizadeh S., Arsenault J., Xuan I.C., Pacey L.K., Hampson D.R. Reduced phenotypic severity following adeno-associated virus-mediated *Fmr1* gene delivery in fragile X mice. // *Neuropsychopharmacology.* 2014. V. 39. N. 13. P. 3100–3111.

Glaser D., Wohrle D., Salat U., Vogel W., Steinbach P. Mitotic behavior of expanded CGG repeats studied on cultured cells: Further evidence for methylation-mediated triplet repeat stability in fragile X syndrome. // *Am. J. Med. Genet.* 1999. V. 84. P. 226–228.

Glover T.W. FUdR induction of the X chromosome fragile site: evidence for the mechanism of folic acid and thymidine inhibition. // *Am. J. Hum. Genet.* 1981. V. 33. N. 2. P. 234.

Glover T.W., Wilson T.E., Arlt M.F. Fragile sites in cancer: more than meets the eye. // *Nat. Rev. Cancer.* 2017. V. 17. P. 489–501.

Godler D.E. Tassone F., Loesch D.Z., Taylor A.K., Gehling F., Hagerman R.J., Burgess T., Ganesamoorthy D., Hennerich D., Gordon L., Evans A., Choo K.H., Slater H.R. Methylation of novel markers of fragile X alleles is inversely correlated with FMRP expression and *FMR1* activation ratio. // *Hum. Mol. Genet.* 2010. V. 19. N. 8. P. 1618–32.

Gold B., Radu D., Balanko A., Chiang C.S. Diagnosis of Fragile X syndrome by Southern blot hybridization using a chemiluminescent probe: a laboratory protocol. // *Mol. Diagn.* 2000. V. 5. P. 169–178.

Goldmann J.M., Veltman J.A., Gilissen C. *De novo* mutations reflect development and aging of the human germline. // *Trends Genet.* 2019. V. 35. P. 828–839.

Gomes-Pereira M., Fortune M.T., Monckton D.G. Mouse tissue culture models of unstable triplet repeats: *in vitro* selection for larger alleles, mutational expansion bias and tissue specificity, but no association with cell division rates. // *Hum. Mol. Genet.* 2001. V. 10. P. 845–854.

Gómez M., Brockdorff N. Heterochromatin on the inactive X chromosome delays replication timing without affecting origin usage. // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2004. V. 101. N. 18. P. 6923–6928.

Goncalves T.F., dos Santos J.M., Goncalves A.P., Tassone F., Mendoza-Morales G., Ribeiro M.G., Kahn E., Boy R., Pimentel M.M., Santos-Reboucas C.B. Finding *FMR1* mosaicism in Fragile X syndrome. // *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2016. V. 16. P. 501–507.

Gong X., Zhang K., Wang Y., Wang J., Cui Y., Li S., Luo Y. MicroRNA-130b targets *Fmr1* and regulates embryonic neural progenitor cell proliferation and differentiation. // *Biochemical and biophysical research communications.* 2013. V. 439. N. 4. P. 493–500.

Gotts S.J., Ramot M., Jasmin K., Martin A., Altered resting-state dynamics in autism spectrum disorder: Causal to the social impairment? // *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*. 2019. V. 90. P. 28–36.

Goula A.V., Berquist B.R., Wilson D.M. 3rd, Wheeler V.C., Trottier Y., Merienne K. Stoichiometry of base excision repair proteins correlates with increased somatic CAG instability in striatum over cerebellum in Huntington's disease transgenic mice. // *PLoS Genet*. 2009. V. 5. P. e1000749.

Goulian M., Bleile B., Tseng, B.Y. Methotrexate-induced misincorporation of uracil into DNA. // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1980. V. 77. P. 1956–1960.

Grasso M., Faravelli F., Lo Nigro C., Chiurazzi P., Sperandeo M.P., Argusti A., Pomponi M.G., Lecora M., Sebastio G.F., Perroni L., Andria G., Neri G., Bricarelli F.D. Mosaicism for the full mutation and a microdeletion involving the CGG repeat and flanking sequences in the *FMRI* gene in eight fragile X patients. // *Am. J. Med. Genet*. 1999. V. 85. P. 311–316.

Gray S.J., Gerhardt J., Doerfler W., Small L.E., Fanning E. An origin of DNA replication in the promoter region of the human Fragile X Mental Retardation (*FMRI*) gene. // *Mol. Cell. Biol*. 2007. V. 27. N. 2. P. 426–437.

Grewal S.I., Moazed D. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science*. 2003. V. 301. N. 5634. P. 798–802.

Griffith J.P., Zarrouf F.A. A systematic review of chronic fatigue syndrome: don't assume it's depression. // *Prim. Care Companion J. Clin. Psychiatry*. 2008. V. 10. P. 120–128.

Grishchenko I., Purvinsh Y.V., Yudkin D.V. Mystery of expansion: DNA metabolism and unstable repeats. // *Adv. Exp. Med. Biol*. 2020. V. 1241. P. 101-124.

Groh M., Lufino M.M., Wade-Martins R., Gromak N. R-loops associated with triplet repeat expansions promote gene silencing in Friedreich ataxia and fragile X syndrome. // *PLoS Genet*. 2014. V. 10. P. e1004318.

Gros J., Kumar C., Lynch G., Yadav T., Whitehouse I., Remus D. Post-licensing

specification of eukaryotic replication origins by facilitated Mcm2-7 sliding along DNA. // *Mol. Cell.* 2015. V. 60. N. 5. P. 797–807.

Gronskov K., Hjalgrim H., Bjerager M.O., Brondum-Nielsen K. Deletion of all CGG repeats plus flanking sequences in *FMR1* does not abolish gene expression. // *American journal of human genetics.* 1997. V. 61. N. 4. P. 961–967.

Gu Y., Shen Y., Gibbs R.A., Nelson D.L. Identification of *FMR2*, a novel gene associated with the FRAXE CCG repeat and CpG island. // *Nature genetics.* 1996. V. 13. N. 1. P. 109–113.

Haenfler J.M., Skariah G., Rodriguez C.M., Monteiro da Rocha A., Parent J.M., Smith G.D., Todd P.K. Targeted reactivation of *FMR1* transcription in Fragile X syndrome embryonic stem cells. // *Front. Mol. Neurosci.* 2018. V. 11. P. 1–17.

Hagerman R.J., Leavitt B.R., Farzin F., Jacquemont S., Greco C.M., Brunberg J.A., Tassone F., Hessel D., Harris S.W., Zhang L., Jardini T., Gane L.W., Ferranti J., Ruiz L., Leehey M.A., Grigsby J., Hagerman P.J. Fragile-X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) in females with the *FMR1* premutation. // *Am. J. Hum. Genet.* 2004. V. 74. N. 5. P. 1051–1056.

Hagerman R.J., Berry-Kravis E., Hazlett H.C., Bailey D.B. Jr, Moine H., Kooy R.F., Tassone F., Gantois I., Sonenberg N., Mandel J.L., Hagerman P.J. Fragile X syndrome. // *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2017. V. 3. P. 17065.

Hagerman R.J., Protic D., Rajaratnam A., Salcedo-Arellano M.J., Aydin E.Y., Schneider A. Fragile X-associated neuropsychiatric disorders (FXAND). // *Front. Psychiatry.* 2018. V. 9. P. 564.

Hamlin A., Liu Y., Nguyen D.V., Tassone F., Zhang L., Hagerman R.J. Sleep apnea in fragile X premutation carriers with and without FXTAS. // *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2011. V. 156B. p. 923–928.

Han X.D., Powell B.R., Phalin J.L., Chehab F.F. Mosaicism for a full mutation, premutation, and deletion of the CGG repeats results in 22% FMRP and elevated *FMR1* mRNA levels in a high-functioning fragile X male. // *Am. J. Med. Genet. A.* 2006. V.

140. P. 1463–1471.

Hansen, R. S., Canfield, T. K., Lamb, M. M., Gartler, S. M., and Laird, C. D. (1993). Association of fragile X syndrome with delayed replication of the *FMR1* gene. *Cell* 73, 1403–1409.

Hansen R.S., Thomas S., Sandstrom R., Canfield T.K., Thurman R.E., Weaver M., Dorschner M.O., Gartler S.M., Stamatoyannopoulos J.A. Sequencing newly replicated DNA reveals widespread plasticity in human replication timing. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010. V. 107. P. 139–144.

Hardin C.C., Corregan M., Brown B.A. 2nd, Frederick L.N. Cytosine–cytosine+ base pairing stabilizes DNA quadruplexes and cytosine methylation greatly enhances the effect. // *Biochemistry.* 1993. V. 32. P. 5870–5880.

Hayward B.E. Zhou Y., Kumari D., Usdin K. A set of assays for the comprehensive analysis of *FMR1* alleles in the Fragile X–related disorders. // *J. Mol. Diagnostics.* 2016. V. 18. N. 5. P. 762–774.

Hayward B.E., Usdin K. Improved assays for AGG interruptions in Fragile X premutation carriers. // *The Journal of molecular diagnostics.* 2017. V. 19. N. 6. P. 828–835.

Hayward B., Loutaev I., Ding X., Nolin S.L., Thurm A., Usdin K., Smith C.B. Fragile X syndrome in a male with methylated premutation alleles and no detectable methylated full mutation alleles. // *Am. J. Med. Genet. A.* 2019. V. 179. P. 2132–2137.

Hayward B.E., Steinbach P.J., Usdin K. A point mutation in the nuclease domain of MLH3 eliminates repeat expansions in a mouse stem cell model of the Fragile X-related disorders. // *Nucleic Acids Res.* 2020. V. 48. P. 7856–7863.

Hayward B.E., Usdin K. Mechanisms of genome instability in the Fragile X-related disorders. // *Genes.* 2021. V. 12. P. 1633.

Hecht F., Bixenman H.A. Location of FRAXD in Xq27.2. Fragile sites on the X chromosome. // *Cancer Genet. Cytogenet.* 1990. V. 49. P. 137–138.

Hedglin M., Zhang Y., O’Brien P.J. Probing the DNA structural requirements for

facilitated diffusion. // *Biochemistry*. 2015. V. 54. P. 557–566.

Hellman A., Rahat A., Scherer S.W., Darvasi A., Tsui L.-C., Kerem B. Replication delay along FRA7H, a common fragile site on human chromosome 7, leads to chromosomal instability. // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 20. N. 12. P. 4420–4427.

Helmrich A., Ballarino M., Tora L. Collisions between replication and transcription complexes cause common fragile site instability at the longest human genes. // *Mol. Cell.* 2011. V. 44. P. 966–977.

Hessl D., Rivera S., Koldewyn K., Cordeiro L., Adams J., Tassone F., Hagerman P.J., Hagerman R.J. Amygdala dysfunction in men with the fragile X premutation. // *Brain*. 2007. V. 130. P. 404–416.

Hewett D.R., Handt O., Hobson L., Mangelsdorf M., Eyre H.J., Baker E., Sutherland G.R., Schuffenhauer S., Mao J.I., Richards R.I. FRA10B structure reveals common elements in repeat expansion and chromosomal fragile site genesis. // *Mol. Cell.* 1998. V. 1. N. 6. P. 773–781.

Hirst M., Grewal P., Flannery A., Slatter R., Maher E., Barton D., Fryns J.P., Davies K. Two new cases of *FMRI* deletion associated with mental impairment. // *Am. J. Hum. Genet.* 1995. V. 56. P. 67–74.

Hoem G., Raske C.R., Garcia-Arocena D., Tassone F., Sanchez E., Ludwig A.L., Iwahashi C.K., Kumar M., Yang J.E., Hagerman P.J. CGG-repeat length threshold for *FMRI* RNA pathogenesis in a cellular model for FXTAS. // *Hum. Mol. Genet.* 2011. V. 20. N. 11. P. 2161–2170.

Hoffman G.E., Le W., Entezam A., Otsuka N., Tong Z.-B., Nelson L., Flaws J.A., McDonald J.H., Jafar S., Usdin K. Ovarian abnormalities in a mouse model of Fragile X-associated primary ovarian insufficiency. // *J. Histochem. Cytochem.* 2012. V. 60. P. 439–456.

Hohenfeld C., Werner C.J., Reetz K. Resting-state connectivity in neurodegenerative disorders: Is there potential for an imaging biomarker? // *NeuroImage Clin.* 2018. V. 18. P. 849–870.

Holoch D., Moazed D. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. // Nat. Rev. Genet. 2015. V. 16. P. 71–84.

Houdayer C., Lemonnier A., Gerard M., Chauve C., Tredano M., de Villemeur T.B., Aymard P., Bonnefont J.P., Feldmann D. Improved fluorescent PCR-based assay for sizing CGG repeats at the FRAXA locus. // Clin. Chem. Lab. Med. 1999. V. 37. N. 4. P. 397–401.

Howes O.D., Rogdaki M., Findon J.L., Wichers R.H., Charman T., King B.H., Loth E., McAlonan G.M., McCracken J.T., Parr J.R., Povey C., Santosh P., Wallace S., Simonoff E., Murphy D.G. Autism Spectrum Disorder: consensus guidelines on assessment, treatment and research from the British Association for Psychopharmacology. // J. Psychopharmacol. 2018. V. 32. N. 1. P. 3–29.

Hoy S.M. Onasemnogene Apeparvovec: first global approval. // Drugs. 2019. V. 79. N. 11. P. 1255–1262.

Huber K.M., Gallagher S.M., Warren S.T., Bear M.F. Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2002. V. 99. N. 11. P. 7746–7750.

Hubert L. Jr, Lin Y., Dion V., Wilson J.H. Xpa deficiency reduces CAG trinucleotide repeat instability in neuronal tissues in a mouse model of SCA1. // Hum. Mol. Genet. 2011. V. 20. N. 24. P. 4822–4830.

Hudson D., Kovalchuk I., Koturbash I., Kolb B., Martin O.A., Kovalchuk O. Induction and persistence of radiation-induced DNA damage is more pronounced in young animals than in old animals. // Aging. 2011. V. 3. 609–620.

Hwang Y.H., Hayward B.E., Zafarullah M., Kumar J., Durbin Johnson B., Holmans P., Usdin K., Tassone F. Both cis and trans-acting genetic factors drive somatic instability in female carriers of the *FMRI* premutation. // Scientific reports. 2022. V. 12. N. 1. P. 10419.

Ingolia N.T., Lareau L.F., Weissman J.S. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. // Cell. 2011.

V. 147. P. 789–802.

Ingolia N.T., Brar G.A., Rouskin S., McGeachy A.M. Weissman J.S. The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. // *Nat. Protoc.* 2012. V. 7. P. 1534–1550.

Irony-Tur Sinai M., Salamon A., Stanleigh N., Goldberg T., Weiss A., Wang Y.H., Kerem B. AT-dinucleotide rich sequences drive fragile site formation. // *Nucleic Acids Res.* 2019. V. 47. P. 9685–9695.

Jacky P. B., Ahuja Y.R., Anyane-Yeboah K., Breg W.R., Carpenter N.J., Froster-Iskenius U.G., Fryns J.P., Glover T.W., Gustavson K.H., Hoegerman S.F. Guidelines for the preparation and analysis of the fragile X chromosome in lymphocytes. // *Am. J. Med. Genet.* 1991. V. 38. P. 400–403.

Jacob R.A., Gretz D.M., Taylor P.C., James S.J., Pogribny I.P., Miller B.J., Henning S.M., Swendseid M.E. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. // *J. Nutr.* 1998. V. 128. P. 1204–1212.

Jalal S.M., Lindor N.M., Michels V.V., Buckley D.D., Hoppe D.A., Sarkar G., Dewald G.W. Absence of chromosome fragility at 19q13.3 in patients with myotonic dystrophy. // *Am. J. Med. Genet.* 1993. V. 46. N. 4. P. 441–443.

Jalnapurkar I., Rafika N., Tassone F., Hagerman R. Immune mediated disorders in women with a fragile X expansion and FXTAS. // *Am. J. Med. Genet. A.* 2015. V. 167A. P. 190–197.

Jenkins E.C., Duncan C.J., Sanz M.M., Genovese M., Gu H., Schwartz-Richstein, C., Lele K.P., Salandi M.L., Krawczun M.S. Progress toward an internal control system for fragile-X induction by 5-fluorodeoxyuridine in whole-blood cultures. // *Pathobiology.* 1990. V. 58. P. 236–240.

Jensen M.A., Fukushima M., Davis R.W. DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis. // *PLoS One.* 2010. V. 5. N. 6. P. e11024.

Ji F., Liao H., Pan S., Ouyang L., Jia F., Fu Z., et al. Genome-wide high-resolution mapping of mitotic DNA synthesis sites and common fragile sites by direct sequencing. // *Cell. Res.* 2020. V. 30. P. 1009–1023.

Jin P., Zarnescu D.C., Zhang F., Pearson C.E., Lucchesi J.C., Moses K., Warren S.T. RNA-mediated neurodegeneration caused by the fragile X premutation rCGG repeats in *Drosophila*. // *Neuron*. 2003. V. 39. P. 739–747.

Jin P., Alisch R.S., Warren S.T. RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. // *Nat. Cell Biol.* 2004. V. 6. N. 11. P. 1048–1053.

Jiraanont P., Kumar M., Tang H.T., Espinal G., Hagerman P.J., Hagerman R.J., Chutabhakdikul N., Tassone F. Size and methylation mosaicism in males with Fragile X syndrome. // *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2017. V. 17. N. 11. P. 1023–1032.

Jones C., Penny L., Mattina T., Yu S., Baker E., Voullaire L., Langdon W.Y., Sutherland G.R., Richards R.I., Tunnacliffe A. Association of a chromosome deletion syndrome with a fragile site within the proto-oncogene *CBL2*. // *Nature*. 1995. V. 376. N. 6536. P. 145–149.

Kadyrova L.Y., Gujar V., Burdett V., Modrich P.L., Kadyrov F.A. Human MutLgamma, the MLH1-MLH3 heterodimer, is an endonuclease that promotes DNA expansion. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2020. V. 117. P. 3535–3542.

Kahkonen M., Tengström C., Alitalo T., Matilainen R., Kaski M., Airaksinen E. Population cytogenetics of folate-sensitive fragile sites. II. Autosomal rare fragile sites. // *Hum. Genet.* 1989. V. 82. P. 3–8.

Kalantaridou S.N., Naka K.K., Papanikolaou E., Kazakos N., Kravariti M., Calis K.A., Paraskevaïdis E.A., Sideris D.A., Tsatsoulis A., Chrousos G.P., Michalis L.K. Impaired endothelial function in young women with premature ovarian failure: normalization with hormone therapy. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004. V. 89. N. 8. P. 3907–3913.

Kaushal S., Freudenreich C.H. The role of fork stalling and DNA structures in causing chromosome fragility. // *Genes Chromosom. Cancer.* 2019. V. 58. N. 5. P. 270–283.

Kearse M.G., Green K.M., Krans A., Rodriguez C.M., Linsalata A.E., Goldstrohm A.C., Todd P.K. CGG repeat-associated non-AUG translation utilizes a cap-dependent scanning mechanism of initiation to produce toxic proteins. // *Mol. Cell.* 2016. V. 62. P. 314–322.

Kenna H.A., Tartter M., Hall S.S., Lightbody A.A., Nguyen Q., de los Angeles C.P., Reiss A.L., Rasgon N.L. High rates of comorbid depressive and anxiety disorders among women with premutation of the *FMRI* gene. // *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 2013. V. 162B. P. 872–878.

Kennedy L., Shelbourne P.F. Dramatic mutation instability in HD mouse striatum: Does polyglutamine load contribute to cell-specific vulnerability in Huntington's disease? // *Hum. Mol. Genet.* 2000. V. 9. P. 2539–2544.

Khaniani M.S., Kalitsis P., Burgess T., Slater H.R. An improved diagnostic PCR assay for identification of cryptic heterozygosity for CGG triplet repeat alleles in the Fragile X gene (*FMRI*). // *Mol. Cytogenet.* 2008. V. 1. N. 1. P. 5.

Kim K.-H., Hong E.P., Shin J.W., Chao M.J., Loupe J., Gillis T., Mysore J.S., Holmans P., Jones L., Orth M., Monckton D.G., Long J.D., Kwak S., Lee R., Gusella J.F., MacDonald M.E., Lee J.M. Genetic and functional analyses point to FAN1 as the source of multiple Huntington disease modifier effects. // *Am. J. Hum. Genet.* 2020. V. 107. P. 96–110.

Kononenko A.V., Ebersole T., Vasquez K.M., Mirkin S.M. Mechanisms of genetic instability caused by (CGG)_n repeats in an experimental mammalian system. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2018. V. 25. P. 669–676.

Kovtun I.V., Liu Y., Bjoras M., Klungland A., Wilson S.H., McMurray C.T. OGG1 initiates age-dependent CAG trinucleotide expansion in somatic cells. // *Nature.* 2007. V. 447. P. 447–452.

Kozak M. Influence of mRNA secondary structure on binding and migration of 40S ribosomal subunits. // *Cell.* 1980. V. 19. N. 1. P. 79–90.

Kozak M. Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic

ribosomes. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1986. V. 83. N. 9. P. 2850–2854.

Kozak M. Leader length and secondary structure modulate mRNA function under conditions of stress. // Mol. Cell Biol. 1988. V. 8. N. 7. P. 2737–2744.

Kozak M. Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1990. V. 87. N. 21. P. 8301–8305.

Kozak M. Features in the 5' non-coding sequences of rabbit alpha and beta-globin mRNAs that affect translational efficiency. // J. Mol. Biol. 1994. V. 235. N. 1. P. 95–110.

Kratz K., Artola-Borán M., Kobayashi-Era S., Koh G., Oliveira G., Kobayashi S., Oliveira A., Zou X., Richter J., Tsuda M., Sasanuma H., Takeda S., Loizou J.I., Sartori A.A., Nik-Zainal S., Jiricny J. FANCD2-associated nuclease 1 partially compensates for the lack of exonuclease 1 in mismatch repair. // Molecular and cellular biology. 2021. V. 41. N. 9. P. e0030321.

Ku S., Soragni E., Campau E., Thomas E.A., Altun G., Laurent L.C., Loring J.F., Napierala M., Gottesfeld J.M. Friedreich's ataxia induced pluripotent stem cells model intergenerational GAATTC triplet repeat instability. // Cell Stem Cell. 2010. V. 7. P. 631–637.

Kumari D., Somma V., Nakamura A.J., Bonner W.M., D'Ambrosio E., Usdin K. The role of DNA damage response pathways in chromosome fragility in Fragile X syndrome. // Nucleic acids research. 2009. V. 37. N. 13. P. 4385–4392.

Kumari D., Usdin K. The distribution of repressive histone modifications on silenced *FMRI* alleles provides clues to the mechanism of gene silencing in fragile X syndrome. // Hum. Mol. Genet. 2010. V. 19. N. 23. P. 4634–4642.

Kumari D., Lokanga R., Yudkin D., Zhao X.N., Usdin K. Chromatin changes in the development and pathology of the Fragile X-associated disorders and Friedreich ataxia. // Biochimica et Biophysica Acta. 2012. V. 1819. P. 802–810.

Kumari D., Usdin K. Sustained expression of *FMRI* mRNA from reactivated fragile X syndrome alleles after treatment with small molecules that prevent trimethylation of H3K27. // Hum. Mol. Genet. 2016. V. 25. P. 3689–3698.

Kunkel T.A., Silber J.R., Loeb L.A. The mutagenic effect of deoxynucleotide substrate imbalances during DNA synthesis with mammalian DNA polymerases. // *Mutat. Res.* 1982. V. 94. P. 413–419.

Kunz B.A. Genetic effects of deoxyribonucleotide pool imbalances. // *Environ. Mutagen.* 1982. V. 4. P. 695–725.

Kunz B.A. Mutagenesis and deoxyribonucleotide pool imbalance. // *Mutat. Res.* 1988. V. 200. P. 133–147.

Kunz B.A., Kohalmi S.E. Modulation of mutagenesis by deoxyribonucleotide levels. // *Annu. Rev. Genet.* 1991. V. 25. P. 339–359.

Latham G.J., Coppinger J., Hadd A.G., Nolin S.L. The role of AGG interruptions in fragile X repeat expansions: A twenty-year perspective. // *Front. Genet.* 2014. V. 5. P. 244.

Lavedan C., Grabczyk E., Usdin K., Nussbaum R.L. Long uninterrupted CGG repeats within the first exon of the human *FMRI* gene are not intrinsically unstable in transgenic mice. // *Genomics.* 1998. V. 50. P. 229–240.

Le Beau M.M., Rassool F.V., Neilly M.E., Espinosa R. 3rd, Glover T.W., Smith D.I., McKeithan T.W. Replication of a common fragile site, FRA3B, occurs late in S phase and is delayed further upon induction: implications for the mechanism of fragile site induction. // *Human molecular genetics.* 1998. V. 7. N. 4. 755–761.

Lee J.M., Zhang J., Su A.I., Walker J.R., Wiltshire T., Kang K., Dragileva E., Gillis T., Lopez E.T., Boily M.J., Cyr M., Kohane I., Gusella J.F., MacDonald M.E., Wheeler V.C. A novel approach to investigate tissue-specific trinucleotide repeat instability. // *BMC systems biology.* 2010. V. 4. P. 29.

Lee B., Lee K., Panda S., Gonzales-Rojas R., Chong A., Bugay V., Park H.M., Brenner R., Murthy N., Lee H.Y. Nanoparticle delivery of CRISPR into the brain rescues a mouse model of fragile X syndrome from exaggerated repetitive behaviours. // *Nature biomedical engineering.* 2018. V. 2. N. 7. P. 497–507.

Leehey M.A., Legg W., Tassone F., Hagerman R. Fibromyalgia in fragile X mental

retardation 1 gene premutation carriers. // *Rheumatology*. 2011. V. 50. P. 2233–2236.

Lemskaya N.A. A modified protocol for highly efficient EBV-mediated immortalization of human B lymphocytes from small volumes of peripheral blood serum. // *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2018. V. 19. N. 3. P. 221-223.

Le Tallec B., Dutrillaux B., Lachages A.-M., Millot G.A., Brison O., Debatisse M. Molecular profiling of common fragile sites in human fibroblasts. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011. V. 18. N. 12. P. 1421–1423.

Le Tallec B., Millot G.A., Blin M.E., Brison O., Dutrillaux B., Debatisse M. Common fragile site profiling in epithelial and erythroid cells reveals that most recurrent cancer deletions lie in fragile sites hosting large genes. // *Cell Rep.* 2013. V. 4. P. 420–428.

Letessier A., Millot G.A., Koundrioukoff S., Lachagès A.M., Vogt N., Hansen R.S., Malfoy B., Brison O., Debatisse M. Cell-type-specific replication initiation programs set fragility of the FRA3B fragile site. // *Nature*. 2011. V. 470. P. 120–123.

Lia A.S., Seznec H., Hofmann-Radvanyi H., Radvanyi F., Duros C., Saquet C., Blanche M., Junien C., Gourdon G. Somatic instability of the CTG repeat in mice transgenic for the myotonic dystrophy region is age dependent but not correlated to the relative intertissue transcription levels and proliferative capacities. *Hum. Mol. Genet.* 1998. V. 7. P. 1285–1291.

Lim J.H., Booker A.B., Luo T., Williams T., Furuta Y., Lagutin O., Oliver G., Sargent T.D., Fallon J R. AP-2alpha selectively regulates fragile X mental retardation-1 gene transcription during embryonic development. // *Hum. Mol. Genet.* 2005. V. 14. N. 14. P. 2027–2034.

Lin Y., Wilson J.H. Transcription-induced CAG repeat contraction in human cells is mediated in part by transcription-coupled nucleotide excision repair. // *Mol. Cell Biol.* 2007. V. 27. P. 6209–6217.

Lin Y., Hubert Jr.L., Wilson J.H. Transcription destabilizes triplet repeats. // *Mol. Carcinog.* 2009. V. 48. P. 350–361.

Lin Y., Leng M., Wan M., Wilson J.H. Convergent transcription through a long CAG

tract destabilizes repeats and induces apoptosis. // *Mol. Cell Biol.* 2010. V. 30. P. 4435–4451.

Lin W.C., Chou K.H., Chen C.C., Huang C.C., Chen H.L., Lu C.H., Li S.H., Wang Y.L., Cheng Y.F., Lin C.P. White matter abnormalities correlating with memory and depression in heroin users under methadone maintenance treatment. // *PLoS ONE.* 2012. V. 7. P. e33809.

Lin J., Hou J.Q., Xiang H.D., Yan Y.Y., Gu Y.C., Tan J.H., Li D., Gu L.Q., Ou T.M., Huang Z.S. Stabilization of G-quadruplex DNA by C-5-methyl-cytosine in *bcl-2* promoter: implications for epigenetic regulation. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. V. 433. P. 368–373.

Lin S. MicroRNAs and Fragile X Syndrome. In: Santulli G, editor. *MicroRNA: Medical Evidence. From Molecular Biology to Clinical Practice.* 1st ed. P. 107-121. Switzerland: Springer International Publishing. 2015.

Lindahl T., Wood R.D. Quality control by DNA repair. // *Science.* 1999. V. 286. P. 1897–1905.

Lipkin S.M., Moens P.B., Wang V., Lenzi M., Shanmugarajah D., Gilgeous A., Thomas J., Cheng J., Touchman J.W., Green E.D., Schwartzberg P., Collins F.S., Cohen P.E. Meiotic arrest and aneuploidy in *MLH3*-deficient mice. // *Nat. Genet.* 2002. V. 31. P. 385–390.

Liu T., Wan R.P., Tang L.J., Liu S.J., Li H.J., Zhao Q.H., Liao W.P., Sun X.F., Yi Y.H., Long Y.S. A microRNA profile in *Fmr1* knockout mice reveals microRNA expression alterations with possible roles in fragile X syndrome. // *Mol. Neurobiol.* 2015. V. 51. P. 1053–1063.

Liu X.S., Wu H., Krzisch M., Wu X., Graef J., Muffat J., Hnisz D., Li C.H., Yuan B., Xu C., Li Y., Vershkov D., Cacace A., Young R.A., Jaenisch R. Rescue of fragile X syndrome neurons by DNA methylation editing of the *FMRI* gene. // *Cell.* 2018. V. 172. N. 5. P. 979- 992.

Liu Y., Ai C., Gan T., Wu J., Jiang Y., Liu X., Lu R., Gao N., Li Q., Ji X., Hu J.

Transcription shapes DNA replication initiation to preserve genome integrity. *Genome Biol.* 2021. V. 22. N. 1. P. 176.

Loesch D.Z., Sherwell S., Kinsella G., Tassone F., Taylor A., Amor D., Sung S., Evans A. Fragile X-associated tremor/ataxia phenotype in a male carrier of unmethylated full mutation in the *FMR1* gene. // *Clin. Genet.* 2012. V. 82. P. 88–92.

Lokanga R.A., Entezam A., Kumari D., Yudkin D., Qin M., Smith C. B., Usdin K. Somatic expansion in mouse and human carriers of fragile X premutation alleles. // *Hum. Mutat.* 2013. V. 34. N. 1. P. 157–166.

Lokanga A.R., Zhao X.N., Entezam A., Usdin K. X inactivation plays a major role in the gender bias in somatic expansion in a mouse model of the fragile X-related disorders: Implications for the mechanism of repeat expansion. // *Hum. Mol. Genet.* 2014a. V. 23. P. 4985–4994.

Lokanga R.A., Zhao X.N., Usdin K. The mismatch repair protein MSH2 is rate limiting for repeat expansion in a fragile X premutation mouse model. // *Hum. Mutat.* 2014b. V. 35. P. 129–136.

Loomis E.W., Sanz L.A., Chedin F., Hagerman P.J. Transcription-associated R-loop formation across the human *FMR1* CGG repeat region. // *PLoS Genet.* 2014. V. 10. P. e1004294.

Lozano R., Azarang A., Wilaisakditipakorn T., Hagerman R.J. Fragile X syndrome: a review of clinical management. // *Intractable Rare Dis. Res.* 2016. V. 5. P. 145–157.

Lukusa T., Fryns J.P. Human chromosome fragility. // *Biochim. Biophys. Acta – Gene Regul. Mech.* 2008. V. 1779. N. 1. P. 3–16.

Luo S., Huang W., Chen C., Pan Q., Duan R., Wu L. An novel deletion to normal size in the sperm of a fragile X full mutation male. // *Clin. Genet.* 2014. V. 86. P. 295–297.

Lyoo I.K., Streeter C.C., Ahn K.H., Lee H.K., Pollack M.H., Silveri M.M., Nassar L., Levin J.M., Sarid-Segal O., Ciraulo D.A., Renshaw P.F., Kaufman M.J. White matter hyperintensities in subjects with cocaine and opiate dependence and healthy comparison subjects. // *Psychiatry Res.* 2004. V. 131. P. 135–145.

Lyu X., Chastain M., Chai W. Genome-wide mapping and profiling of γ H2AX binding hotspots in response to different replication stress inducers. // *BMC Genomics*. 2019. V. 20. N. 1. P. 579.

Maccaroni K., Balzano E., Mirimao F., Giunta S., Pelliccia F. (). Impaired replication timing promotes tissue-specific expression of common fragile sites. // *Genes*. 2020. V. 11. N. 3. P. 326.

Macheret M., Halazonetis T.D. Intragenic origins due to short G1 phases underlie oncogene-induced DNA replication stress. // *Nature*. 2018. V. 555. N. 7694. P. 112–116.

Macheret M., Bhowmick R., Sobkowiak K., Padayachy L., Mailler J., Hickson I.D., Halazonetis T.D. High-resolution mapping of mitotic DNA synthesis regions and common fragile sites in the human genome through direct sequencing. // *Cell. Res.* 2020. V. 30. N. 11. P. 997–1008.

Madireddy A., Kosiyatrakul S.T., Boisvert R.A., Herrera-Moyano E., Garcia-Rubio M.L., Gerhardt J., Vuono E.A., Owen N., Yan Z., Olson S., Aguilera A., Howlett N.G., Schildkraut C.L. FANCD2 facilitates replication through common fragile sites. // *Mol. Cell*. 2016. V. 64. P. 388–404.

Magenis R.E., Hecht F., Lovrien E.W. Heritable fragile site on chromosome 16: Probable localization of haptoglobin locus in man. // *Science*. 1970. V. 170. N. 3953. P. 85–87.

Malter H.E., Iber J.C., Willemsen R., de Graaff E., Tarleton J.C., Leisti J., Warren S.T., Oostra B.A. Characterization of the full fragile X syndrome mutation in fetal gametes. // *Nat. Genet.* 1997. V. 15. N. 2. P. 165–9.

Mangiarini L., Sathasivam K., Mahal A., Mott R., Seller M., Bates G.P. Instability of highly expanded CAG repeats in mice transgenic for the Huntington's disease mutation. // *Nature genetics*. 1997. V. 15. N. 2. P. 197–200.

Mannermaa A., Pulkkinen L., Kajanoja E., Ryyanen M., Saarikoski S. Deletion in the *FMR1* gene in a fragile-X male. // *Am. J. Med. Genet.* 1996. V. 64. P. 293–295.

Manley K., Pugh J., Messer A. Instability of the CAG repeat in immortalized

fibroblast cell cultures from Huntington's disease transgenic mice. // Brain Research. 1999. V. 835. N. 1. P. 74–79.

Mannava S., Moparthy K.C., Wheeler L.J., Natarajan V., Zucker S.N., Fink E.E., Im M., Flanagan S., Burhans W.C., Zeitouni N.C., Shewach D.S., Mathews C.K., Nikiforov M.A. Depletion of deoxyribonucleotide pools is an endogenous source of DNA damage in cells undergoing oncogene-induced senescence. // Am. J. Pathol. 2013. V. 182. P. 142–151.

Manor E., Jabareen A., Magal N., Kofman A., Hagerman R.J., Tassone F. Prenatal diagnosis of fragile X: can a full mutation allele in the *FMR1* gene contract to a normal size? // Front. Genet. 2017. V. 8. P. 158.

Marra G., Iaccarino I., Lettieri T., Roscilli G., Delmastro P., Jiricny J. Mismatch repair deficiency associated with overexpression of the MSH3 gene. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1998. V. 95. P. 8568–8573.

Mariappan S.V., Catasti P., Chen X., Ratliff R., Moyzis R.K., Bradbury E.M., Gupta G. Solution structures of the individual single strands of the fragile X DNA triplets (GCC) n^* (GGC) n . 1996. V. 24. N. 4. P. 784–792.

Marnef A., Legube G. R-loops as Janus-faced modulators of DNA repair. // Nat. Cell Biol. 2021. V. 23. P. 305–313.

Martin J.P., Bell J. A pedigree of mental defect showing sex-linkage. // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 1943. V. 6. N. 3–4. P. 154–157.

Martin M.M., Ryan M., Kim R., Zakas A.L., Fu H., Lin C.M., Reinhold W.C., Davis S.R., Bilke S., Liu H. et al. Genome-wide depletion of replication initiation events in highly transcribed regions. // Genome Res. 2011. V. 21. P. 1822–1832.

Massey T.H., Jones L. The central role of DNA damage and repair in CAG repeat diseases. // Disease models & mechanisms. 2018. V. 11. N. 1. P. dmm031930.

Mathews C.K. DNA precursor metabolism and genomic stability. // FASEB J. 2006. V. 20. P. 1300–1314.

Mathews C.K. Deoxyribonucleotides as genetic and metabolic regulators. // FASEB

J. 2014. V. 28. P. 3832–3840.

Mathews, C. K. Deoxyribonucleotide metabolism, mutagenesis and cancer. // Nat. Rev. Cancer. 2015. V. 15. P. 528–539.

Mathews C.K. Oxidized deoxyribonucleotides, mutagenesis, and cancer. // FASEB J. 2017. V. 31. P. 11–13.

Mattano S.S., Palella T.D., Mitchell B.S. Mutations induced at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase locus of human T-lymphoblasts by perturbations of purine deoxyribonucleoside triphosphate pools. // Cancer Res. 1990. V. 50. P. 4566–4571.

Matsuyama A., Shiraishi T., Trapasso F., Kuroki T., Alder H., Mori M., Huebner K., Croce C.M. Fragile site orthologs *FHIT/FRA3B* and *Fhit/Fra14A2*: evolutionarily conserved but highly recombinogenic. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2003. V. 100. N. 25. P. 14988–14993.

McAvoy S., Ganapathiraju S.C., Ducharme-Smith A.L., Pritchett J.R., Kosari F., Perez D.S., Zhu Y., James C.D., Smith D.I. Non-random inactivation of large common fragile site genes in different cancers. // Cytogenetic and genome research. 2007. V. 118. N. 2-4. P. 260–269.

McIvor E.I., Polak U., Napierala M. New insights into repeat instability: role of RNA*DNA hybrids. // RNA Biol. 2010. V. 7. P. 551–558.

Meuth M. The genetic consequences of nucleotide precursor pool imbalance in mammalian cells. // Mutat. Res. 1984. V. 126, P. 107–112.

Meyers M., Hwang A., Wagner M.W., Boothman D.A. Role of DNA mismatch repair in apoptotic responses to therapeutic agents. // Environ. Mol. Mutagen. 2004. V. 44. N. 4. P. 249–264.

Mila M., Castellvi-Bel S., Sanchez A., Lazaro C., Villa M., Estivill X. Mosaicism for the fragile X syndrome full mutation and deletions within the CGG repeat of the *FMR1* gene. // J. Med. Genet. 1996. V. 33. P. 338–340.

Mila M., Alvarez-Mora M.I., Madrigal I., Rodriguez-Revenga L. Fragile X

syndrome: An overview and update of the *FMR1* gene. // *Clinical genetics*. 2018. V. 93. N. 2. P. 197–205.

Miller C.J., Kim G.Y., Zhao X., Usdin K. All three mammalian MutL complexes are required for repeat expansion in a mouse cell model of the Fragile X-related disorders. // *PLoS Genet*. 2020. V. 16. P. e1008902.

Mirceta M., Shum N., Schmidt M.H.M., Pearson C.E. Fragile sites, chromosomal lesions, tandem repeats, and disease. // *Front. Genet*. 2022. V. 13. P. 985975.

Mirkin S.M. DNA structures, repeat expansions and human hereditary disorders. // *Curr. Opin. Struct. Biol*. 2006. V. 16. P. 351–358.

Mirkin S.M. Expandable DNA repeats and human disease. // *Nature*. 2007. V. 447. P. 932–940.

Miron K., Golan-Lev T., Dvir R., Ben-David E., Kerem B. Oncogenes create a unique landscape of fragile sites. // *Nat. Commun*. 2015. V. 6. P. 7094.

Mishmar D., Rahat A., Scherer S.W., Nyakatura G., Hinzmann B., Kohwi Y., Mandel-Gutfroind Y., Lee J.R., Drescher B., Sas D.E., Margalit H., Platzer M., Weiss A., Tsui L.C., Rosenthal A., Kerem B. Molecular characterization of a common fragile site (FRA7H) on human chromosome 7 by the cloning of a simian virus 40 integration site. // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1998. V. 95. N. 14. P. 8141–8146.

Mitas M., Yu A., Dill J., Haworth, I.S. The trinucleotide repeat sequence d(CGG)₁₅ forms a heat-stable hairpin containing Gsyn. Ganti base pairs. // *Biochemistry*. 1995. V. 34. P. 12803–12811.

Mizutani H., Hiraku Y., Tada-Oikawa S., Murata M., Ikemura K., Iwamoto T., Kagawa Y., Okuda M., Kawanishi S. Romidepsin (FK228), a potent histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis through the generation of hydrogen peroxide. // *Cancer science*. 2010. V. 101. N. 10. P. 2214–2219.

Mochmann L.H., Wells R.D. Transcription influences the types of deletion and expansion products in an orientation-dependent manner from GAC*GTC repeats. //

Nucleic Acids Res. V. 32. N. 15. P. 4469–4479.

Mollersen L., Rowe, A.D., Larsen E., Rognes T., Klungland A. Continuous and periodic expansion of CAG repeats in Huntington's disease R6/1 mice. // PLoS Genet. 2010. V. 6. N. 12. P. E1001242.

Mollersen L., Rowe A.D., Illuzzi J.L., Hildrestrand G.A., Gerhold K.J., et al. Neil1 is a genetic modifier of somatic and germline CAG trinucleotide repeat instability in R6/1 mice. // Hum. Mol. Genet. 2012. V. 21. N. 22. P. 4939–4947.

Mollersen L., Moldestad O., Rowe A.D., Bjolgerud A., Holm I., Tvetaras L., Klungland A., Retterstol L. Effects of anthocyanins on CAG repeat instability and behaviour in huntington's disease R6/1 mice. // PLoS Curr. 2016. V. 8.

Monaghan K.G., Lyon E., Spector E.B. ACMG standards and guidelines for fragile X testing: A revision to the disease-specific supplements to the standards and guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics and Genomics. // Genet. Med. 2013. V. 15. N. 7. P. 575–586.

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. N. 1. P. 1–8.

Mondul A.M., Rodriguez C., Jacobs E. J., Calle E.E. Age at natural menopause and cause-specific mortality. // Am. J. Epidemiol. 2005. V. 162. N. 11. P. 1089–1097.

Morales F., Vasquez M., Santamaria C., Cuenca P., Corrales E., Monckton D.G. A polymorphism in the *MSH3* mismatch repair gene is associated with the levels of somatic instability of the expanded CTG repeat in the blood DNA of myotonic dystrophy type 1 patients. // DNA Repair. 2016. V. 40. P. 57–66.

Morales F., Vasquez M., Corrales E., Vindas-Smith R., Santamaria-Ulloa C., Zhang B., Sirito M., Estecio M.R., Krahe R., Monckton D.G. Longitudinal increases in somatic

mosaicism of the expanded CTG repeat in myotonic dystrophy type 1 are associated with variation in age-at-onset. // *Hum. Mol. Genet.* 2020. V. 29. N. 15. P. 2496–2507.

Mortusewicz O., Herr P., Helleday T. Early replication fragile sites: where replication-transcription collisions cause genetic instability. // *EMBO J.* 2013. V. 32 N. 4. P. 493–495.

Mrasek K., Schoder C., Teichmann A.C., Behr K., Franze B., Wilhelm K., Blaurock N., Claussen U., Liehr T., Weise A. Global screening and extended nomenclature for 230 aphidicolin-inducible fragile sites, including 61 yet unreported ones. // *Int. J. Oncol.* 2010. V. 36. N. 4. 929–940.

Muller-Hartmann H., Deissler H., Naumann F., Schmitz B., Schröer J., Doerfler W. The human 20-kDa 5'-(CGG)(n)-3'-binding protein is targeted to the nucleus and affects the activity of the *FMRI* promoter. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. N. 9. P. 6447–6452.

Murano I., Kuwano A., Kajii T. Cell Type-dependent difference in the distribution and frequency of aphidicolin-induced fragile sites: T and B lymphocytes and bone marrow cells. // *Hum. Genet.* 1989a. V. 84. N. 1. P. 71–74.

Murano I., Kuwano A., Kajii T. Fibroblast-specific common fragile sites induced by aphidicolin. // *Hum. Genet.* 1989b. V. 83. N. 1. P. 45–48.

Musumeci S.A., Calabrese G., Bonaccorso C. M., D'Antoni S., Brouwer J. R., Bakker C.E., Elia M., Ferri R., Nelson D.L., Oostra B.A., Catania M.V. Audiogenic seizure susceptibility is reduced in fragile X knockout mice after introduction of *FMRI* transgenes. // *Exp. Neurol.* 2007. V. 203. N. 1. P. 233–240.

Muzar Z., Adams P.E., Schneider A., Hagerman R.J., Lozano R. Addictive substances may induce a rapid neurological deterioration in fragile X-associated tremor ataxia syndrome: a report of two cases. // *Intractable Rare Dis. Res.* 2014. V. 3. N. 4. P.162–165.

Nadel Y., Weisman-Shomer P., Fry M. The fragile X syndrome single strand d(CGG)_n nucleotide repeats readily fold back to form unimolecular hairpin structures. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. N. 48. P. 28970–28977.

Nakamori M., Pearson C.E., Thornton C.A. Bidirectional transcription stimulates expansion and contraction of expanded (CTG)^{*}(CAG) repeats. // Hum. Mol. Genet. 2011. V. 20. N. 3. P. 580–588.

Nakamori M., Panigrahi G.B., Lanni S., Gall-Duncan T., Hayakawa H., Tanaka H., et al. A slipped-CAG DNA-binding small molecule induces trinucleotide-repeat contractions *in vivo*. // Nat. Genet. 2020. V. 52 N. 2. P. 146–159.

Namkung H., Kim S.H., Sawa A. The insula: an underestimated brain area in clinical neuroscience, psychiatry, and neurology. // Trends Neurosci. 2017. V. 40. N. 4. P. 200–207.

Naumann A., Hochstein N., Weber S., Fanning E., Doerfler W. A distinct DNA-methylation boundary in the 5'-upstream sequence of the *FMRI* promoter binds nuclear proteins and is lost in fragile X syndrome. // Am. J. Hum. Genet. 2009. V. 85. N. 5. P. 606–616.

Niazy R., Cole D., Beckmann C., Smith S. Resting-State Networks. In: Uludag, K., Ugurbil, K., Berliner, L. P. 387-425. (eds) fMRI: From Nuclear Spins to Brain Functions. Biological Magnetic Resonance, V. 30. Springer, Boston, MA. 2015.

Nolin S.L., Glicksman A., Houck G.E. Jr., Brown W.T., Dobkin C.S. Mosaicism in fragile X affected males. // Am. J. Med. Genet. 1994. V. 51. N. 4. P. 509–512.

Nolin S.L., Houck G.E. Jr., Gargano A.D., Blumstein H., Dobkin C.S., Brown W.T. *FMRI* CGG-repeat instability in single sperm and lymphocytes of fragile-X premutation males. // Am. J. Hum. Genet. 1999. V. 65. N. 3. P. 680–688.

Nolin S.L., Ding X.H., Houck G.E., Brown W.T., Dobkin C. Fragile X full mutation

alleles composed of few alleles: implications for CGG repeat expansion. // *Am. J. Med. Genet. Part A.* 2008. V. 146A. N. 1. P. 60–65.

Nolin S.L., Glicksman A., Ersalesi N., Dobkin C., Brown W. T., Cao R., Blatt E., Sah S., Latham G.J., Hadd A.G. Fragile X full mutation expansions are inhibited by one or more AGG interruptions in premutation carriers. // *Genet. Med.* 2015. V. 17. N. 5. P. 358–364.

Nolin S.L., Glicksman A., Tortora N., Allen E., Macpherson J., Mila M., Vianna-Morgante A.M., Sherman S.L., Dobkin C., Latham G.J., Hadd A.G. Expansions and contractions of the *FMR1* CGG repeat in 5,508 transmissions of normal, intermediate, and premutation alleles. // *Am. J. Med. Genet. Part A.* 2019. V. 179. N. 7. P. 1148–1156.

Ohta M., Inoue H., Cotticelli M. G., Kastury K., Baffa R., Palazzo J., Siprashvili Z., Mori M., McCue P., Druck T., Croce C.M., Huebner K. The *FHIT* gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. // *Cell.* 1996. V. 84. N. 4. P. 587–597.

Okamoto Y., Iwasaki W.M., Kugou K., Takahashi K.K., Oda A., Sato K., et al. Replication stress induces accumulation of FANCD2 at central region of large fragile genes. // *Nucleic Acids Res.* V. 46. N. 6. P. 2932–2944.

Orpana A.K., Ho T.H., Stenman J. Multiple heat pulses during PCR extension enabling amplification of GC-rich sequences and reducing amplification bias. // *Anal. Chem.* 2012. V. 84. N. 4. P. 2081–1087.

Ozeri-Galai E., Lebofsky R., Rahat A., Bester A.C., Bensimon A., Kerem B. Failure of origin activation in response to fork stalling leads to chromosomal instability at fragile sites. // *Mol. Cell.* 2011. V. 43. N. 1. P. 122–131.

Palakodeti A., Han Y., Jiang Y., Le Beau M.M. The role of late/slow replication of the FRA16D in common fragile site induction. // *Genes chromosome and cancer.* 2004. V. 39. N. 1. P. 71–76.

Palakodeti A., Lucas I., Jiang Y., Young D. J., Fernald A.A., Karrison T., Le Beau M.M. Impaired replication dynamics at the FRA3B common fragile site. // *Hum. Mol. Genet.* 2010. V. 19. N. 1. P. 99–110.

Palumbo E., Matricardi L., Tosoni E., Bensimon A., Russo A. Replication dynamics at common fragile site FRA6E. // *Chromosoma.* V. 119. N. 6. P. 575–587.

Parrish J.E., Oostra B.A., Verkerk A.J., Richards C.S., Reynolds J., Spikes A.S., Shaffer L.G., Nelson D.L. Isolation of a GCC repeat showing expansion in FRAXF, a fragile site distal to FRAXA and FRAXE. // *Nature genetics.* 1994. V. 8. N. 3. P. 229–235.

Park C.Y., Halevy T., Lee D.R., Sung J.J., Lee J.S., Yanuka O., Benvenisty N., Kim D.W. Reversion of *FMR1* methylation and silencing by editing the triplet repeats in fragile X iPSC-derived neurons. // *Cell Rep.* 2015. V. 13. N. 2. P. 234–241.

Park S.H., Bennett-Baker P., Ahmed S., Arlt M.F., Ljungman M., Glover T.W., Wilson, T.E. Locus-specific transcription silencing at the *FHIT* gene suppresses replication stress-induced copy number variant formation and associated replication delay. // *Nucleic Acids Res.* 2021. V. 49. N.13. P. 7507–7524.

Pastori C., Peschansky V.J., Barbouth D., Mehta A., Silva J.P., Wahlestedt C. Comprehensive analysis of the transcriptional landscape of the human *FMR1* gene reveals two new long noncoding RNAs differentially expressed in Fragile X syndrome and Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. // *Hum. Genet.* 2014. V. 133. N. 1. P. 59–67.

Paulson H. in *Handbook of Clinical Neurology.* V. 147. Eds. Geschwind D.H. et al. P. 105–123. Elsevier. 2018.

Peabody D.S. Translation initiation at an ACG triplet in mammalian cells. // *The Journal of biological chemistry.* 1987. V. 262. N. 24. P. 11847–11851.

Peabody D.S. Translation initiation at non-AUG triplets in mammalian cells. // The Journal of biological chemistry. 1989. V. 264. N. 9. P. 5031–5035.

Peier A.M., McIlwain K.L., Kenneson A., Warren S.T., Paylor R., Nelson D.L. (Over)correction of *FMR1* deficiency with YAC transgenics: behavioral and physical features. // Hum. Mol. Genet. 2000. V. 9. N. 8. P. 1145–1159.

Pelletier R., Krasilnikova M.M., Samadashwily G.M., Lahue R., Mirkin S.M. Replication and expansion of trinucleotide repeats in yeast. // Molecular and cellular biology. 2003. V. 23. N. 4. P. 1349–1357.

Pelliccia F., Bosco N., Curatolo A., Rocchi A. Replication timing of two human common fragile sites: FRA1H and FRA2G. // Cytogenetic and Genome Res. 2008. V. 121. P. 196–200.

Pentzold C., Shah S.A., Hansen N.R., Le Tallec A., Seguin-Orlando A., Debatisse M., Lisby M., Oestergaard V.H. FANCD2 binding identifies conserved fragile sites at large transcribed genes in avian cells. // Nucleic Acids Res. 2018. V. 46. N. 3. P. 1280–1294.

Pieretti M., Zhang F.P., Fu Y.H., Warren S.T., Oostra B.A., Caskey C.T., Nelson D.L. Absence of expression of the *FMR-1* gene in fragile X syndrome. // Cell. 1991. V. 66. N. 4. P. 817-822.

Pietrobono R., Pomponi M.G., Tabolacci E., Oostra B., Chiurazzi P., Neri G. Quantitative analysis of DNA demethylation and transcriptional reactivation of the *FMR1* gene in fragile X cells treated with 5-azadeoxycytidine. // Nucleic Acids Res. 2002. V. 30. N. 14. P. 3278–3285.

Pietrobono R., Tabolacci E., Zalfa F., Zito I., Terracciano A., Moscato U., Bagni C., Oostra B., Chiurazzi P., Neri G. Molecular dissection of the events leading to inactivation of the *FMR1* gene. // Hum. Mol. Genet. 2005. V. 14. N. 2. P. 267–277.

Pinto R.M., Dragileva E., Kirby A., Lloret A., Lopez E., et al. Mismatch Repair Genes *Mlh1* and *Mlh3* Modify CAG Instability in Huntington's Disease Mice: Genome-Wide and Candidate Approaches. // PLoS Genet. 2013. V. 9. N. 10. P. E1003930.

Pinto M.R., Arning L., Giordano J.V., Razghandi P., Andrew M.A., Gillis T., Correia K., et al. Patterns of CAG repeat instability in the central nervous system and periphery in Huntington's disease and in spinocerebellar ataxia type 1. // Hum. Mol. Genet. 2020. V. 29. N. 15. P. 2551–2567.

Pirozzi F., Tabolacci E., Neri G. The FRAXopathies: Definition, overview, and update. // Am. J. Med. Genet. Part A. 2011. V. 155. N. 8. P. 1803–1816.

Powell S.K., MacAlpine H.K., Prinz J.A., Li Y., Belsky J.A., MacAlpine D.M. Dynamic loading and redistribution of the Mcm2-7 helicase complex through the cell cycle. // The EMBO journal. 2015. V. 34. N. 4. P. 531–543.

Pretto D., Yrigollen C.M., Tang H.T., Williamson J. Espinal G., Iwahashi C.K. Durbin-Johnson B., Hagerma, R.J., Hagerman P.J., Tassone F. Clinical and molecular implications of mosaicism in *FMRI* full mutations. // Front. Genet. 2014. V. 5. P. 318.

Quan F., Grompe M., Jakobs P., Popovich B.W. Spontaneous deletion in the *FMRI* gene in a patient with fragile X syndrome and cherubism. // Hum. Mol. Genet. 1995. V. 4. P. 1681–1684.

Reddy K.B. MicroRNA (miRNA) in cancer. // Canc. Cell Int. 2015. V. 15. P. 38.

Reidy J. A. Folate- and deoxyuridine-sensitive chromatid breakage may result from DNA repair during G2. // Mutat. Res. 1987. V. 192. N. 3. P. 217–219.

Renciuk D., Kypr J., Vorlickova M. CGG repeats associated with fragile X chromosome form left-handed Z-DNA structure. // Biopolymers. 2011. V. 95. N. 3. P. 174–181.

Reyniers E., Vits L., De Boulle K., Van Roy B., Van Velzen D., de Graaff E., Verkerk A.J., Jorens H.Z., Darby J.K., Oostra B. The full mutation in the *FMR-1* gene of male fragile X patients is absent in their sperm. // *Nat. Genet.* 1993. V. 4. P. 143–146.

Richards R.I., Holman K., Yu S., Sutherland G.R. Fragile X syndrome unstable element, p(CCG)_n, and other simple tandem repeat sequences are binding sites for specific nuclear proteins. // *Hum. Mol. Genet.* 1993. V. 2. P. 1429–1435.

Ritchie R.J., Knight S.J., Hirst M.C., Grewal P.K., Bobrow M., Cross G.S., Davies K.E. The cloning of FRAXF: trinucleotide repeat expansion and methylation at a third fragile site in distal Xqter. // *Human molecular genetics.* 1994. V. 3. N. 12. P. 2115–2121.

Roberts J.E., Bailey D.B., Mankowski J., Ford A., Sideris J., Weisenfeld L.A., Heath T.M., Golden R.N. Mood and anxiety disorders in females with the *FMR1* premutation. // *Am. J. Med. Genet. Part B.* 2009. V. 150B. N. 1. P. 130–129.

Rodriguez C.M., Wright S.E., Kearse M.G., Haenfler J. M., Flores B. N., Liu Y. et al. A native function for RAN translation and CGG repeats in regulating fragile X protein synthesis. // *Nat. Neurosci.* 2020. V. 23. P. 386–397.

Rousseau F., Heitz D., Biancalana V., Blumenfeld S., Kretz C., Boue J., Tommerup N., Van Der Hagen C., DeLozier-Blanchet C., Croquette M.F. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. // *The New England journal of medicine.* 1991. V. 325. N. 24. P. 1673–1681.

Rueda J.R., Ballesteros J., Guillen V., Tejada M.I., Sola I. Folic acid for fragile X syndrome. // *The Cochrane database of systematic reviews.* 2011. V. 5. P. CD008476.

Rupaimoole R., Slack F.J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. // *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2017. V. 16. P. 203–221.

Sabanov V., Braat S., D'Andrea L., Willemsen R., Zeidler S., Rooms L., Bagni C.,

Kooy R.F., Balschun D. Impaired GABAergic inhibition in the hippocampus of *Fmr1* knockout mice. // *Neuropharmacology*. 2017. V. 116. P. 71–81.

Salat U., Bardoni B., Wohrle D., Steinbach P. Increase of *FMRP* expression, raised levels of *FMRI* mRNA, and clonal selection in proliferating cells with unmethylated fragile X repeat expansions: a clue to the sex bias in the transmission of full mutations? // *J. Med. Genet.* V. 37. P. 842–850.

Saldarriaga W., Tassone F., González-Teshima L.Y., Forero-Forero J.V., Ayala-Zapata S., Hagerman R. Fragile Syndrome. // *Colomb. Med.* 2014. V. 45. N. 4. P. 190–198.

Saluto A., Brussino A., Tassone F., Arduino C., Cagnoli C., Pappi P., Hagerman P., Migone N., Brusco A. An enhanced polymerase chain reaction assay to detect pre- and full mutation alleles of the fragile X mental retardation 1 gene. // *J. Mol. Diagnostics*. 2005. V. 7. N. 5. P. 605–612.

Samadashwily G.M., Raca G., Mirkin S.M. Trinucleotide repeats affect DNA replication in vivo. // *Nature genetics*. 1997. V. 17. N. 3. P. 298–304.

Santos-Pereira J.M., Aguilera A. R loops: new modulators of genome dynamics and function. // *Nat. Rev. Genet.* 2015. V. 16. N. 10. P. 583–597.

Sarafidou T., Kahl C., Martinez-Garay I., Mangelsdorf M., Gesk S., Baker E., Kokkinaki M., et al. Folate-sensitive fragile site FRA10A is due to an expansion of a CGG repeat in a novel gene, FRA10AC1, encoding a nuclear protein. // *Genomics*. 2004. V. 84. N. 1. P. 69–81.

Sarni D., Sasaki T., Irony Tur-Sinai M., Miron K., Rivera-Mulia J.C., Magnuson B., Ljungman M., Gilbert D.M., Kerem B. 3D genome organization contributes to genome instability at fragile sites. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. N. 1. P. 3613.

Schenkel L.C., Schwartz C., Skinner C., Rodenhiser D.I., Ainsworth P.J., Pare G.,

Sadikovic B. Clinical validation of fragile X syndrome screening by DNA methylation array. // *J. Mol. Diagn.* 2016. V. 18. P. 834–841.

Schmucker B., Ballhausen W.G., Pfeiffer R.A. Mosaicism of a microdeletion of 486 bp involving the CGG repeat of the *FMR1* gene due to misalignment of GTT tandem repeats at chi-like elements flanking both breakpoints and a full mutation. // *Hum. Genet.* 1996. V. 98. P. 409–414.

Schneider A., Seritan A., Tassone F., Rivera S.M., Hagerman R., Hessler D. Psychiatric features in high-functioning adult brothers with fragile x spectrum disorders. // *Prim. Care Companion for CNS Disord.* 2013. V. 15. N. 2. P. PCC.12101492.

Schumacher S., Pinet I., Bichara M. Modulation of transcription reveals a new mechanism of triplet repeat instability in *Escherichia coli*. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 307. P. 39–49.

Sellier C., Freyermuth F., Tabet R., Tran T., He F., Ruffenach F., Alunni V. et al. Sequestration of DROSHA and DGCR8 by expanded CGG RNA repeats alters microRNA processing in fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. // *Cell Rep.* 2013. V. 3. N. 3. P. 869-880.

Sellier C., Buijsen R.A.M., He F., Natla S., Jung L., Tropel P., et al. Translation of expanded CGG repeats into FMRpolyG is pathogenic and may contribute to fragile X tremor ataxia syndrome. // *Neuron.* 2017. V. 93. N. 2. P. 331–347.

Seneca S., Lissens W., Endels K., Caljon B., Bonduelle M., Keymolen K., De Rademaeker M., Ullmann U., Haentjens P., Van Berkel K., Van Dooren S. Reliable and sensitive detection of fragile X (Expanded) alleles in clinical prenatal DNA samples with a fast turnaround time. // *J. Mol. Diagnostics.* 2012. V. 14. N. 6. P. 560–568.

Sequeira-Mendes J., Díaz-Uriarte R., Apedaile A., Huntley D., Brockdorff N., Gomez M. Transcription initiation activity sets replication origin efficiency in mammalian cells. // *PLoS genetics.* 2009. V. 5. N. 4. P. E1000446.

Seriola A., Spits C., Simard J.P., Hilven P., Haentjens P., Pearson C.E., Sermon K. Huntington's and myotonic dystrophy hESCs: down-regulated trinucleotide repeat instability and mismatch repair machinery expression upon differentiation. // *Hum. Mol. Genet.* 2011 V. 20. N. 1. P. 176–185.

Seritan A.L., Ortigas M., Seritan S., Bourgeois J.A., Hagerman R.J. Psychiatric disorders associated with FXTAS. // *Curr. Psychiatry Rev.* 2013. V. 9. P. 59–64.

Smith D. I., Zhu Y., McAvoy S., Kuhn R. Common fragile sites, extremely large Genes, neural development and cancer. // *Cancer Lett.* 2006. V. 232. N. 1. P. 48–57.

Smith D.I., McAvoy S., Zhu Y., Perez D.S. Large common fragile site genes and cancer. // *Seminars Cancer Biol.* 2007. V. 17. N. 1. P. 31–41.

Sollier J., Stork C.T., Garcia-Rubio M.L., Paulsen R.D., Aguilera A., Cimprich K.A. Transcription-coupled nucleotide excision repair factors promote R-loop-induced genome instability. // *Mol. Cell.* 2014. V. 56. P. 777–785.

Sporns O. Network attributes for segregation and integration in the human brain. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2013. V. 23. N. 2. P. 162–171.

Stege van der J.G., Groen H., van Zadelhoff S.J., Lambalk C.B., Braat D.D., van Kasteren Y.M., van Santbrink E.J., Apperloo M.J., Weijmar Schultz W.C., Hoek A. Decreased androgen concentrations and diminished general and sexual well-being in women with premature ovarian failure. // *Menopause.* 2008. V. 15. N. 1. P. 23–31.

Su X.A., Freudenreich C.H. Cytosine deamination and base excision repair cause R-loop-induced CAG repeat fragility and instability in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2017. V. 114. N. 40. P. E8392–E8401.

Subramanian P.S., Nelson D.L., Chinault A.C. Large domains of apparent delayed replication timing associated with triplet repeat expansion at FRAXA and FRAXE. // *Am. J. Hum. Genet.* 1996. V. 59. P. 407–416.

Suhl J.A., Muddashetty R.S., Anderson B.R., Ifrim M.F., Visootsak J., Bassell G.J., Warren S.T. A 3' untranslated region variant in *FMR1* eliminates neuronal activity-dependent translation of FMRP by disrupting binding of the RNA-binding protein HuR. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2015. V. 112. N. 47. P. E6553–E6561.

Sullivan S.D., Welt C., Sherman S. *FMR1* and the continuum of primary ovarian insufficiency. // Semin. Reprod. Med. 2011. V. 29. N. 4. P. 299–307.

Summers S.M., Cogswell J., Goodrich J.E., Mu Y., Nguyen D.V., Brass S.D., Hagerman R.J. Fatigue and body mass index in the Fragile X premutation carrier. // Fatigue Biomed. Health. Behav. 2014. V. 2. N. 2. P. 64–72.

Sutherland G.R. Fragile sites on human chromosomes: Demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. // Science. 1977. V. 197. N. 4300. P. 265–266.

Sutherland G.R. Heritable fragile sites on human chromosomes I. Factors affecting expression in lymphocyte culture. // Am. J. Hum. Genet. 1979. V. 31. N. 2. P. 125–135.

Sutherland G.R., Parslow M.I., Baker E. New classes of common fragile sites induced by 5-azacytidine and bromodeoxyuridine. // Hum. Genet. 1985a. V. 69. P. 233–237.

Sutherland G.R., Baker E., Fratini A., Opitz J.M., Reynolds J.F. Excess thymidine induces folate sensitive fragile sites. // Am. J. Med. Genet. 1985b. V. 22. N. 2. P. 433–443.

Sutherland G.R., Baker E. The common fragile site in band q27 of the human X chromosome is not coincident with the fragile X. // Clin. Genet. 1990. V. 37. N. 3. P. 167–172.

Sutherland G.R. Chromosomal fragile sites. // Genet. Anal. Tech. Appl. 1991. V. 8. N. 6. P. 161–166.

Sweder K.S., Hanawalt P.C. Transcription-coupled DNA repair. // Science. 1993. V. 262. N. 5132. P. 439–440.

Tabolacci E., Pomponi M.G., Pietrobono R., Chiurazzi P., Neri G. A unique case of reversion to normal size of a maternal premutation *FMR1* allele in a normal boy. // Eur.

J. Hum. Genet. 2008a. V. 16. N. 2. P. 209–214.

Tabolacci E., Moscato U., Zalfa F., Bagni C., Chiurazzi P., Neri G. Epigenetic analysis reveals a euchromatic configuration in the *FMRI* unmethylated full mutations. // Eur. J. Hum. Genet. 2008b. V. 16. N. 12. P. 1487–1498.

Tabolacci E., Chiurazzi P. Epigenetics, fragile X syndrome and transcriptional therapy. // Am. J. Med. Genet. A. 2013. V. 161A. N. 11. P. 2797–2808.

Tabolacci E., Palumbo F., Nobile V., Neri G. Transcriptional reactivation of the *FMRI* gene. A possible approach to the treatment of the fragile X syndrome. // Genes. 2016a. V. 7. N. 8. P. 49.

Tabolacci E., Mancano G., Lanni S., Palumbo F., Goracci M., Ferrè F., Helmer-Citterich M., Neri G. Genome-wide methylation analysis demonstrates that 5-aza-2-deoxycytidine treatment does not cause random DNA demethylation in fragile X syndrome cells. // Epigenet. Chromatin. 2016b. V. 9. N. 1. P. 1–15.

Tabolacci E., Pietrobono R., Maneri G., Remondini L., Nobile V., Della Monica M., Pomponi M.G., Genuardi M., Neri G., Chiurazzi P. Reversion to normal of *FMRI* expanded alleles: a rare event in two independent fragile X syndrome families. // Genes. 2020. V. 11. N. 3. P. 248.

Tanaka F., Reeves M.F., Ito Y., Matsumoto M., Li M., Miwa S., Inukai A., Yamamoto M., Doyu M., Yoshida M., Hashizume Y., Terao S., Mitsuma T., Sobue G. Tissue-specific somatic mosaicism in spinal and bulbar muscular atrophy is dependent on CAG-repeat length and androgen receptor-gene expression level. // Am. J. Hum. Genet. 1999. V. 65. N. 4. P. 966–973.

Tarleton J., Kenneson A., Taylor A.K., Crandall K., Fletcher R., Casey R., Hart P.S., Hatton D., Fisch G., Warren S.T. A single base alteration in the CGG repeat region of *FMRI*: Possible effects on gene expression and phenotype. // J. Med. Genet. 2002. V. 39. N. 3. P. 196–200.

Tassone F., Iwahashi C., Hagerman P.J. *FMRI* RNA within the intranuclear inclusions of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). // RNA Biol. 2004.

V. 1. N. 2. P. 103–105.

Tassone F., Adams J., Berry-Kravis E.B., Cohen S.S., Brusco A., Leehey M.A., Li L., Hagerman R., Hagerman P. CGG repeat length correlates with age of onset of motor signs of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). // *Am. J. Med. Genet. Part B.* 2007a. V. 144B. N. 4. P. 566–569.

Tassone F., Beilina A., Carosi C., Albertosi S., Bagni C., Li L., Glover K., Bentley D., Hagerman P.J. Elevated *FMRI* mRNA in premutation carriers is due to increased transcription. // *RNA.* 2007b. V. 13. N. 4. P. 555–562.

Tassone F., Pan R., Amiri K., Taylor A.K., Hagerman P.J. A rapid polymerase chain reaction-based screening method for identification of all expanded alleles of the fragile X (*FMRI*) gene in newborn and high-risk populations. // *J. Mol. Diagnostics.* 2008. V. 10. N. 1. P. 43–49.

Tassone F. Advanced technologies for the molecular diagnosis of fragile X syndrome. // *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2015. V. 15. N. 11. P. 1465–1473.

Taylor A.K., Tassone F., Dyer P.N., Hersch S.M., Harris J.B., Greenough W.T., Hagerman R.J. Tissue heterogeneity of the *FMRI* mutation in a high-functioning male with fragile X syndrome. // *Am. J. Med. Genet.* 1999. V. 84. N. 3. P. 233–239.

Telenius H., Ponder B.A., Tunnacliffe A., Pelmeur A.H., Carter N.P., Ferguson-Smith M.A., Behmel A., Nordenskjöld M., Pfragner R. Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. // *Gene Chromosom. Cancer.* 1992. V. 4. N. 3. P. 257–263.

Telenius H., Kremer B., Goldberg Y.P., Theilmann J., Andrew S.E., Zeisler J., Adam S., Greenberg C., Ives E.J., Clarke L.A., Hayden M.R. Somatic and gonadal mosaicism of the Huntington disease gene CAG repeat in brain and sperm. // *Nat. Genet.* 1994. V. 6. N 4. P. 409–414.

Teng Y., Yadav T., Duan M., Tan J., Xiang Y., Gao B., Xu J., Liang Z., Liu Y., Nakajima S., et al. ROS-induced R loops trigger a transcription-coupled but BRCA1/2-independent homologous recombination pathway through CSB. // *Nat. Commun.* 2018.

V. 9. N. 1. P. 4115.

Tentindo G.S., Fishman S.M., Li C.S., Wang Q., Brass S.D. The prevalence and awareness of sleep apnea in patients suffering chronic pain: an assessment using the STOP-Bang sleep apnea questionnaire. // *Nat. Sci. Sleep*. 2018. V. 10. P. 217–224.

Todd P.K., Oh S.Y., Krans A., Pandey U.B., Di Prospero N.A., Min K.T., Taylor J.P., Paulson H.L. Histone deacetylases suppress CGG repeat-induced neurodegeneration via transcriptional silencing in models of Fragile X Tremor Ataxia Syndrome. // *PLoS Genet*. 2010. V. 6. N. 12. P. 1–17.

Todd P.K., Oh S.Y., Krans A., He F., Sellier C., Frazer M., Renoux A.J., et al. CGG repeat-associated translation mediates neurodegeneration in fragile X tremor ataxia syndrome. // *Neuron*. 2013. V. 78. N. 3. P. 440–455.

Tome S., Holt I., Edelmann W., Morris G.E., Munnich A., Pearson C.E., Gourdon G. MSH2 ATPase domain mutation affects CTG*CAG repeat instability in transgenic mice. // *PLoS Genet*. 2009. V. 5. N. 5. P. e1000482.

Uddin L.Q., Nomi J.S., Hébert-Seropian B., Ghaziri J., Boucher O. Structure and function of the human insula. // *J. Clin. Neurophysiol*. 2017. V. 34. N. 4. P. 300–306.

Ueno S., Kondoh K., Kotani Y., Komure O., Kuno S., Kawai J., Hazama F., Sano A. Somatic mosaicism of CAG repeat in dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). // *Hum. Mol. Genet*. 1995. V. 4. N. 4. P. 663–667.

Usdin K., Woodford K.J. CGG repeats associated with DNA instability and chromosome fragility form structures that block DNA synthesis *in vitro*. // *Nucleic Acids Res*. 1995. V. 23. N. 20. P. 4202–4209.

Van den Broek W.J., Nelen M.R., Wansink D.G., Coerwinkel M.M., te Riele H., Groenen P.J., Wieringa B. Somatic expansion behaviour of the (CTG)_n repeat in myotonic dystrophy knock-in mice is differentially affected by Msh3 and Msh6 mismatch-repair proteins. // *Hum. Mol. Genet*. 2002. V. 11. N. 2. P. 191–198.

Van Wietmarschen N., Sridharan S., Nathan W.J., Tubbs A., Chan E.M., Callen E., et al. Repeat expansions confer WRN dependence in microsatellite-unstable cancers. //

Nature. 2020. V. 586. N. 7828. P. 292–298.

Veitch N.J., Ennis M., McAbney J.P., US-Venezuela Collaborative Research Project, Shelbourne P.F., Monckton D.G. Inherited CAG*CTG allele length is a major modifier of somatic mutation length variability in Huntington disease. // *DNA Repair*. 2007. V. 6. N. 6. P. 789–796.

Verkerk A.J., Pieretti M., Sutcliffe J.S., Fu Y.H., Kuhl D.P., Pizzuti A., Reiner O., Richards S., Victoria M.F., Zhang F.P. Identification of a gene (*FMR-1*) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. // *Cell*. 1991. V. 65. N. 5. P. 905–914.

Vershkov D., Fainstein N., Suissa S., Golan-Lev T., Ben-Hur T., Benvenisty N. *FMR1* reactivating treatments in fragile X iPSC-derived neural progenitors *in vitro* and *in vivo*. // *Cell Rep*. 2019. V. 26. N. 10. P. 2531–2539.

Voineagu I., Surka C.F., Shishkin A.A., Krasilnikova M.M., Mirkin S.M. Replisome stalling and stabilization at CGG repeats, which are responsible for chromosomal fragility. // *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2009. V. 16. N. 2. P. 226–228.

Volle C.B., Delaney S. AGG/CCT interruptions affect nucleosome formation and positioning of healthy-length CGG/CCG triplet repeats. // *BMC Biochem*. 2013. V. 14. P. 33.

Voutsinos V., Munk S.H.N., Oestergaard V.H. Common chromosomal fragile sites-conserved failure stories. // *Genes*. 2018. V. 9. N. 12. P. 580.

Wang Y.H. Chromatin structure of human chromosomal fragile sites. // *Cancer Lett*. 2006. V. 232. N. 1. P. 70–78.

Wang C., Jurk D., Maddick M., Nelson G., Martin-Ruiz C., von Zglinicki T. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. // *Aging Cell*. 2009. V. 8. N. 3. P. 311–323.

Wang B., Pan L., Wei M., Wang Q., Liu W.W., Wang N., Jiang X.Y., Zhang X., Bao L. FMRP-mediated axonal delivery of miR-181d regulates axon elongation by locally targeting *Map1b* and *Calm1*. // *Cell Rep*. 2015. V. 13. N. 12. P. 2794–2807.

Webb T. Delayed replication of Xq27 in individuals with the fragile X syndrome. // Am. J. Med. Genet. 1992. V. 43. N. 6. P. 1057–1062.

Weiser T., Gassmann M., Thömmes P., Ferrari E., Hafkemeyer P., Hübscher U. Biochemical and functional comparison of DNA polymerases alpha, delta, and epsilon from calf thymus. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. N. 16. P. 10420–10428.

Wenger S.L., Giangreco C.A., Tarleton J., Wessel H.B. Inability to induce fragile sites at CTG repeats in congenital myotonic dystrophy. // Am. J. Med. Genet. 1996. V. 66. N. 1. P. 60–63.

Wheeler V.C., Lebel L.A., Vrbanac V., Teed A., de Riele H., MacDonald M.E. Mismatch repair gene *Msh2* modifies the timing of early disease in *Hdh^{Q111}* striatum. // Hum. Mol. Genet. 2003. V. 12. N. 3. P. 273–281.

Willemsen R., Levenga J., Oostra B.A. CGG repeat in the *FMRI* gene: size matters. // Clin. Genet. 2011. V. 80. N. 3. P. 214–225.

Wilson T.E., Arlt M.F., Park S.H., Rajendran S., Paulsen M., Ljungman M., Glover T.W. Large transcription units unify copy number variants and common fragile sites arising under replication stress. // Genome Res. 2015. V. 25. N. 2. P. 189–200.

Winarni T.I., Chonchaiya W., Sumekar T.A., Ashwood P., Morales G.M., Tassone F., et al. Immune-mediated disorders among women carriers of fragile X premutation alleles. // Am. J. Med. Genet. A. 2012. V. 158A. N. 10. P. 2473–2481.

Winnepenninckx B., Debacker K., Ramsay J., Smeets D., Smits A., FitzPatrick D.R., Kooy R.F. CGG-repeat expansion in the *DIP2B* gene is associated with the fragile site FRA12A on chromosome 12q13.1. // Am. J. Hum. Genet. 2007. V. 80. N. 2. P. 221–231.

Wohrle. D., Salat U., Hameister H., Vogel W., Steinbach, P. Demethylation, reactivation, and destabilization of human fragile X full-mutation alleles in mouse embryocarcinoma cells. // Am. J. Hum. Genet. 2001. V. 69. N. 3. P. 504–515.

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. N. 1. P. 114–122.

Woodford K., Weitzmann M.N., Usdin K. The use of K(+)-free buffers eliminates a common cause of premature chain termination in PCR and PCR sequencing. // *Nucleic Acid Research*. 1995. V. 23. N. 3. P. 539.

Wu W., Bhowmick R., Vogel I., Özer Ö., Ghisays F., Thakur R.S., Sanchez de Leon E., Richter P.H., Ren L., Petrini J.H., Hickson I.D., Liu Y. RTEL1 suppresses G-quadruplex-associated R-loops at difficult-to-replicate loci in the human genome. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2020. V. 27. N. 5. P. 424–437.

Wyatt D.W., Feng W., Conlin M.P., Yousefzadeh M.J., Roberts S.A., Mieczkowski P., Wood R.D., Gupta G.P., Ramsden D.A. Essential roles for polymerase theta-mediated end joining in the repair of chromosome breaks. // *Mol. Cell*. 2016. V. 63. N. 4. P. 662–673.

Xie N., Gong H., Suhl J.A., Chopra P., Wang T., Warren S.T. Reactivation of *FMR1* by CRISPR/Cas9-mediated deletion of the expanded CGG-repeat of the fragile X chromosome. // *PLoS One*. 2016. V. 11. N. 10. P. 1–12.

Yamada T., Itahashi T., Nakamura M., Watanabe H., Kuroda M., Ohta H., Kanai C., Kato N., Hashimoto R.-I. Altered functional organization within the insular cortex in adult males with high-functioning autism spectrum disorder: evidence from connectivity-based parcellation. // *Mol. Autism*. 2016. V. 7. N. 1. P. 1–15.

Yang X.J., Seto E. Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2003. V. 13. N. 2. P. 143–153.

Yerys B.E., Gordon E.M., Abrams D.N., Satterthwaite T.D., Weinblatt R., Jankowski K.F., Strang J., Kenworthy L., Gaillard W.D., Vaidya C.J. Default mode network segregation and social deficits in autism spectrum disorder: Evidence from non-medicated children DMN in children with ASD. // *NeuroImage Clin*. 2015. V. 9. P. 223–232.

Yrigollen C.M., Martorell L., Durbin-Johnson B., Naudo M., Genoves J., Murgia A., Polli R., Zhou L., Barbouth D., Rupchock A., Finucane B., Latham G.J., Hadd A., Berry-Kravis E., Tassone F. AGG interruptions and maternal age affect *FMR1* CGG repeat

allele stability during transmission. // *J. Neurodev. Disord.* 2014. V. 6. N. 1. P. 20.

Yu A., Barron M.D., Romero R.M., Christy M., Gold B., Dai J., Gray D.M., Haworth I.S., Mitas M. At physiological pH, d(CCG)₁₅ forms a hairpin containing protonated cytosines and a distorted helix. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. N. 12. P. 3687–3699.

Yu D., Sakurai F., Corey D.R. Clonal Rett Syndrome cell lines to test compounds for activation of wild-type MeCP2 expression. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011. V. 21. N. 18. P. 5202–5205.

Yudkin D.V., Hayward B.E., Aladjem M.I., Kumari D., Usdin K. Chromosome fragility and the abnormal replication of the *FMR1* locus in fragile X syndrome. // *Hum. Mol. Genet.* 2014. V. 23. N. 11. P. 2940–2952.

Zang J.B., Nosyreva E.D., Spencer C.M., Volk L.J., Musunuru K., Zhong R., Stone E.F., Yuva-Paylor L.A., Huber K.M., Paylor R., Darnell J.C., Darnell R.B. A mouse model of the human Fragile X syndrome I304N mutation. // *PLoS Genet.* 2009. V. 5. N. 12. P. e1000758.

Zeier Z., Kumar A., Bodhinathan K., Feller J.A., Foster T.C., Bloom D.C. Fragile X mental retardation protein replacement restores hippocampal synaptic function in a mouse model of fragile X syndrome. // *Gene Ther.* 2009. V. 16. N. 9. P. 1122–1129.

Zerbi V., Markicevic M., Gasparini F., Schroeter A., Rudin M., Wenderoth N. Inhibiting mGluR5 activity by AFQ056/Mavoglurant rescues circuit-specific functional connectivity in *Fmr1* knockout mice. // *Neuroimage.* 2019. V. 191. P. 392–402.

Zhao X.N., Kumari D., Gupta S., Wu D., Evanitsky M., Yang W., Usdin K. Mutsbeta generates both expansions and contractions in a mouse model of the Fragile X-associated disorders. // *Hum. Mol. Genet.* 2015. V. 24. N. 24. P. 7087–7096.

Zhao X.N., Usdin K. Gender and cell-type-specific effects of the transcription-coupled repair protein, ERCC6/CSB, on repeat expansion in a mouse model of the fragile X-related disorders. // *Hum. Mutat.* 2014. V. 35. N. 3. P. 341–349.

Zhao X.N., Usdin K. The repeat expansion diseases: The dark side of DNA repair. // *DNA Repair.* 2015. V. 32. P. 96–105.

Zhao X.N., Lokanga R., Allette K., Gazy I., Wu D., Usdin K. A MutSbeta-dependent contribution of MutSalpha to repeat expansions in fragile X premutation mice? // PLoS Genet. 2016. V. 12. N. 7. P. e1006190.

Zhao X.N., Usdin K. FAN1 protects against repeat expansions in a Fragile X mouse model. // DNA Repair. 2018. V. 69. P. 1–5.

Zhao X.N., Usdin K. Timing of expansion of fragile X premutation alleles during intergenerational transmission in a mouse model of the Fragile X-related disorders. // Front. Genet. 2018. V. 9. P. 314.

Zhao X., Zhang Y., Wilkins K., Edelmann W., Usdin K. MutLgamma promotes repeat expansion in a Fragile X mouse model while EXO1 is protective. // PLoS Genet. 2018. V. 14. N. 10. P. e1007719.

Zhao X., Gazy I., Hayward B., Pintado E., Hwang Y.H., Tassone F., Usdin K. Repeat instability in the fragile X-related disorders: lessons from a mouse model. // Brain Sci. 2019. V. 9. N. 3. P. 52.

Zhao P.A., Sasaki T., Gilbert D.M. High-resolution repli-seq defines the temporal choreography of initiation, elongation and termination of replication in mammalian cells. // Genome Biol. 2020. V. 21. N. 1. P. 76.

Zhao X., Kumari D., Miller C.J., Kim G.Y., Hayward B., Vitalo A.G., Pinto R. M., Usdin K. Modifiers of somatic repeat instability in mouse models of Friedreich Ataxia and the Fragile X-related disorders: Implications for the Mechanism of somatic expansion in Huntington's disease. // J. Huntington's Dis. 2021. V. 10. N. 1. P. 149–163.

Zheglo D., Brueckner L.M., Sepman O., Wecht E.M., Kuligina E., Suspitsin E., Imyanitov E., Savelyeva L. The FRA14B common fragile site maps to a region prone to somatic and germline rearrangements within the large *GPHN* gene. // Gene. Chromosome. Canc. 2019. V. 58. N. 5. P. 284–294.

Zhou Y., Law H.Y., Boehm C.D., Yoon C.S., Cutting G.R., Ng I.S., Chong S.S. Robust fragile X (CGG)_n genotype classification using a methylation specific triple PCR assay. // J. Med. Genet. 2004. V. 41. N. 4. P. e45.

Zhou Y., Kumari D., Sciascia N., Usdin K. CGG-repeat dynamics and *FMRI* gene silencing in fragile X syndrome stem cells and stem cell-derived neurons. // *Mol. Autism*. 2016. V. 7. N. 1. P. 1–13.

Zhu Q.S, Heisterkamp N., Groffen J. Unique organization of the human *BCR* gene promoter. // *Nucleic Acids Res*. 1990. V. 18. N. 23. P. 7119–7125.

Zingg J.M., Jones P.A. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. // *Carcinogenesis*. 1997. V. 18. N. 5. P. 869–882.

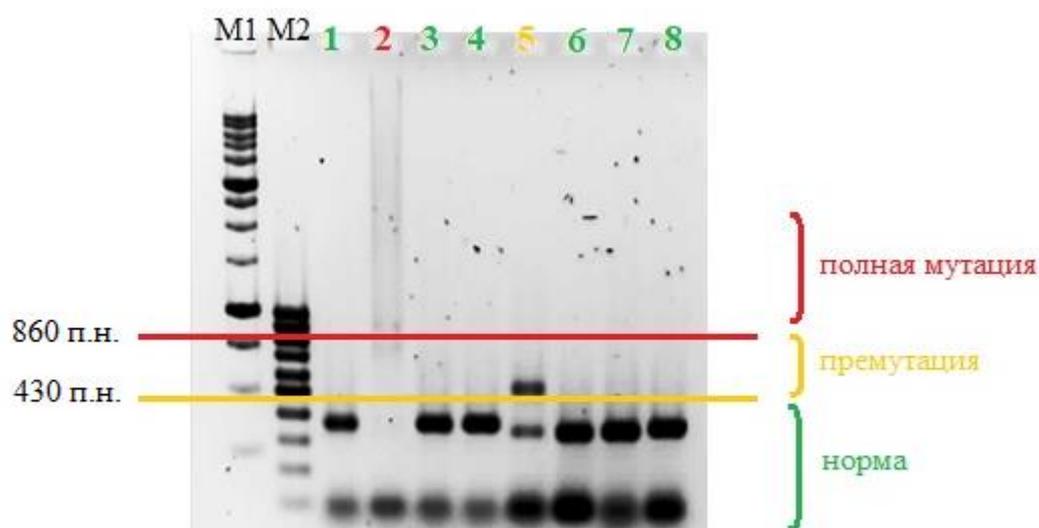
Zlotorynski E., Rahat A., Skaug J., Ben-Porat N., Ozeri E., Hershberg R., Levi A., Scherer S.W., Margalit H., Kerem B. Molecular basis for expression of common and rare fragile sites. // *Mol. Cell. Biol*. 2003. V. 23. N. 20. P. 7143–7151.

Zongaro S., Hukema R., D'antoni S., Davidovic L., Barbry P., Catania M.V., Willemsen R., Mari B., Bardoni B. The 3' UTR of *FMRI* mRNA is a target of miR-101, miR-129-5p and miR-221: implications for the molecular pathology of FXTAS at the synapse. // *Hum. Mol. Genet*. 2013. V. 22. N. 10. P. 1971–1982.

Zu T., Gibbens B., Doty, N.S., Gomes-Pereira M., Huguet A., Stone M.D., Margolis J., Peterson M., Markowski T.W., Ingram M.A., et al. Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2011. V. 108. N. 1. P. 260–265.

ПРИЛОЖЕНИЯ

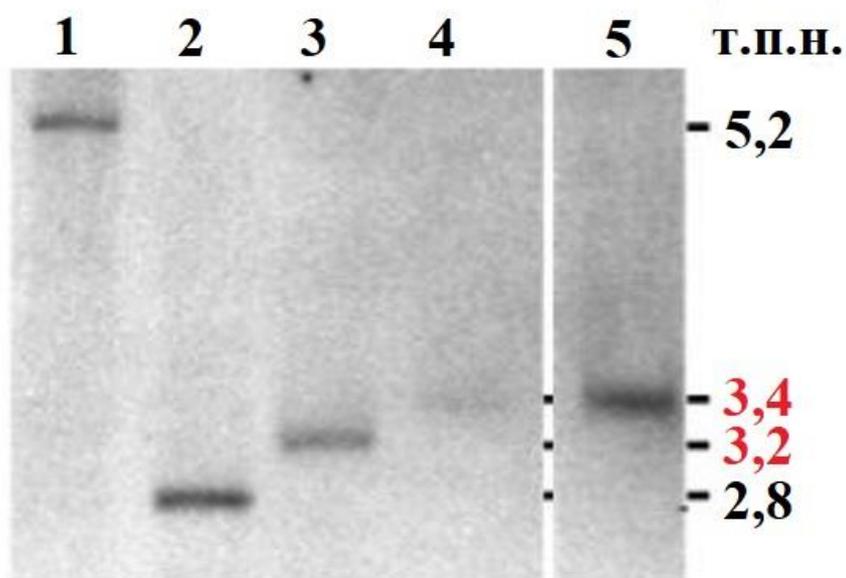
Приложение 1 – Пример электрофореза в агарозном геле продуктов ПЦР для определения размера повтора CGG (см. 2.2.10) у пациентов с подозрением на синдром ломкой X-хромосомы. M1, M2 – маркеры молекулярного веса. 1-8 – образцы пациентов. Зеленые цифры – норма, желтые цифры – премутация, красные цифры – полная мутация.



Приложение 2 – Значения Ct в ПЦР в реальном времени на 10 нг геномной ДНК из различных линий клеток

Положение	Пример	Клеточная линия		
		GM06865	GM06897	GM03200
До повтора	FraX2	35.59	35.41	35.87
	FraX1.5	27.24	27.07	27.32
	FraX1c	35.38	35.74	35.42
После повтора	FraX11	32.90	33.01	33.24
	FraX12	25.31	25.28	25.44
	FraX13	28.53	28.25	28.5

Приложение 3 – Анализ размера повтора на разных пассажах линии GM06891. Размер повтора определен с помощью Саузерн-блот анализа, как описано в 1.9 и на рисунке 9. В норме (2) фрагмент имеет размер 2,8 т.п.н., что указывает на отсутствие метилирования. При метилированной полной мутации (1) размер повтора превышает 5,2 т.п.н. На дорожках 3-5 представлен анализ размера повтора в линии клеток в разные временные точки.



- 1: метилированная полная мутация
- 2: норма
- 3: GM06891-t0
- 4: GM06891-t2
- 5: GM06891-t3

Приложение 4 – Анализ метилирования локуса FRAXA в семье, описанной в разделе 4.4, по методике, описанной в разделе 2.2.11. Буквой «р» обозначены дорожки, на которых представлен ПЦР продукт, наработанный с матрицы, после гидролиза метилчувствительной рестриктазой *AspLEI*. В образцах CPG10 и CPG11 присутствует продукт, что свидетельствует о наличии метилированных аллелей.

