

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ  
им. Н.И. ВАВИЛОВА  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Протасова Мария Сергеевна  
**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РЕДКИХ ФОРМ ВРОЖДЁННЫХ  
МОЗЖЕЧКОВЫХ АТАКСИЙ**

специальность – 1.5.7. – генетика  
Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
Академик РАН, д.б.н., проф. Рогаев Е.И.

Москва – 2022

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Список сокращений.....</b>	<b>5</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>6</b>
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>16</b>
1.1. Наследственные атаксии.....	16
1.1.1. Генетика и распространённость .....	16
1.1.2. Молекулярно-генетические механизмы .....	23
1.1.3. Врождённые атаксии без когнитивных нарушений .....	32
1.1.4. Синдром мозжечковой атаксии, умственной отсталости и квадропедии.....	35
1.1.5. Современные методы генетических исследований.....	40
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....</b>	<b>44</b>
2.1. Материалы исследования.....	44
2.1.1. Биологические образцы.....	44
2.1.2. Клиническое описание пациентов .....	44
2.1.2.1. Большая бурятская семья.....	44
2.1.2.2. Московская семья .....	47
2.1.2.3. Северо-Кавказские семьи .....	48
2.1.2.4. Бразильская семья.....	49
2.2. Методы генетического анализа ДНК.....	50
2.2.1. Выделение ДНК из крови и оценка качества.....	50
2.2.2. Приготовление библиотек ДНК и их массовое параллельное секвенирование .....	51
2.2.3. Методы биоинформатического анализа данных массового параллельного секвенирования и поиска кандидатных вариантов .....	54
2.2.4. Проверка кандидатных вариантов .....	56
2.2.5. Анализ генов-кандидатов методом прямого секвенирования по Сэнгеру.....	59
2.2.6. Методы анализа экспрессии кандидатных генов .....	59
2.2.7. Методы этнической идентификации и установления родства .....	60
2.2.8. Методы эволюционного анализа.....	61

<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....</b>	<b>62</b>
3.1. Анализ генетических причин врождённой X-сцепленной рецессивной мозжечковой атаксии в большой бурятской семье .....	62
3.1.1. Биоинформатический анализ данных полногеномного секвенирования ДНК пациента с X-сцепленной рецессивной мозжечковой атаксией.....	62
3.1.2. Проверка кандидатных вариантов в семье АХ.....	69
3.1.3. Биоинформатическое предсказание структурных изменений в белках с выявленными вариантами в семье АХ.....	70
3.1.3.1. Биоинформатическое предсказание структурных изменений в белке, вызванных однонуклеотидной заменой в гене <i>ABCB7</i> .....	70
3.1.3.2. Биоинформатическое предсказание структурных изменений в белке, вызванных делецией в гене <i>ATP7A</i> .....	74
3.1.4. Анализ естественного нокаута ретрогена <i>PGAM4</i> и его влияние на фертильность. ....	76
3.2. Анализ генетических причин мозжечковой атаксии в семьях АI-IV ....	77
3.2.1. Таргетный генетический анализ кандидатных генов <i>ABCB7</i> , <i>ATP7A</i> , <i>PGAM4</i> и <i>ATP2B3</i> и найденных в них мутаций.....	77
3.2.2. Биоинформатический анализ данных полноэкзомного секвенирования ДНК пациентов с мозжечковой атаксией .....	78
3.2.2.1. Биоинформатический анализ данных полноэкзомного секвенирования ДНК пациентов из семьи АI.....	80
3.2.2.2. Биоинформатический анализ данных полноэкзомного секвенирования ДНК пациентов из семей АII и АIII.....	83
3.2.2.3. Биоинформатический анализ данных полноэкзомного секвенирования ДНК пациента из семьи АIV .....	87
3.2.3. Биоинформатическое предсказание структурных изменений в белках с выявленными вариантами в семьях АI-IV .....	88
3.2.3.1. Биоинформатическое предсказание структурных изменений в белке, вызванных однонуклеотидной заменой в гене <i>FAAH2</i> .....	89
3.2.3.2. Биоинформатическое предсказание структурных изменений в белке, вызванных однонуклеотидной заменой в гене <i>LRCH2</i> .....	90
3.2.3.3. Биоинформатическое предсказание структурных изменений в белке, вызванных однонуклеотидной заменой в гене <i>CSMD1</i> .....	92
3.2.3.4. Биоинформатическое предсказание структурных изменений в белке, вызванных однонуклеотидной заменой в гене <i>GRM1</i> .....	93

3.2.4. Сравнительный анализ данных экспрессии генов и их паралогов ..	95
3.2.4.1. Сравнительный анализ данных экспрессии гена <i>FAAH2</i> и его паралога в мозжечке, других отделах головного и спинного мозга, а также периферических нервах .....	99
3.2.4.2. Сравнительный анализ данных экспрессии гена <i>LRCH2</i> и его паралогов в мозжечке, других отделах головного и спинного мозга, а также периферических нервах .....	100
3.2.4.3. Сравнительный анализ данных экспрессии гена <i>CSMD1</i> и его паралогов в мозжечке и других отделах головного мозга .....	102
3.3. Генетический анализ причин Синдрома CAMRQ в Бразильской семье .....	104
3.3.1. Биоинформатический анализ данных полногеномного секвенирования ДНК пациента с синдромом CAMRQ .....	104
3.3.2. Проверка кандидатных вариантов в семье Q.....	110
3.3.3. Анализ структурных изменений в глутаматном рецепторе GRID2 в результате делеции у пациентов из семьи Q.....	112
3.3.4. Эволюционный анализ гена <i>GRID2</i> .....	113
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....</b>	<b>118</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>131</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>133</b>
<b>БЛАГОДАРНОСТИ.....</b>	<b>134</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>134</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ .....</b>	<b>172</b>

## Список сокращений

а.к. – аминокислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

д.т. – дикий тип

кДНК – комплементарная ДНК

мтДНК – митохондриальная ДНК

мут. – мутантный

н.д. – нет данных

н.т. – нуклеотиды

ОМП – однонуклеотидный полиморфизм

ОТ-ПЦР – ПЦР с обратной транскрипцией

п.н. – пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов

MAF – частота минорного аллеля ( $g$  – в мировой популяции,  $\max$  – максимальная частота в популяции)

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность работы

Врождённые мозжечковые атаксии являются орфанными заболеваниями, которые приводят к нарушению моторных функций, задержке развития и инвалидности [Иллариошкин и др., 2006, Ashizawa, Xia, 2016]. По данным базы, объединяющей гены и клинические фенотипы, “Online Mendelian Inheritance in Man”, OMIM, известно более сотни различных мозжечковых атаксий. По типу наследования различают аутосомно-доминантные, аутосомно-рецессивные, X-сцепленные доминантные, X-сцепленные рецессивные и митохондриальные атаксии. Наиболее распространены атаксии, вызванные экспансией повторов и являющиеся нейродегенеративными заболеваниями с поздним началом и прогрессирующим течением [Клюшников и др., 2022]. К ним относятся аутосомно-доминантные спиноцеребеллярные атаксии (SCA1, 2, 3, 6, 7, 12 и 17), аутосомно-рецессивная атаксия Фридрейха, синдром мозжечковой атаксии, нейропатии и вестибулярной арефлексии (CANVAS) и синдром ломкой X-хромосомы с тремором/атаксией (FXTAS). Большинство аутосомно- и X-сцепленных рецессивных синдромов имеют раннее начало (до 25 лет). Частота встречаемости атаксий среди детей в европейской популяции составляет 26 на 100 000 человек [Musselman et al., 2014]. Атаксии с ранним началом могут быть вызваны как нейродегенерацией, например, атаксия-телеангиэктазия или атаксии с глагодвигательной апраксией 1-го и 2-го типа, так и связаны с нарушением развития мозжечка — врождённые заболевания. Врождённые мозжечковые атаксии представляют обширную группу редких клинических фенотипов, имеющих гетерогенную природу, большинство из которых отягощены умственной отсталостью и различными нарушениями со стороны других органов и тканей.

Геномные технологии массового параллельного секвенирования открывают большие возможности для исследования редких заболеваний при постановке диагноза и поиска причин заболеваний неизвестной этиологии, однако ввиду высокой стоимости и сложностей в биоинформатической интерпретации данных остаются недоступными для большинства пациентов [Claussnitzer et al., 2020]. Взамен используют панели кандидатных генов для конкретных заболеваний, однако в более чем половине случаев мозжечковых атаксий генетические причины остаются не идентифицированы [Ruano et al., 2014; Klockgether et al., 2019; Jiao et al., 2020; Galatolo et al., 2021; Sakamoto et al., 2022]. Одним из основных ограничений генетической диагностики с применением технологии массового параллельного секвенирования является отсутствие достаточных фундаментальных знаний об организации и регуляции генома, молекулярно-биологических знаний о строении и функциях белков и эволюционных процессах, лежащих в их основе. По последним данным геномного браузера Ensembl на 2022 год, в мировой человеческой популяции известно более 715 млн однонуклеотидных и 6 млн структурных вариантов, число которых растёт с увеличением геномных и экзомных данных [Cunningham et al., 2022]. Большая часть вариантов в геноме не критична для нормального развития, однако малая часть может быть связана с орфанными заболеваниями [Xiao et al., 2021]. На сегодняшний день поиск патогенных вариантов наиболее успешен в белок-кодирующих последовательностях генов, имеющих связь с конкретными заболеваниями, но лишь в 26-33% случаев мозжечковых атаксий с неуточнённым диагнозом удаётся выявить патогенные варианты, ещё примерно в 15-20% случаев выявляемые варианты имеют неизвестное клиническое значение [Kim et al., 2020; Galatolo et al., 2021]. Среди кандидатных вариантов чаще всего (в 60-80% случаев) встречаются миссенс замены, что затрудняет предсказание их влияния на белок и требует дополнительных исследований [Galatolo et al., 2021, Xiao et al., 2021]. Мозжечковые атаксии характеризуются высокой гетерогенностью, поэтому стратегия анализа должна быть направлена на поиск патогенных

вариантов не только в уже известных генах, но и в генах, ранее не связанных с мозжечковыми патологиями.

Для большинства мозжечковых атаксий отсутствует эффективное лечение, тем не менее, множество исследований направлены на разработку новых подходов в терапии данной группы заболеваний. Большинство исследований связано с разработкой подходов к лечению наиболее распространённых спиноцеребеллярных атаксий, вызванных экспансией повторов [Ashizawa et al., 2018; Buijsen et al., 2019, Borbolla-Jiménez et al., 2021]. Тогда как для редких врождённых заболеваний более перспективным, вероятно, является развитие ранней диагностики и технологии геномного редактирования [Ilyas et al., 2020; Falabella et al., 2022; Reshetnikov et al., 2022].

Идентификация новых генетических дефектов является первоочередным шагом для понимания молекулярно-генетических механизмов патогенеза заболеваний как при определённой форме, так и для целой группы патологий. Расширение фундаментальных знаний, лежащих в основе развития мозжечка, моторных и когнитивных функций, играет важную роль для дальнейшей разработки лечения и профилактики заболеваний. Идентификация дефектных генов при врождённых мозжечковых атаксиях также полезна для избежания неэффективного и возможно даже приносящего вред симптоматического лечения. В современной мировой популяции наблюдается тенденция повышения генетического груза, поэтому выявление редких патогенных вариантов имеет важное значение при планировании семьи и в пренатальной диагностике.

Генетические причины наиболее распространённых форм мозжечковых атаксий известны и включены в диагностические панели, тогда как в настоящее время врождённые мозжечковые атаксии представляют наименее изученную группу наследственных атаксий, а спектр патогенных вариантов и кандидатных генов, связанных с данной группой заболеваний, требует изучения и расширения. В связи с этим является актуальным исследование

генетических причин наиболее редких случаев врождённых патологий мозжечка. Одной из таких форм являются исследуемые в данной работе случаи врождённой мозжечковой атаксии без клинически значимых когнитивных нарушений, выявленные в нескольких семьях из разных этнических групп [Illarioshkin et al., 1996; Иллариошкин, 1997; Protasova et al., 2022]. Другим случаем является синдром мозжечковой атаксии, умственной отсталости и квадропедии (CAMRQ), выявленный в близкородственной семье из Бразилии [Garcias, Roth, 2007].

### **Степень разработанности темы исследования**

Большинство врождённых мозжечковых атаксий отягощено умственной отсталостью и другими осложнениями [Wassmer et al., 2003; Poretti et al., 2014]. Отличительной особенностью исследуемых случаев является выраженное нарушение моторных функций, связанное с гипоплазией мозжечка, при котором сохранены когнитивные функции. На данный момент известны несколько заболеваний (SCAR6, SCAR19 и SCAR24), при которых у пациентов не было отмечено когнитивных нарушений, однако от исследуемых в данной работе врождённых мозжечковых патологий их отличает ряд симптомов. Наиболее близкая клиническая картина описана в семьях с патогенным вариантом в гене *ATP2B3*, приводящим к аминокислотной замене p.Gly1107Asp [Zanni et al., 2012].

Случаи синдрома CAMRQ встречаются крайне редко и ранее описаны в близкородственных семьях из Турции и Ирака [Türkmen et al., 2006; Ozelik et al., 2008; Tan, 2006; Tan, 2007; Valence et al., 2016]. Уникальным отличием от многих других врождённых патологий мозжечка, является тяжёлая форма умственной отсталости с полным отсутствием речи и локомоция исключительно на четырёх конечностях – квадропедия. Несмотря на близкую клиническую картину, наблюдается генетическая гетерогенность для данного синдрома. Наиболее распространены мутации в гене *VLDLR*, реже встречаются в генах *WDR81*, *ATP8A2*, *RELN*, *CA8* и *TUBB2B* [Moheb et al.,

2008; Ozcelik et al., 2008; Türkmen et al., 2009; Gulsuner et al., 2011; Onat et al., 2013; Breuss et al., 2017; Wali et al., 2021].

**Цель исследования** – выявить генетические причины редких случаев в семьях с врождённой мозжечковой атаксией и синдромом мозжечковой атаксии, умственной отсталости и квадропедии с использованием технологии массового параллельного секвенирования.

**Задачи исследования:**

1. Провести массовое параллельное секвенирование образцов ДНК пациентов из разных семей с редкими формами мозжечковой атаксии.
2. Провести анализ данных массового параллельного секвенирования и выявить генетический дефект, являющийся причиной врождённой X-сцепленной рецессивной гипоплазии мозжечка у пациентов из большой бурятской семьи.
3. Провести генетический анализ кандидатных генов у пациентов с диагнозом врождённой мозжечковой атаксии из малых (ядерных) семей.
4. Разработать подход биоинформатического анализа данных массового параллельного секвенирования для идентификации новых патогенных генетических факторов в малых семьях или спорадических случаях с неопределённой этиологией.
5. С помощью разработанного подхода выявить генетические дефекты, приведшие к редкой спинномозжечковой атаксии в малых семьях.
6. Провести анализ данных массового параллельного секвенирования и выявить генетический дефект, являющийся причиной синдрома мозжечковой атаксии, умственной отсталости и квадропедии в близкородственной бразильской семье.
7. Установить эволюционный вклад генетического локуса, дефект которого связан с уникальным фенотипом в бразильской семье, и ответственного за формирование бипедальной локомоции, когнитивных функций и речи у современных людей.

## Научная новизна

В результате исследования редких форм мозжечковой атаксии были выявлены новые генетические варианты в генах, ответственных за развитие мозжечка. Более того, были выявлены высоко консервативные гены *LRCH2* и *CSMD1*, экспрессирующиеся в мозжечке, роль которых в развитии мозга мало изучена, и было впервые показано, что дефекты в этих генах могут приводить к мозжечковой атаксии без когнитивных нарушений. На примере генов, связанных с мозжечковой атаксией, был разработан подход биоинформатического поиска кандидатных генов генетических заболеваний на основе интеграции данных геномного секвенирования и “пространственно-временной” экспрессии паралогичных генов. Также были обнаружены особенности эволюции гена *GRID2*, вовлечённого в развитие мозжечка и отвечающего за формирование бипедальной локомоции, когнитивных функций и речи; обнаружена новая делеция в этом гене, приводящая к уникальному редкому синдрому мозжечковой атаксии, умственной отсталости и квадропедии.

## Научно-практическая значимость

Данное исследование представляет важное прикладное значение для молекулярно-диагностических исследований нарушений развития мозжечка, планирования семьи и пренатальной диагностики, расширяя список кандидатных генов, связанных с аутосомно- и X-сцепленными рецессивными атаксиям. Все новые мутации, выявленные у пациентов с гипоплазией и атрофией мозжечка, размещены в базе данных ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) и находятся в свободном международном доступе.

Более того, данное исследование полезно для дальнейших фундаментальных исследований молекулярных процессов развития и контроля моторных функций, так как оба гена *LRCH2* и *CSMD1*, ассоциированных по результатам исследования с развитием аутосомно- и X-

сцепленных рецессивных мозжечковых атаксий, экспрессируются в интернейронах мозжечка и, вероятно, участвуют в одних и тех же биологических процессах, но на разных этапах онтогенеза.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Редкая форма спиноцеребеллярной атаксии с ранним началом без когнитивных нарушений генетически гетерогенна, фенотипически близкие синдромы могут быть вызваны генетическими дефектами разных генов, вовлечённых в разные биологические пути в клетках мозжечка.
2. Мутации в лейцин-богатом повторах домене гена *LRCH2*, экспрессирующегося в мозжечке в эмбриональный период, могут приводить к врождённой X-сцепленной рецессивной спиноцеребеллярной атаксии с генерализованной полинейропатией без когнитивных нарушений.
3. Миссенс мутации в комплемент-связывающем домене гена *CSMD1*, экспрессирующегося в развивающемся мозжечке и участвующем в развитии нейрональных отростков и образовании синапсов, могут приводить к аутосомно-рецессивной спиноцеребеллярной атаксии без когнитивных нарушений с ранним началом. Выявленный патогенный вариант является редким и имеет эффект основателя.
4. Миссенс мутация в гене *ABCB7*, в области, кодирующей внутримитохондриальный домен, приводит к X-сцепленной рецессивной гипоплазии мозжечка и наследуется в общей группе сцепления с делецией в гене *ATP7A*, которая, возможно, является модифицирующим фактором фенотипа.
5. Миссенс мутация, расположенная в седьмом трансмембранном домене гена *GRM1*, приводит к врождённой аутосомно-рецессивной спиноцеребеллярной атаксии.

6. Делеция 5-7 экзонов в гене *GRID2*, кодирующей область в аминотерминальном домене, приводит к синдрому мозжечковой атаксии, умственной отсталости и квадропедии с полным отсутствием речи.

### **Личный вклад автора**

Автор лично принимал основное участие в проведении генетического анализа во всех семьях с патологией мозжечка и разработке подхода выявления генов кандидатов в малых семьях. Генетический анализ был проведён с использованием данных массового параллельного секвенирования геномов и экзонов пациентов с диагнозом мозжечковой атаксии. Образцы ДНК пациентов с диагнозом мозжечковой атаксии предоставлены в рамках совместного научного проекта из Центра Неврологии. Образцы крови пациентов из семьи Q получены в рамках экспедиции в регион Бразилии, осуществлённой Григоренко А. П. Геномные данные массового параллельного секвенирования были получены ранее сотрудниками лаборатории эволюционной геномики. Данные массива SNP6.0 на платформе Affymetrix были получены в сотрудничестве с Базельским Университетом в Швейцарии. Анализ гомозиготности в бразильской семье Q был проведён биоинформатиком Решетовым Д. А. Автор совместно с коллегами принял непосредственное участие в биоинформатическом анализе данных массового секвенирования геномных библиотек пациента AX-III-17 и пациента Q-IV-1, аннотации однонуклеотидных вариантов, инделов и структурных вариантов. Анализ изменения сайта сплайсинга методом, описанным в статьях [Stamm et al., 2000; Нурдинов и др., 2006] в гене *ABCB7* был проведён Григоренко А. П. (Таблица 11 Приложения). Автором лично проведено приготовление части экзомных библиотек для массового параллельного секвенирования. Другая часть экзомных библиотек была просеквенирована в генетическом центре «Генетико». Автором лично проведён биоинформатический анализ данных массового параллельного секвенирования экзомных библиотек, в том числе выравнивание данных и аннотация однонуклеотидных вариантов, инделов и структурных вариантов.

Автором лично проведён поиск, отбор и анализ редких вариантов, анализ консервативности выявленных вариантов, предсказано влияние на структуру белка. Автором лично проведён анализ литературных данных о функциях и патологиях вызываемых кандидатными генами, а также сравнение клинических картин пациентов с ранее опубликованными клиническими случаями для кандидатных генов.

Онлайн программа анализа генов-кандидатов и их паралогов и сравнения их экспрессии в отделах мозга в процессе онтогенеза была произведена вместе с биоинформатиком Гусевым Ф. Е. и руководителем данной диссертации. Совместно с Гусевым Ф.Е. подготовлен иллюстративный материал данных анализа экспрессии. Автором лично проведена валидация разработанной программы, для которой был проведён отбор генов, мутации в которых вызывают аутосомно-рецессивные спиноцеребеллярные атаксии, и их паралогов, для которых имеются опубликованные данные о наличии или отсутствии избыточности генов.

Автор лично участвовал в валидации и генотипировании с помощью ПЦР и прямого секвенирования по Сэнгеру кандидатных вариантов у пациентов и их родственников с мозжечковой атаксией из большой бурятской семьи и малых семей. Автор полностью провёл анализ всех экзонов гена *ABCB7*, 20 экзона в гене *ATP2B3* и области делеции в гене *ATP7A* в образцах ДНК пациентов из малых семей. Автором лично проведено генотипирование с помощью прямого секвенирования по Сэнгеру кандидатного варианта в гене *CSMD1* на контрольной выборке из Северо-Кавказского региона. Автор лично участвовал в валидации и генотипировании с помощью ПЦР и прямого секвенирования по Сэнгеру всех редких однонуклеотидных вариантов у членов бразильской семьи. Валидация делеции в гене *GRID2* в бразильской семье была проведена Григоренко А. П.

Автором лично проведён эволюционный анализ кодирующей последовательности гена *GRID2* с помощью программы PAML. Автором

лично проведён эволюционный анализ изменения внутренней энергии Гиббса в пространственной структуре мРНК гена *GRID2* у человека и приматов.

Автором лично проведено написание первичного текста статей с результатами исследований и принято непосредственное совместное участие в подготовке статей для опубликования в научных рецензируемых журналах. Автором принято участие в написании тезисов и личное представление их на конференциях.

### **Публикации**

Результаты исследования представлены в 7 научных публикациях, в том числе в 3 статьях в ведущих научных журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science и рекомендованных ВАК для защиты диссертаций.

### **Структура и объем работы**

Диссертационная работа изложена на 206 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, заключение, выводы, благодарности, список литературы и приложения. Иллюстративный материал диссертации представлен в виде 9 таблиц и 22 рисунков, приложение содержит 20 таблиц и 22 рисунка. Список литературы включает 490 литературных источников, из которых 476 источников зарубежной литературы.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Наследственные атаксии

Наследственные атаксии – группа гетерогенных заболеваний, характеризующихся нарушением координации. В норме координация является результатом согласованной работы различных систем организма: регуляторного аппарата – различных структур головного мозга (мозжечка, коры головного мозга, базальных ганглиев, продолговатого мозга), спинного мозга и периферической иннервации, сенсорной чувствительности (вестибулярного аппарата, проприоцепции, зрительного аппарата), исполнительного опорно-двигательного аппарата, а также и других систем. В большинстве случаев наследственные атаксии возникают в результате дисфункции мозжечка или нарушений иннервации вестибулярных или проприоцептивных афферентных волокон, входящих в мозжечок [Иллариошкин и др., 2006; Ashizawa, Xia, 2016].

#### 1.1.1. Генетика и распространённость

Наследственные атаксии – редкое заболевание с частотой встречаемости в среднем примерно 1,5 - 4 случаев на 100 000 человек [Ruano et al., 2014]. Наследственные атаксии имеют гетерогенную природу: в настоящий момент выявлены повреждения в более чем в пяти сотнях генов, мутации в которых приводят к гипоплазии или атрофии мозжечка в чистой форме или вместе с другими патологиями [Stenson et al., 2003; Stenson et al., 2020]. Генетические дефекты примерно в одной пятой из этих генов приводят к гипоплазии мозжечка, как правило, в сочетании с когнитивными нарушениями, вызванными лиссэнцефалией, микроцефалией или атрофией коры больших полушарий головного мозга.

Наследственные атаксии различают по типу наследования на аутосомно-доминантные, аутосомно-рецессивные, X-сцепленные доминантные, X-сцепленные рецессивные и митохондриальные. Многочисленные

генетические исследования наследственных мозжечковых атаксий показали наличие высокой пенетрантности выявляемых мутаций, при этом наличие высокой гетерогенности фенотипически близких синдромов. Более того, для некоторых генов обнаружена одновременно связь как с аутосомно-рецессивными, так и с аутосомно-доминантными заболеваниями [Deciphering Developmental Disorders Study, 2017]. Так и для некоторых генов, связанных с мозжечковыми атаксиями, например *SPTBN2*, *VPS13D*, *GRM1* и *STUB1*, описаны различные мутации, приводящие как к аутосомно-рецессивным, так и аутосомно-доминантным формам [Amberger et al., 2015]. Чаще аутосомно- и X-сцепленные рецессивные заболевания имеют более тяжёлое течение и более раннее начало, в младенчестве или раннем детстве, а доминантные чаще всего развиваются с возрастом и имеют прогрессирующий характер. В связи с тем, что в основе различных наследственных форм атаксий могут лежать общие молекулярно-генетические механизмы, в обзоре будут рассмотрены все гены, связанные с мозжечковыми патологиями.

На настоящий момент известно не менее 47 различных аутосомно-доминантных спиноцеребеллярных атаксий (СЦА или SCA), связанных с дефектами различных генов [Coarelli et al., 2018, Vuijsen et al. 2019]. В большинстве случаев причиной развития SCA является увеличение количества тринуклеотидных повторов в нескольких генах (*ATXN1-3*, *CACNA1A*, *ATXN7*, *PPP2R2B*, *TBP*), повреждения в которых приводят к различным типам SCA (SCA1, SCA2, SCA3/MJD, SCA6, SCA7, SCA12, SCA17), именуемые также тринуклеотидные заболевания [Клюшников, Иллариошкин, 2012; Klockgether et al., 2019]. Наиболее распространённая форма из аутосомно-доминантных тринуклеотидных заболеваний по некоторым оценкам является SCA3, или называемая также Болезнь Мачадо-Джозефа, с экспансией CAG повторов в гене *ATXN3*, составляет примерно 20-50% от всех случаев заболеваний данной группы (случ. заб.) [Hersheson, J et al., 2012; Ruano et al., 2014; Klockgether et al., 2019]. Наибольшее распространение SCA3 отмечено в Бразилии (69–92% от всех случ. заб.) и

Португалии (58–74% от всех случ. заб.), в частности на Азорских островах достигая 4,2 случая на 1 000 человек [Jardim et al., 2001; Bettencourt et al., 2008]. Также высокая распространённость SCA3 наблюдается в Малайзии (69% от всех случ. заб.) [Mohamed Ibrahim et al., 2020], в регионе Хокурику в Японии (63% от всех случ. заб.) [Shibata-Hamaguchi et al., 2009], и в Китае (48–62% от всех случ. заб.) [Jiang et al., 2005], реже в странах Европы и Азии [Bettencourt et al., 2011]. В зависимости от региона другие атаксии могут превалировать. Так, например, SCA2, занимающая второе место по распространённости в мире, доминирует в Испании в провинции Кантабрии (30% от всех случ. заб.) [Infante et al., 2005] и среди населения Кубы с испанскими корнями, у которых достигает 43 случая на 100 000 человек [Velázquez-Pérez et al., 2001]. Также SCA2 часто встречается в Мексике (43% от всех случ. заб.), Италии (25-47% от всех случ. заб.) [Brusco et al., 2004; Filla et al., 2000] и Сингапуре (33% от всех случ. заб.) [Zhao et al., 2002]. Высокую распространённость также имеет SCA6 среди населения острова Хоккайдо в Японии (31% от всех случ. заб.) [Bastri et al., 2007], юго-востока Австралии (30% от всех случ. заб.) [Storey et al., 2000], Северной Голландии (23,4% от всех случ. заб.) [Verbeek et al., 2004] и Германии (22% от всех случ. заб.) [Schöls et al., 1997], и занимает третье место по распространённости в мире [Sequeiros et al., 2012]. SCA1 наиболее распространена в Польше (42-68% от всех случ. заб.) [Sulek-Piatkowska et al., 2010], а также в Южной Африке (41% от всех случ. заб.) [Bryer et al., 2003] и Сербии (34% от всех случ. заб.) [Dragasević et al., 2006]. На территории России превалирует SCA1 (41% от всех случ. заб.), которая наиболее распространена в Восточной Сибири в популяции якутов, среди которых наблюдается рост заболеваемости SCA1 и по последним оценкам достигает 46 на 100 000 индивидов [Platonov et al., 2016; Ключников и др. 2022]. Количество аутосомно-доминантных атаксий, вызванных мутациями в других генах, составляет около 40% от всех случ. заб., но в зависимости от региона значительно варьирует [Sequeiros et al., 2012] и может достигать 92% в

Норвегии [Erichsen et al., 2009], около 72% в Корее [Jin et al., 1999] или 62% в Финляндии [Juvonen et al., 2005].

Распространённость аутосомно-рецессивных заболеваний составляет в среднем примерно 1,8 – 4,9 случаев на 100 000 человек [Ruano et al., 2014]. В общей сложности известно более 59 различных аутосомно-рецессивных форм заболеваний, имеющих симптомы мозжечковой атаксии [Beaudin M et al., 2019]. Из аутосомно-рецессивных форм самой распространённой является атаксия Фридрейха, связанная с чрезмерным увеличением GAA повторов в гене фратаксина *FXN* [Ruano et al., 2014]. Распространённость атаксии Фридрейха сильно различается в зависимости от региона и коррелирует с гаплогруппой R1b, наиболее высокая отмечена в Испании, южной Франции и Ирландии, где может достигать 2-5 на 100 000 индивидов [Anheim et al., 2010, Polo et al., 1991], тогда как в Скандинавии и России отмечен самый низкий уровень распространённости заболевания 0,13-0,30 случаев на 100 000 индивидов [Juvonen et al. 2002; Кириленко, 2004; Vankan et at., 2013]. Тем не менее в российской популяции атаксия Фридрейха занимает второе место по распространённости и встречается у 34,5% пациентов взрослого возраста с диагнозом SCAR [Ершова 2003; Ключников и др. 2022]. Помимо увеличения в области тринуклеотидных повторов, наиболее распространены мутации в нескольких генах, приводящих к аутосомно-рецессивным заболеваниям атаксии с окуломоторной апраксией 1-го и 2-го типа, связанной с повреждением генов *APTХ* и *SETХ*, и атаксия-телеангиэктазия, к которой приводят различные мутации в гене *ATM* [Ruano et al., 2014]. Атаксия-телеангиэктазия (АТ) занимает второе место после атаксии Фридрейха, приводит к нейродегенерации и атаксии, вызывает первичный иммунодефицит и мультисистемные нарушения, а также часто приводит к различным формам рака. Частота заболевания атаксией-телеангиэктазией составляет примерно 1-2,5 случаев на 100 000 человек [Anheim et al., 2012], встречается практически во всех странах и этнических группах. В некоторых странах, например, в Норвегии, частота встречаемости атаксии-

телеангиэктазии составляет 18% от всех случ. заб. и превышает атаксию Фридрейха [Erichsen et al., 2009]. Для атаксии-телеангиэктазии во многих регионах обнаружен эффект основателя, и найденные патогенные мутации коррелируют с определёнными гаплогруппами [Telatar et al., 1998; Campbell et al., 2003; Birrell et al., 2005; Carranza et al., 2016]. В России и других славянских странах большинство пациентов являются носителями трёх вариантов 5932G>T (p.Glu1978\*), с.450\_453delTTCT (p.Ser151\*) и с.1564-1565delGA [Mitui et al., 2005; Suspitsin et al., 2020; Нужный и др. 2020]. Кроме этого, с каждым годом нарастает число новых выявленных патогенных мутаций, приводящих к развитию заболевания, и на данный момент превышает 1 400 различных вариантов [Amirifar et al., 2020]. Вероятно, помимо эффекта основателя, данная генетическая область характеризуется большой мутабельностью, приводящей к постоянному возникновению новых патогенных вариантов. Нарушения в гене *SETX*, кодирующем белок сенатаксин, вызывают атаксию с окулоmotorной апраксией 2-го типа, которая наряду с АТ имеет высокое распространение после атаксии Фридрейха и в некоторых странах занимает второе место по распространённости, например, в Португалии (18% от всех случ. заб.) [Coutinho et al. 2013] или в исторической области на востоке Франции Эльзас (10%) [Anheim et al., 2010]. Атаксия с окулоmotorной апраксией 1-го типа связана с нарушениями в гене *APTХ*, впервые выявленном в Японии [Date et al., 2001] и Португалии [Moreira et al., 2001], наибольшее количество пациентов выявлено в Италии [Castellotti et al., 2011; Criscuolo et al., 2004] и в Турции [Arslan et al., 2019]. В России выявлены единичные случаи с окулоmotorными атаксиями 1-го и 2-го типов [Нужный и др., 2019]. В Европейских и Северо-Африканских популяциях распространена атаксия с дефицитом витамина Е (AVED), занимающая примерно пятое место по частоте встречаемости в мире, причиной которой служат мутации в гене *TPA* [Ouahchi 1995; Schuelke, 1993; Mariotti et al., 2004]. В Российской и Финской популяциях встречается мозжечковая атаксия, вызванная нарушениями гена *POLG*. Мутации в этом гене приводят к синдрому

митохондриальной рецессивной атаксии (mitochondrial recessive ataxia syndrome, MIRAS), частным случаем которого является синдром сенситивной атаксии, невропатии, дизартрии, офтальмоплегии (sensory ataxic neuropathy, dysarthria, ophthalmoplegia, SANDO) [Van Goethem et al., 2003; Schulte et al., 2009]. Одним из наиболее распространённых вариантов в России, Финляндии и Норвегии, а также встречающимся и в других европейских популяциях, является р.Trp748Ser, имеющий эффект основателя [Наконен et al., 2005; Нужный и др. 2019]. Недавно была обнаружена экспансия пентануктеотидных повторов в интронной области гена *RFC1*, дальнейшие генетические исследования показали, что биаллельные экспансии составляют в разных популяциях от 1 до 30% случаев поздней атаксии [Cortese et al., 2019; Rafehi et al., 2019; Davies et al., 2022]. Наиболее распространённая патогенная экспансия AAGGG(n), обнаруженная в Финской популяции, имеет эффект основателя европейского происхождения [Cortese et al., 2019; Rafehi et al., 2019]. Нарушения работы гена *RFC1* приводят к синдрому мозжечковой атаксии, нейропатии и вестибулярной арефлексии CANVAS, однако иногда могут встречаться и другие фенотипы, в том числе и чистая мозжечковая атаксия [Gisatulin et al., 2020; Montaut et al. 2021; Davies et al., 2022]. В российской популяции синдром CANVAS имеет высокое распространение и занимает первое место среди пациентов взрослого возраста [Нужный и др., 2020; Ключников и др. 2022].

Гипоплазия или атрофия мозжечка также может иметь X-сцепленный доминантный или рецессивный характер наследования. На настоящий момент известно около 20 различных X-сцепленных мозжечковых атаксий [Zanni, Bertini, 2018]. Наиболее распространёнными являются заболевания, связанные с экспансией CGG повторов в промоторе гена *FMR1* и имеющие X-сцепленный доминантный характер наследования [Devys et al., 1993; Tassone et al., 2012]. Увеличение повторов в количестве от 55 до 200 (премутация) приводит к синдрому ломкой X-хромосомы с тремором/атаксией (Fragile X tremor/ataxia syndrome, FXTAS), в большинстве случаев проявляется у мужчин

в возрасте 50-60 лет, приводя к нарушению моторных и когнитивных функций в результате атрофии мозжечка, деменции и периферической нейропатии [Jacquemont et al., 2003; Hagerman et al., 2015]. Некоторые носители премутации от 55 до 200 повторов в гене *FMR1* могут иметь с детства слабые симптомы и нарушения аутического спектра [Farzin et al., 2006; Clifford et al., 2007; Wheeler et al., 2016; Hagerman et al., 2018; Aishworiya et al., 2022]. Экспансия повторов свыше 200 приводит к синдрому ломкой X-хромосомы (Fragile X syndrome, FXS), занимающему второе место по распространённости среди случаев умственной отсталости у детей после трисомии 21 хромосомы [Rousseau et al., 1995]. Другое наиболее распространённое заболевание, синдром Ретта, встречается с частотой 1 на 10 000 и приводит к тяжёлой форме умственной отсталости, диагностируется в основном у девочек в возрасте от 6 до 18 месяцев и связано с мутациями в гене *MECP2*, продукт которого необходим для обеспечения метилирования ДНК и регуляции транскрипции генов в развивающемся мозге [Hagberg, 1985; Amir et al., 1999; Tillotson et al., 2019; Brunetti et al., 2020; Fu et al., 2020]. Мутации в этом гене также приводят к X-сцепленным рецессивным заболеваниям: синдрому умственной отсталости и тяжёлой неонатальной энцефалопатии, а также синдрому дублированного гена *MECP2* [Geerdink et al., 2002; Lugtenberg et al., 2009; Lim et al., 2017]. Мутации в гене *CASK*, кодирующем кальций/кальмодулин-зависимую сериновую протеинкиназу, известны как причины синдрома умственной отсталости, микроцефалии и понтомозжечковой атаксии (intellectual development disorder with microcephaly and pontine and cerebellar hypoplasia, MICPCH), наследуемому по X-сцепленному доминантному типу и встречающемуся чаще у новорождённых девочек, тогда как для эмбрионов мужского пола мутации чаще фатальны или приводят к более тяжёлому фенотипу [Froyen et al., 2007; Moog et al., 2011; Hayashi et al., 2017; Najm et al., 2008; Moog et al., 2015].

Среди наиболее известных X-сцепленных рецессивных форм гипоплазии или атрофии мозжечка, наиболее известны редкие синдромы,

приводящие к психомоторной задержке с младенчества и отягощённые умственной отсталостью. Так одним из таких генов является *OPHN1*, приводящий к синдрому олигофренина-1, или синдрому задержки умственного развития (MRX60 или MRXSBL). Потеря функции гена *OPHN1* приводит к гипоплазии мозжечка и лобно-височной атрофии, и к изменениям в гиппокампе в результате нарушения Rho-ГТФаза-зависимой передачи сигналов необходимой для миграции и морфогенеза клеток мозга, созревания синапсов и пластичности нейронов [Billuart et al., 1998; Fauchereau et al., 2003; Al-Owain et al., 2011; Schwartz et al., 2019].

### 1.1.2. Молекулярно-генетические механизмы

Мозжечок является центральным отделом головного мозга, который отвечает за моторные функции. Основные афферентные связи мозжечка поступают через нижние мозжечковые ножки с помощью восходящих волокон от нижних оливковых ядер продолговатого мозга и через средние мозжечковые ножки по моховидным волокнам моста. Эфферентные связи мозжечка берут начало от его глубоких ядер и выходят через верхние мозжечковые ножки направляясь к таламусу и красному ядру [Ashizawa, Xia, 2016].

Мозжечок состоит из двух полушарий и червя. В глубине мозжечка, в центральной части, заполненной белым веществом, расположены ядра: зубчатое, пробковидное, шаровидное и ядро шатра. Основную массу серого вещества мозжечка составляет кора мозжечка, состоящая из трёх слоёв наружного (молекулярного), ганглионарного и зернистого (гранулярного) [Cerninara et al., 2015; Hull et al., 2022]. Молекулярный слой состоит из корзинчатых и звёздчатых нейронов, формирующих систему вставочных нейронов и передающих тормозные нервные импульсы в гранулярный слой. Ганглионарный слой состоит из клеток Пуркинье, клеток грушевидной формы, являющихся наиболее крупными клетками мозжечка. Клетки Пуркинье играют одну из важнейших ролей в функциях мозжечка,

большинство генов, связанных с патологией мозжечка, имеет высокий уровень экспрессии именно в данном типе клеток. В зернистом слое наибольшее число представлено мелкими многочисленными нейрональными клетками, гранулярными (зерновидными) клетками, которые являются посредниками между моховидными волокнами и клетками Пуркинье. Также в зернистом слое содержатся большие звёздчатые нейроны, поддерживающие связи между клетками коры мозжечка и способные блокировать поступающие импульсы от моховидных волокон, и ветвенообразные горизонтальные клетки, отправляющие информацию в белое вещество. Между слоями находятся клетки Луагро, сенсорные интернейроны мозжечка, выполняющие связь с множеством нейронов во всех слоях коры мозжечка.

Все гены, дефекты которых приводят к патологии мозжечка, высоко экспрессируются в клетках мозжечка на определённом этапе онтогенеза. Большая часть генов, связанных с мозжечковыми атаксиями, экспрессируется в клетках Пуркинье, например *PNPLA6*, *GBA2*, *GRID2* и другие [Moser et al., 2000; Marques et al., 2015; Takeo et al., 2021; Нохха et al., 2018]. Часто выраженная экспрессия генов отмечена не только в мозжечке, но и в других отделах мозга, в частности коре больших полушарий, что характерно для генов, вызывающих умственную отсталость в сочетании с гипоплазией мозжечка, например, гены *MEPC2* и *OPHN1* [Amir et al., 1999; Marano et al., 2021; Billuart et al., 1998; Govek et al., 2004]. Некоторые гены имеют повсеместную экспрессию, например, ген *RUBCN*, *COQ8A* и *POLG*, мутации в таких генах часто приводят к комплексным мультисистемным заболеваниям [Karushesky et al., 2010; Ершова, и др., 2018]. Однако иногда, несмотря на повсеместную экспрессию, основной областью локализации патологии остаётся мозжечок, тогда как остальные органы и ткани остаются не поражёнными, что свидетельствует об определённых молекулярно-генетических механизмах, характерных для клеток мозжечка и отличных от других областей мозга и других органов и тканей. Так среди большого числа генов, вовлечённых в патогенез мозжечковых атаксий, можно выделить общие

молекулярно-генетические процессы и функции. Стоит отметить, что гены, приводящие к аутосомно- и X-сцепленные доминантным и рецессивным мозжечковым патологиям, могут быть вовлечены в одни и те же биологические пути, более того, для ряда генов известны несколько форм заболеваний с разными типами наследования, поэтому в обзоре будут рассмотрены гены, вне зависимости от типа наследования. Так, гены, связанные с мозжечковыми атаксиями, вовлечены в процессы: синтеза и репарации ДНК, транскрипции и трансляции, поддержания и жизнедеятельности мембран клетки, поддержания липидного и ионного гомеостаза, обеспечения энергетических затрат клетки, формирования цитоскелета, роста нейрональных отростков, образования синапсов и передачи нейрональных импульсов.

Гены, продукты которых локализованы в ядре клеток, участвуют в синтезе и репарации нуклеиновых кислот. В репликации ДНК участвует репликационный фактор С, кодируемый геном *RFC1*, мутации в этом гене встречаются примерно в 25% спорадических случаев атаксий, дефицит гена приводит к синдрому мозжечковой атаксии, невропатии и везикулярной арефлексии [Cortese et al., 2019]. *RFC1* также необходим для репарации ДНК [Majka et al. 2004]. В репарацию ДНК также вовлечены и другие гены, связанные с наиболее распространёнными аутосомно-рецессивными патологиями мозжечка. Так, ген *ATM*, мутации в котором ведут к атаксии телеангиэктазии, участвует во многих клеточных процессах, одним из которых является инициация репарации пострепликативной ДНК и регуляция клеточного цикла [Shiloh et al., 2001; Stracker et al., 2013; Ceccaldi et al., 2016]. Гены апратаксина *APTX*, сентаксина *SETX*, полинуклеотид киназа 3'-фосфатазы *PNKP* и белка *XRCC1*, мутации в которых приводят к окуломоторным атаксиям 1, 2, 4 и 5-го типа, также вовлечены в репарацию ДНК [Yoon, Caldecott, 2018; Moreira et al., 2004; Bras et al., 2015; Hoch et al., 2017; O'Connor et al., 2018]. *APTX* необходим для репарации одиночных разрывов, его функция заключается в удалении аденозинмонофосфата (АМФ)

с 5'-концевых разрывов ДНК, а также необходим для редактирования ДНК последовательности при возникновении ошибок, затрудняющих лигирование комплементарных цепей во время репликации ДНК [Ahel et al., 2006; Yoon, Caldecott, 2018]. SETX является ДНК/РНК хеликазой, обеспечивая стабилизацию нуклеиновых кислот, необходимую для репарации [Moreira et al., 2004]. PKNP катализирует образование 5'-фосфатных/3'-гидроксильных концов в области одноцепочечных и двуцепочечных разрывов ДНК [Jilani et al. 1999; Bernstein et al., 2005]. Последующее лигирование одноцепочечных разрывов происходит с помощью комплекса лигазы III, в который входит белок XRCC1 [Caldecott et al., 1994].

Гены *ATXN1*, *ATXN2* и *TBP*, подверженные экспансии повторов при SCA, важны на стадиях транскрипции и трансляции, выполняют множество функций, детали которых до конца не раскрыты. Предполагается их роль в качестве транскрипционных факторов, в сплайсинге и стабилизации РНК, активации трансляции и стабилизации белков [Tejwani et al., 2020; Olmos et al., 2022; Egorova, Vezprozvanny, 2019; Lee et al., 2018]. В недавней работе показано, что *XRCC1* необходим во время транскрипции для защиты от токсичной активности сенсорного белка одноцепочечного разрыва PARP1 [Adamowicz et al., 2021]. Другой пример: ген транскрипционного фактора *MEPC2*, связанный с синдромом Ретта, играет важную роль в развивающемся мозге в нейрональных клетках-предшественниках, участвует в регуляции многих генов, а также обеспечивает ДНК метилирование в области L1 ретротранспозонов. Отсутствие данного фактора приводит к неконтролируемому распространению L1 и гибели клеток [Amir et al., 1999; Muotri et al., 2010; Yu et al., 2001].

Нейрональные ткани являются одними из наиболее высоко энергозатратных в организме, в связи с этим митохондрии, как энергетические станции клеток, играют важнейшую роль в обеспечении энергетических потребностей. Более четырёх десятков генов, связанных с патологиями

мозжечка, вовлечены в митохондриальную работу, из которых примерно в половине генов мутации известны при аутосомно- и X-сцепленных рецессивных мозжечковых атаксиях [Beaudin et al., 2022]. Большинство генов, связанных с развитием и патологиями мозжечка и вовлечённых в обеспечение функциональной активности митохондрий, кодируются в ядерной ДНК, в том числе и гены, обеспечивающие репликацию, транскрипцию и репарацию митохондриальной ДНК. К ним относятся гены: каталитической субъединицы митохондриальной полимеразы гамма *POLG*, мерцающей мтДНК хеликазы *TWINK*, апратаксина *APTX*, тирозил-ДНК фосфодиэстеразы *TDPI* и др. [Lax et al. 2012; Schulte et al., 2009; Peter et al., 2020; Ahel et al., 2006; El-Khamisy et al., 2005]. Внутренняя митохондриальная мембрана содержит трансмембранные белковые комплексы, представляющие собой дыхательную цепь переноса электронов. Дыхательная цепь имеет типичное строение во всех клетках организма и состоит из IV комплексов: НАДН-дегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, убихинол-цитохром с-оксидоредуктазы и цитохром с оксидазы. Так, например, ген коэнзима Q8A (*COQ8A* или *ADCK3*), имеющий повсеместную экспрессию, приводит к первичному дефициту коэнзима Q10 с выраженной мозжечковой атаксией, SCAR9 [Lamperti et al., 2003; Lagier-Tourenne et al., 2008; Traschütz et al., 2019]. В сборке дыхательного комплекса IV, цитохром С оксидазы, принимает участие фактор COX20, имеющий также повсеместную экспрессию. Мутации в гене *COX20* приводят к недостаточности дыхательного комплекса и тяжёлому комплексному заболеванию, включающему атрофию мозжечка [Szklarczyk et al., 2013; Dong et al. 2021]. Также в сборке дыхательного комплекса IV принимает участие фактор COA7, дефицит которого вызывает врождённую медленно прогрессирующую спиноцеребеллярную атаксию с аксональной невропатией-3 (SCAN3) [Higuchi et al., 2018]. Дыхательные комплексы имеют в своём составе железо-серные кластерные белки, необходимые для переноса электронов. Нарушение синтеза этих белков является одной из причин мозжечковых атаксий. В синтезе Fe-S кластеров участвует белок фратаксин,

кодируемый геном *FXN*, дефицит которого вызывает изменения в сборке респираторного суперкомплекса и нарушение окислительного фосфорилирования и является причиной наиболее распространённой аутосомно-рецессивной атаксии Фридрейха [Doni et al. 2021; Lynch, Farmer, G, 2021]. Включение железа в кластерные белки осуществляется при участии трансмембранного белка ABCB7, вызывающего мозжечковую атаксию и сидеробластную анемию [Pearson, Cowan, 2021].

Поддержание липидного гомеостаза в клетках необходимо для развития и функционирования мозжечка. Наиболее известны около двух десятков генов, вовлечённых в поддержание липидного гомеостаза в клетках мозжечка, дефекты которых приводят к различным патологиям мозга, включающим гипоплазию или атрофию мозжечка [Zhao et al., 2022; Stenson et al., 2003; Stenson et al., 2020]. Большая часть из этих генов экспрессируется в клетках Пуркинью, а кодируемые ими белки локализованы в основном в эндоплазматическом ретикулуме, реже в аппарате Гольджи, лизосомах, митохондриях и липидных каплях [Jacquemyn et al., 2017; Stevenson et al., 2016]. Некоторые имеют экспрессию в гранулярных клетках (*SRD5A3*), олигодендроцитах (*ELOVL4*) и микроглии (*ABHD12*, *NPC1*). Продукты генов (*PNPLA6*, *ABHD12*, *GBA2*, *ELOVL4*, *ELOVL5*, *RUBCN*, *FA2H*), расположенные в эндоплазматическом ретикулуме клеток, вовлечены в липогенез или липолиз. Так, например, *PNPLA6* и *ABHD12* кодируют ферменты для гидролиза лизофосфатидилхолина [van Tienhoven et al., 2002; Quistad et al., 2003; Sunderhaus et al., 2019; Blankman et al., 2007; Blankman et al. 2013]. *ABHD12* также необходим для гидролиза эндоканнабиноидного нейротрансммиттера 2-арахидоноилглицерина [Blankman et al., 2007; Blankman et al. 2013]. А фермент *FA2H* катализирует гидроксилирование сфинголипидов [Alderson et al., 2004; Guo et al., 2012]. *GBA2* представляет собой глюкоцереброзидазу, расположенную в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи, которая гидролизует глюкозилцерамид до глюкозы и церамида [Yildiz et al., 2006; Boot et al., 2007]. Мутации в этих генах приводят

к различным типам спастических атаксий и параплегий. В синтезе очень длинных цепей жирных кислот участвуют белки: ELOVL5, катализирующая в основном полиненасыщенные жирные кислоты с 18–20 атомами углерода, и ELOVL4, катализирующая как насыщенные, так и полиненасыщенные жирные кислоты с 20–26 атомами углерода. Дефицит данных генов вызывает SCA34 и SCA38 [Ohno et al., 2010; Agbaga et al., 2008; Moon et al., 2009; Di Gregorio et al., 2014; Agbaga et al., 2018]. Несколько генов (*ANO10*, *TMEM30A* и *ATP8A2*), кодирующих трансмембранные белки, необходимы для процесса скремблирования липидов, их дефицит вызывает нарушение бислоя липидов в плазматической мембране [Vermeer et al., 2010; Nanetti et al., 2019; Yang et al., 2018; Kodigepalli et al., 2015; Onat et al., 2013]. Транспорт различных липидов и фосфолипидов обеспечивают продукты генов *VPS13D*, *SNX14*, *SCYL1*, нарушение функций которых приводит к SCAR4, 20 и 21, соответственно [Velayos-Baeza et al., 2004; Lang et al., 2015; Jackson et al., 2016; Su et al., 2009; Afonso et al., 2018; Schmidt et al., 2015; Shohet et al., 2019]. В транспорт холестерина и сфинголипидов вовлечён ген *NPC1*, связанный с Болезнью Ниманна–Пика типа C [Vanier, 2010; Wheeler et al., 2019].

Многие гены, связанные с аутосомно-рецессивными мозжечковыми атаксиями с ранним началом вовлечены в процессы аутофагии. Аутофагия является процессом утилизации клеткой внутренних компонентов (остатков органелл, белков, нуклеиновых кислот и т.д.). Так, например, в созревании аутофагосом участвуют гены *ATG5* и *ATG7*. Аутофагия-связанный белок *ATG5* обеспечивает формирование и удлинение фагофора вплоть до его созревания в аутофагосому, для его активации необходим *ATG7*, катализирующий образование комплексов *ATG8-LC3* и *ATG5-ATG12* системы сопряжения [Komatsu et al. 2007; Hu, Reggiori, 2022]. В клетках Пуркиньи нокаут генов *Atg5* или *Atg7* приводит к ингибированию аутофагии, накоплению мембранных структур, аксонопатии и дистрофии нейронов [Komatsu et al. 2007; Nishiyama et al., 2007]. Мутации в генах *ATG5* и *ATG7* найдены в единичных случаях и приводят к SCAR25 и SCAR31 с ранним

началом [Kim et al., 2016; Collier et al., 2021]. Другой пример, ген *TPP1*, кодирующий лизосомальную пепстатин-нечувствительную протеазу, мутации в этом гене встречаются чаще и приводят к заболеваниям SCAR7 и восковидному липофусцинозу нейронов 2 типа [Breedveld et al., 2004; Bessa et al., 2008; Sun et al., 2013; Dy et al., 2015]. Ещё один пример, ген *STUB1*, мутации в котором приводят к SCAR16 и SCA48, кодирует белок E3 убиквитин лигазу, отбирающий неправильно свернутые белковые субстраты для протеасомной деградации [Zhang et al., 2005; Min et al., 2008; Coccozza et al., 2020].

Большая часть генов, дефекты которых выявлены при различных мозжечковых атаксиях, участвуют в росте и развитии, миграции нейрональных предшественников. Формирование внутренней структуры цитоскелета необходимо как для поддержания правильной формы клеток, так и расположения органелл. Так ген *SYNE1* играет важную роль в поддержании положения ядра в клетке, участвуя в формировании линкер-комплекса нуклеоскелета и цитоскелета (ЛИНК) [Gros-Louis et al., 2007]. Мутации в этом гене известны для SCAR8, клиническая картина которого сильно варьирует от чистой мозжечковой атаксии до тяжёлого мультисистемного синдрома [Synofzik et al., 2016]. Другой пример, ген *SPTBN2*, кодирующий  $\beta$ III-спектрин, который вместе с другими белками формирует сеть цитоскелета клетки, и связан с внутриклеточным транспортом, аппаратом Гольджи и динамикой цитоплазматических везикул, и также имеет важное значение для формирования суженной формы шейки нейронального отростка, дендритного шипика [Efimova et al., 2017]. При отсутствии  $\beta$ III-спектрина шипик теряет форму, что вызывает чрезмерное постсинаптическое возбуждение, мутации в этом гене приводят как к аутосомно-доминантной форме SCA5 с поздним началом, так и аутосомно-рецессивной форме SCAR14 с ранним началом [Efimova et al., 2017; Ikeda et al., 2006; Lise et al., 2012].

За формирование нейрональных отростков также отвечают рецепторы, расположенные на пресинаптической и постсинаптической поверхности

нейрональных контактов. Большинство генов, нарушения в которых связаны с мозжечковыми атаксиями, экспрессируются в самых крупных нейронах мозжечка, клетках Пуркинье. Клетки Пуркинье имеют большую сеть дендритных отростков, образующих глутаматные синапсы с гранулярными клетками. Аксональные отростки клеток Пуркинье иннервируют глубокие ядра мозжечка, в качестве нейротрансмиттера используют гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК). При мозжечковых атаксиях мутации иногда встречаются в глутаматных рецепторах, расположенных на постсинаптической мембране дендритных отростков клеток Пуркинье. Функции рецепторов многочисленны, они участвуют в росте нейрональных отростков и формировании синапсов, передаче нейрональных импульсов, моторных функциях, обучении и памяти. На настоящий момент известно несколько генов глутаматных рецепторов, мутации в которых вызывают мозжечковую атаксию: *GRID2*, *GRM1* и *GRIA3*. Патологии, связанные с дефектами перечисленных генов, крайне редкие. Однако наиболее известным при мозжечковых атаксиях является ген *GRID2*, кодируемый им глутаматный рецептор дельта, расположенный на постсинаптической мембране, способствует образованию новых синапсов дендритных отростков, взаимодействуя с рецептором нейрексином 1 (*NRXN1*), расположенным на пресинаптической мембране гранулярных клеток [Matsuda et al., 2010; Uemura et al. 2010; Elegheert et al., 2016]. Дефекты гена *GRID2* встречаются крайне редко, чаще всего область гена *GRID2* подвергается делециям, приводящим к усечению белка, приводя к гипоплазии мозжечка и SCAR18 [Utine et al., 2013; Hills et al., 2013; Maier et al., 2014]. *GRM1* кодирует метаботропный глутаматный рецептор I, осуществляющий медленную постсинаптическую проводимость в разных отделах мозга и в большом количестве обнаруженный в синапсах между клетками Пуркинье и параллельными волокнами, играющий важную роль в синаптической пластичности, моторных функциях и памяти, мутации в данном гене приводят к SCAR13 и SCA44 [Guerguelcheva et al., 2012; Watson et al., 2017]. Также в одной семье найдена мутация в гене

ионотропного глутматного рецептора *GRIA3*, дефекты которого ранее известны при X-сцепленной рецессивной умственной отсталости [Gécz et al., 1999; Namanaka et al., 2022]. В недавнем опубликованном исследовании найден миссенс вариант в гене *GRIA3*, который в сочетании с когнитивными нарушениями также стал причиной миоклонической эпилепсии и гипоплазии мозжечка [Rinaldi et al., 2022].

Важную роль в формировании моторных функций играют гены трансмембранных ионных каналов, обеспечивающие внутриклеточный ионный гомеостаз в покое и при передаче сигнала. Нарушения в этих генах найдены как при аутосомно-рецессивных, так и при аутосомно-доминантных формах мозжечковых атаксий. Наиболее известными генами, связанными с аутосомно-доминантными SCA, являются калиевые потенциал-зависимые каналы *KCNC3* и *KCND3*, субъединицы кальциевого потенциал-зависимого канала *CACNA1A* и *CACNA1G*, канал транзиторного рецепторного потенциала *TRPC3* и инозитол-1,4,5-трифосфатный рецептор *ITPR1* [Klockgether et al., 2019]. При аутосомно-рецессивных заболеваниях наиболее известны гены  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого хлоридного канала *ANO10*, кальций-независимого синаптоагмина *SYT14*, натрий-водородного антипортера *SLC9A1* и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазные помпы *ATP2B2* и *ATP2B3*. Ген *ANO10* играет двойную роль в качестве  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого хлоридного канала и фосфолипидной скрембалазы [Schreiber et al., 2020; Bushell et al. 2019; Schreiber et al. 2010; Tian et al., 2012], мутации в этом гене являются одной из распространённых причин редких аутосомно-рецессивных мозжечковых атаксий [Vermeer et al., 2010; Balreira et al., 2014; Nanetti et al., 2019].

### **1.1.3. Врождённые атаксии без когнитивных нарушений**

Атаксия с ранним началом, вызванная гипоплазией или атрофией мозжечка, — редкая гетерогенная группа заболеваний, проявляющаяся задержкой двигательного развития с младенческого возраста и нарушениями координации. В большинстве случаев врождённые аутосомно- и X-

сцепленные рецессивные атаксии сопровождаются умственной отсталостью и поражением других органов и тканей, тогда как при более позднем развитии патологии умственная отсталость менее выражена [Wassmer et al., 2003; Poretti et al., 2014]. В настоящий момент всего в нескольких опубликованных статьях описаны врождённые патологии, наследуемые по аутосомному или X-сцепленному рецессивному типу, обусловленные гипоплазией мозжечка в эмбриональный период, приводящие к нарушениям координации без умственной отсталости. Так для аутосомно-рецессивного типа наследования известны несколько спинномозжечковых атаксий (SCAR6, SCAR19 и SCAR24), при которых у пациентов не было отмечено когнитивных нарушений. Однако перечисленные заболевания имеют ряд симптомов, отличающих их клиническую картину от врождённых мозжечковых патологий, исследуемых в данной работе.

Наибольшее сходство из перечисленных заболеваний с симптомами случаев мозжечковой атаксии, исследуемых в данной работе, имеет SCAR6, описанная в одной Норвежской семье, в которой у 7 индивидов наблюдалась с младенчества моторная задержка без когнитивных нарушений и имела непрогрессивное течение заболевания [Kvistad et al., 1985]. Однако отличительным признаком являлось наличие низкорослости и плоскостопия у пациентов из Норвегии. На настоящий момент нет данных о дефектном гене в данной семье, однако установлен генетический локус сцепления 19.5-сМ в хромосомной области 20q11-q13, между маркерами D20S471 и D20S119 [Tranebjaerg et al., 2003].

Заболевание SCAR19, известное как Синдром Лихтенштейна-Кнорра, отличается сильным прогрессирующим характером в сочетании с мозжечковой атаксией, нейросенсорной тугоухостью и полинейропатией, начало заболевания варьирует от младенчества до ранней взрослости и связано с мутациями в гене *SLC9A1* [Guissart et al., 2015; Iwama et al., 2018]. Ген *SLC9A1* кодирует трансмембранный  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  антипортер (NHE1), играющий

значительную роль в поддержании внутриклеточного гомеостаза pH и объёма клеток, а также участвующий в миграции клеток [Putney et al., 2002; Dong et al., 2021]. Дисфункция NHE1 в мозге вызывает прогрессирующую нейрональную дегенерацию и клеточную гибель вестибулярных и кохлеарных ядер и, особенно, глубоких ядер мозжечка, а нарушение гомеостаза pH эндолимфатического мешка вызывает тугоухость [Son et al., 2009; Guissart et al., 2015].

SCAR24 на данный момент описана только в одной китайской семье и вызвана гетерозиготными компаундными вариантами в гене *UBA5* [Duan et al., 2016]. Заболевания у двух родственных пациентов было отмечено с детства (5 и 8 лет) и характеризовалось задержкой роста, неустойчивой походкой, затруднённой речью и имело прогрессивное течение с возрастом. В возрасте 39 лет один из пациентов утратил способность передвигаться самостоятельно. Имели место следующие симптомы: атаксия, дизартрия, нистагм, и отличительным признаком от других обсуждаемых заболеваний было наличие катаракты у обоих пациентов. Ген *UBA5* кодирует убиквитин-подобный модификатор-активирующий фермент 5, который играет важную роль в посттрансляционной модификации белков и необходим для активации убиквитинового модификатора 1 (UFM1) и связанного с ним каскада [Habisov et al., 2016; Nahorski et al., 2018]. Однако большинство выявленных мутаций в гене *UBA5* приводят к аутосомно-рецессивной ранней младенческой эпилептической энцефалопатии 44-го типа (developmental and epileptic encephalopathy 44, DEE1), крайне тяжёлому заболеванию, приводящему к глобальной задержке развития, микроцефалии, энцефалопатии, тяжёлой умственной отсталости, отсутствию двигательных навыков, гипотонии, дистонии, спастичности, эпилепсии и другим нарушениям [Colin et al., 2016; Muona et al., 2016; Arnadottir et al., 2017; Mignon-Ravix et al., 2018; Low et al., 2018]. При МРТ у пациентов выявляются следующие изменения: атрофия и гипоплазия коры больших полушарий, мозжечка, истончение мозолистого тела, замедленная миелинизация и гиперинтенсивность белого вещества.

Вероятно, случай в китайской семье с мозжечковой атаксией SCAR24 является частным случаем с более лёгкой формой заболевания.

Наиболее близкая клиническая картина к исследуемым в этой работе пациентам из большой бурятской семьи и малых семей была описана в одной датской семье с X-сцепленной спиналомозжечковой атаксией 1-го типа (SCAX1) [Bertini et al., 2000]. Заболевание SCAX1 у пациента из датской семьи было вызвано миссенс мутацией в гене *ATP2B3* (MIM: 300014), приводящей к аминокислотной замене G1107D в транспортёре  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазе плазматической мембраны (PMCA3) [Zanni et al., 2012]. Затем тот же вариант был выявлен и в других семьях с врождённой мозжечковой атаксией, в связи с чем данный вариант имеет либо эффект основателя, либо является мутационной горячей точкой [Feuma et al., 2016; van der Ven et al., 2021]. Наибольшая экспрессия гена *ATP2B3* обнаружена в мозжечке, особенно в пресинаптических окончаниях параллельных волокон, гранулярных клетках, в клетках сосудистого сплетения и интернейронах [Saunders et al., 2018; Zanni et al., 2012; Burette A et al., 2007]. Продукт данного гена, PMCA3 обеспечивает активный транспорт ионов кальция из нейрональных клеток в межклеточное пространство [Lopreiato et al., 2014]. Мутация G1107D снижает способность PMCA3 поддерживать клеточный гомеостаз ионов кальция, ухудшая способность канала транспортировать кальций против градиента и противостоять обратному притоку ионов [Zanni et al., 2012]. В общей сложности, в гене *ATP2B3* выявлено не так много других вариантов, большинство из которых связаны с нарушением мозжечка в эмбриональный период [Calì et al., 2015; Vicario et al., 2017; Pergande et al., 2020; Zhai et al., 2021].

#### **1.1.4. Синдром мозжечковой атаксии, умственной отсталости и квадропедии**

Большинство врождённых заболеваний, при которых дефекты в генах приводят к гипоплазии или атрофии мозжечка в эмбриональный период

развития, как ранее было отмечено, отягощены умственной отсталостью. Однако в редчайших случаях описаны близкородственные семьи, в которых у пациентов выявлена редкая форма мозжечковой атаксии: синдром неравновесия (disequilibrium syndrome, DS или DES) или синдром мозжечковой атаксии, умственной отсталости и квадропедии (Cerebellar ataxia, mental rethardation with or without quadrupedal locomotion, CAMRQ). Отличительной особенностью данного синдрома является у большинства пациентов отсутствие способности к бипедальной локомоции и осуществление перемещения на всех четырех конечностях - квадропедия. Схожие фенотипы были описаны в нескольких близкородственных семьях из Турции [Türkmen et al., 2006; Ozcelik et al., 2008; Tan, 2006; Tan, 2007], Ирака [Valence et al., 2016] и семьи из Бразилии [Garcias, Roth, 2007], исследуемой в данной работе. Несмотря на близкую клиническую картину в ранее исследуемых семьях, эта форма нарушения развития нервной системы имеет гетерогенный характер и была вызвана мутациями в разных генах. К настоящему времени было описано шесть генов с мутациями, которые вызвали нарушение бипедальной локомоции, характеризующейся квадропедией: *VLDLR*, *RELN*, *CA8*, *WDR81*, *ATP8A2*, *TUBB2B*.

В гене рецептора липопротеинов очень низкой плотности *VLDLR* обнаружено наибольшее число мутаций, около двух десятков различных вариантов, связанных с синдромом CAMRQ1 [Moheb et al., 2008; Ozcelik et al., 2008; Al-Gazali et al., 2010; Ali et al., 2012; Schlotawa et al., 2013; Micalizzi et al., 2016; Valence et al., 2016; Capalbo et al., 2019; Wali et al., 2021]. В большинстве случаев у пациентов мутации в гене *VLDLR* приводят к понтомозжечковой гипоплазии и лиссэнцефалии. Степень нарушения бипедальной локомоции у пациентов различна и в некоторых случаях сохранена [Boycott et al., 2005; Boycott et al., 2009; Kolb et al., 2010; Giorgio et al., 2016]. Ген *VLDLR* является одним из рецепторов рилина, кодируемого геном *RELN*, играющего ключевую роль в миграции нейронов в развивающемся мозге [D'Arcangelo et al., 1999; Tissir et al., 2003; Moon et al., 2013; Nakamura et al., 2016; Di Donato et al.,

2018b]. Патогенные варианты в гене *RELN* вызывают лиссэнцефалию и понтомозжечковую гипоплазию [Hong et al., 2000; Armstrong et al., 2019], пациенты могут иметь фенотипически близкую, но более тяжёлую клиническую картину по сравнению с синдромом CAMRQ1 [Valence et al., 2016]. Важное участие в нейрональной миграции принимает ген *TUBB2B*, который кодирует бета-изоформу тубулина (бетта-тубулин 2В класса IIb), являющегося важным компонентом цитоскелета микротрубочек. Мутации в гене *TUBB2B*, наряду с дефектами вышеупомянутых генов, приводят к нарушению миграции нейронов и являются причиной лиссэнцефалии, пахигерии, полимикрогирии и мозжечковой дисплазии [Parrini et al., 2016; Di Donato et al., 2018a]. На настоящий момент, известен только один семейный случай, в котором миссенс мутация в гене *TUBB2B* была выявлена у трех пациентов с тяжёлой гипоплазией мозжечка и синдромом CAMRQ [Breuss et al., 2017].

Следующим генетическим локусом, связанным с синдромом *CAMRQ2*, является ген *WDR81* (WD Repeat Domain 81), имеющий высокую экспрессию в клетках Пуркинью и фоторецепторах и участвует в везикулярном транспорте и ингибировании аутофагии [Gulsuner et al., 2011; Liu et al., 2016; Reuter et al., 2017]. У пациентов с синдромом *CAMRQ2* наблюдается гипоплазия больших полушарий мозга, мозжечка и моста [Gulsuner et al., 2011], а в более тяжелых случаях отмечена микроцефалия или микролиссэнцефалия [Kalmár et al., 2021; Cavallin et al., 2017].

Дефект гена *CA8*, имеющего высокую экспрессию в развивающемся мозжечке и клетках Пуркинью, в одном исследовании был связан с синдромом *CAMRQ3* [Türkmen et al., 2009]. В других исследованиях, подтверждается вовлечение гена *CA8* в эмбриональное развитие мозга. Мутации в гене *CA8* в большинстве опубликованных случаев приводят к мозжечковой гипоплазии и атаксии с лёгкой умственной отсталостью или без когнитивных нарушений [Kaya et al., 2011; Najmabadi et al., 2011; Paternoster et al., 2020; Richmond et al.,

2020]. Ген *CA8* кодирует белок карбоангидразу VIII, который утратил свою ферментативную активность [Kato, 1990; Sjöblom et al., 1996], и, взаимодействуя с рецептором *ITPR1*, принимает участие в модуляции внутриклеточной передачи сигналов кальция в мозжечке [Hirota et al., 2003; Hirasawa et al., 2007]. Так как *ITPR1* является одним из основных регуляторов передачи сигналов апоптоза и аутофагии, то посредством ингибирования рецептора, *CA8* вероятно может модифицировать аутофагическую и апоптотическую активность в клетке [Hirota et al., 2003; Vicencio et al., 2009].

К синдрому *CAMRQ4* приводят мутации в гене *ATP8A2*, который кодирует аминокислотную флиппазу [Onat et al., 2013; Mohamadian et al. 2020], участвующую в перевороте фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина из экстраклеточного в цитоплазматический слой клеточных мембран для создания и поддержания асимметрии фосфолипидов [Zhu et al., 2012]. Асимметрия липидов в клеточных процессах важна для многих процессов, включая везикулярный транспорт, рост, развитие нейрональных отростков, формирование кривизны мембраны [Andersen et al., 2016; Lopez-Marques et al., 2014; Sebastian et al., 2012]. Накопление фосфатидилсерина в экстраклеточном слое клеточных мембран может служить маркером клеточной гибели и вызвать фагоцитоз [Fadok et al., 1992; Segawa et al., 2016]. В результате мутации p.Le376Met, найденной у пациентов с синдромом *CAMRQ4*, флиппаза *ATP8A2* утрачивает способность транспортировать фосфолипиды [Onat et al., 2013; Choi et al., 2019]. Мутации в гене *ATP8A2* также могут приводить к более тяжелому фенотипу, характеризующемуся энцефалопатией, умственной отсталостью, тяжелой гипотонией, хореей и атрофией зрительного нерва [McMillan et al., 2018; Martín-Hernández et al., 2016]. При более тяжелом фенотипе чаще происходит нарушение фолдинга белка и деградация [Choi et al., 2019]. Также известны и менее тяжелые случаи, при которых у пациентов наблюдаются лишь некоторые из клинических симптомов: мозжечковая атаксия или дистония,

умственная отсталость, атрофия зрительного нерва и др. [Guissart et al., 2020; Damásio et al., 2021; Heidari et al., 2021].

Несмотря на достаточно разные, на первый взгляд, функции, все гены, связанные с синдромом CAMRQ, имеют высокий уровень экспрессии в мозжечке в клетках Пуркинье, играющих важную роль в процессах обучения, памяти, равновесии и координации [Hull et al., 2022]. Экспрессия описанных ранее генов, связанных с синдромом CAMRQ, не ограничена мозжечком и выражена и в других отделах мозга, что соответствует патогистологическим изменениям мозга пациентов: понтомозжечковой гипоплазии и нарушению развития извилин коры больших полушарий, и иногда лиссенцефалии. Продукты, кодируемые генами, участвуют в развитии нейронов и модуляции их активности, и особенно важны в эмбриональный период. Мутации в этих генах, не всегда приводят к уникальному фенотипу, но все заболевания, вызываемые данными генами, приводят к нарушению мажорных изоформ кодируемых белков. Нельзя исключать, что на уникальность фенотипа могут оказывать влияние факторы внешней среды и особенности реабилитации пациентов в первые декады жизни. Так или иначе, мутации в описанных генах нарушают развитие мозжечка и коры больших полушарий мозга в эмбриональный период, приводя в большинстве случаев к психомоторной задержке развития, мозжечковой атаксии и умственной отсталости, которые в разной степени отягощены нарушением бипедальной локомоции.

В данной работе проведён полногеномный генетический анализ случая квадропедии с умственной отсталостью и полным отсутствием речи, обнаруженного в бразильской семье и выявлена новая генетическая причина синдрома CAMRQ и ее эволюционный вклад в прямохождение и развитие речи.

### 1.1.5. Современные методы генетических исследований

Развитие генетических технологий секвенирования играет основополагающую роль в развитии исследований генетических заболеваний и их диагностики [Shendure et al., 2017; Shendure et al., 2019]. Идентификация генетических причин моногенных заболеваний начинает развиваться в 1980х годах, в качестве основного метода, используя анализ сцепления и точного картирования в семьях с большими родословными [Claussnitzer et al., 2020]. Большой вклад внесла разработка первых способов секвенирования: в 1977 Аланом Максаном и Уолтером Гилбертом был опубликован метод «Секвенирование ДНК путём химической дегградации», и независимо, Фредериком Сенгером – «Секвенирование ДНК с цепь-терминальными ингибиторами» [Maxam et al., 1977; Sanger et al., 1977]. В последующем наибольшее распространение получил метод секвенирования по Сэнгеру, который был модифицирован и полностью автоматизирован. Принцип данного метода заключается в амплификации таргетного фрагмента ДНК с включением флюоресцентных дидеоксинуклеотид трифосфатов, приводящих к случайному обрыву цепи, и последующему разделению полученных ампликонов с помощью капиллярного электрофореза. Метод секвенирования по Сэнгеру нашел применение для идентификации генов, их последовательности и мутаций в генетическом локусе сцепления, выявленных в больших родословных, однако анализ был трудоёмким и не всегда удавалось определить гены и конкретные мутации в них [Hammans, 1996; Klockgether, J. Dichgans, 1997]. Метод секвенирование по Сэнгеру, на настоящий момент, остаётся одним из наиболее востребованных и часто используется для научных и лабораторно-диагностических задач, требующих проверки последовательности определённого небольшого фрагмента ДНК.

Секвенирование полной последовательности генома человека впервые было предпринято в рамках «Проекта Геном Человека» (The Human Genome Project, HGP). Для выполнения данного проекта было задействовано

множество лабораторий по всему миру. Проект официально был начат в начале 1980х годов. На создание первоначальной версии генома человека ушло более десяти – пятнадцати лет, которая была опубликована в 2001 году [Lander et al., 2001]. В последующие годы референсная последовательность дорабатывалась и была значительно улучшена [International Human Genome Sequencing Consortium, 2004; Schneider et al., 2017]. Создание референсной последовательности человеческого генома решило многие вопросы картирования генов и значительно упростило задачи по поиску патогенных мутаций. Одной из наиболее используемых версий стала версия GRCh37/hg19, для которой представлено значительное число данных и исследований, в связи с чем несмотря на появление новой версии GRCh38 остаётся широко используема (GCF\_000001405.25). Версия генома GRCh38, в которую были добавлены центромерные области и альтернативные последовательности для переменных областей, на данный момент, является также широко используемой [Schneider et al., 2017]. В 2022 году была опубликована самая последняя и полная версия референсной последовательности генома человека, в которой решена проблема с картированием сложных переменных повторяющихся регионов генома: центромерных сателлитных массивов, недавних сегментных дупликации и коротких плечей акроцентрических хромосом [Nurk et al., 2022].

В начале 2000х получило развитие клиническое микрочиповое тестирование [Vissers et al., 2003]. В основе данного метода лежит гибридизация исследуемых участков ДНК или РНК на специальные зонды, расположенные на микрочипах. Внедрение данной технологии позволило проводить анализ однонуклеотидных полиморфизмов по всему геному, выявлять микроструктурные хромосомные аномалии, также данная технология нашла применение для анализа экспрессии генов. На настоящий момент, данный метод продолжает широко использоваться в лабораторно-диагностических целях.

С появлением новых технологий массового параллельного секвенирования (next generation sequencing, NGS) появилась возможность поиска новых генетических дефектов по всему геному. В середине 2000х начале 2010х гг. были выпущены три наиболее успешные платформы, позволяющие прочесть геном человека с высокой точностью: платформа пиросеквенирования GS FLX 454 Life Science Inc./Roche, платформа циклического лигазного секвенирования SOLiD Applied Biosystems и платформа Illumina, в основе которой лежит технология секвенирования с помощью синтеза комплементарной цепи с использованием флуоресцентно меченных нуклеотидов. Первые две технологии не выдержали конкуренции с третьей ввиду высокой стоимости и сложности приготовления библиотек и уступали в получаемых сырых данных секвенирования. NGS секвенаторы Illumina получили распространение по всему миру. Принцип секвенирования заключается в следующем: исходная ДНК подвергается ультразвуковой фрагментации и к каждому фрагменту ДНК лигируются адапторы; с помощью адапторов происходит гибридизация и прикрепление фрагментов ДНК к поверхности проточной ячейки, на которой затем происходит их кластеризация и секвенирование за счёт синтеза комплементарной цепи и встраивания нуклеотидов с флуоресцентными метками. Необработанные чтения, получаемые на данной платформе, имеют высокое качество, однако длина чтений ограничена и невелика. Поэтому, в настоящее время, активно разрабатываются альтернативные подходы секвенирования, позволяющие получить более длинные чтения с достаточным качеством, но пока широкого применения не получили. Благодаря технологии массового параллельного секвенирования появилась возможность ресеквенировать полный геном человека в течение одной - двух недель, что поспособствовало появлению крупных проектов, целью которых было секвенирование сотен и тысяч геномов и экзоменов различных индивидов и создание больших баз данных, содержащих информацию по всем полиморфным однонуклеотидным вариантам и инделам, редким мутациям и структурным вариантам. Так,

например, одним из наиболее известных открытых ресурсов является Проект 1000 Геномов, включающий 2,5 тыс. клинически здоровых индивидов различных национальностей [1000 Genomes Project Consortium et al., 2016]. Другая база данных The Genome Aggregation Database (gnomAD) объединяет данные из нескольких проектов, в том числе Exome Aggregation Consortium (ExAC), включает данные по структурным вариантам для 10,847 тыс. геномов по версии сборки GRCh37 и данные по инделам и однонуклеотидным вариантам для 125,748 тыс. экзотов и 15,708 тыс. геномов по версии сборки GRCh37, а также 76,156 тыс. геномов по версии сборки GRCh38 [Karczewski et al., 2020; Karczewski et al., 2021].

Применение полногеномного секвенирования для рутинной диагностики является дорогостоящим и не доступно большинству пациентов. Для удешевления анализа используют таргетное параллельное секвенирование. Так, наиболее информативным из таргетных подходов является полноэкзомное секвенирование, позволяющее провести поиск генетического дефекта во всех белок-кодирующих последовательностях генов, которые составляют не более 1,5-2% от всего генома. Однако несмотря на значительное снижение получаемых данных при секвенировании, из-за необходимости таргетного обогащения библиотеки с помощью дорогостоящих зондов, данная технология также не является общедоступной. Альтернативой является таргетное секвенирование панелей генов кандидатов, известных для исследуемой патологии. Используются различные панели генов, включающие наиболее известные гены, связанные с наследственными заболеваниями, выбор которых зависит от диагноза пациента [Нужный и др., 2019]. Однако около двух третей пациентов с наследственными и спорадическими случаями атаксий остаются без точного диагноза, так как генетический дефект отсутствует в известных генах и, поэтому, не может быть выявлен при рутинном анализе [Klockgether et al., 2019; Jiao et al., 2020; Galatolo et al., 2021]. Другим ограничением идентификации патогенных вариантов является сложность в интерпретации NGS данных, в результате

которой не всегда удаётся установить генетическую причину патологии, ввиду биоинформатических ограничений программного обеспечения и отсутствия достаточной информации о многочисленных вариантах в геноме, большая часть из которых нейтральна, либо не связана с конкретным заболеванием. В связи с этим является важным поиск генетических причин редких заболеваний и разработка подходов биоинформатического анализа и интерпретации данных.

## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **2.1. Материалы исследования**

#### **2.1.1. Биологические образцы**

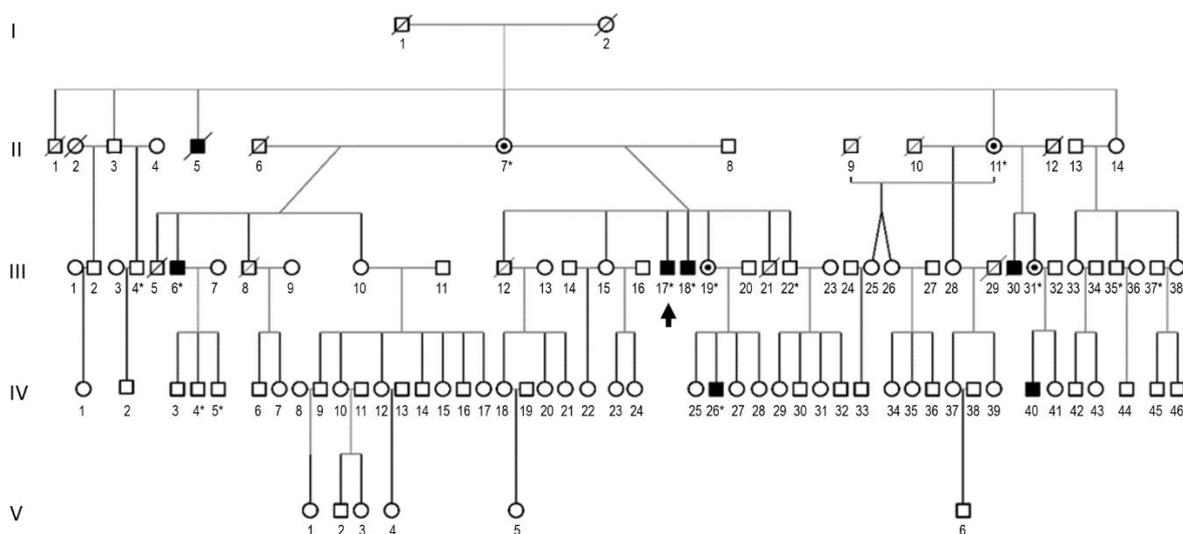
Материалами генетического исследования послужили биологические образцы ДНК и крови пациентов с гипоплазией мозжечка. Образцы ДНК и клиническое описание пациентов большой бурятской семьи и малых (ядерных) семей (Московской и трёх Северо-Кавказских) с мозжечковой атаксией были получены из Научного Центра Неврологии. Образцы крови были получены ранее от пациентов с синдромом мозжечковой атаксии, умственной отсталости и квадропедии из близкородственной семьи, проживающей в Бразилии. Информированные согласия были получены от всех индивидов или их опекунов, участвующих в генетическом исследовании. Генетические исследования были одобрены Этическим Комитетом Научного Центра Неврологии и Этическим Комитетом Института Общей Генетики им. Н.И. Вавилова Российской Академии Наук.

#### **2.1.2. Клиническое описание пациентов**

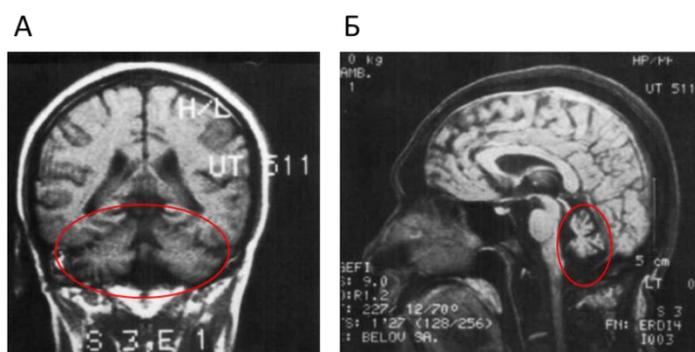
##### **2.1.2.1. Большая бурятская семья**

Большая бурятская семья (АХ) представлена родословной в 5 поколений, в которой у некоторых индивидов мужского пола диагностирована

врождённая мозжечковая атаксия (Рисунок 1) [Иллариошкин С. Н., 1997; Illarioshkin et al., 1996]. У всех пациентов из этой семьи были выявлены следующие неврологические симптомы: сильная задержка моторного развития, дизартрия, атаксия конечностей и туловища, нистагм, офтальмоплегия и повышение сухожильных рефлексов (Таблица 1 Приложения). Течение заболевания было непрогрессирующим. Исследуемые пациенты не были способны сидеть без опоры до 15 месяцев, самостоятельно ходить до 7 лет. Пациенты начинали говорить первые слова не ранее 4 лет. Нарушений памяти и когнитивных функций у пациентов не было выявлено. Магнитно-резонансная томография (МРТ) выявила гипоплазию полушарий мозжечка и червя (Рисунок 2). Признаков сидеробластной анемии или болезни меди выявлено не было. Гематологические исследования, проведённые у пациента (АХ-III-18), не выявили аномалий эритропоэтических клеток или накопления гранул железа. Показатели общего анализа крови были в норме: гемоглобин – 149 г/л (норма 130-180 г/л), цветовой показатель – 1,0 (норма 0,80-1,05), СОЭ – 3 мм/ч (норма 0-15 мм/ч) и количество лейкоцитов в пределах нормы. Все биохимические показатели были в пределах нормы, за исключением незначительно повышенного уровня билирубина – 14,5 мг/л (норма 5-12 мг/л). Анализ мочи – без отклонений.



**Рисунок 1.** Родословная бурятской семьи (АХ) [Шариошкин et al., 1996]. Квадратные символы обозначают индивидов мужского пола, круглые символы – индивидов женского пола. Сплошными символами обозначены пациенты с диагнозом мозжечковой атаксии; символы с точками – облигатные гетерозиготные носители; прозрачные символы – здоровые индивиды; перечеркнутые символы – индивиды, умершие до момента исследования. Полногеномное секвенирование выполнено для пациента, обозначенного стрелкой; звёздочкой обозначены индивиды, для которых было проведено генотипирование кандидатных локусов.

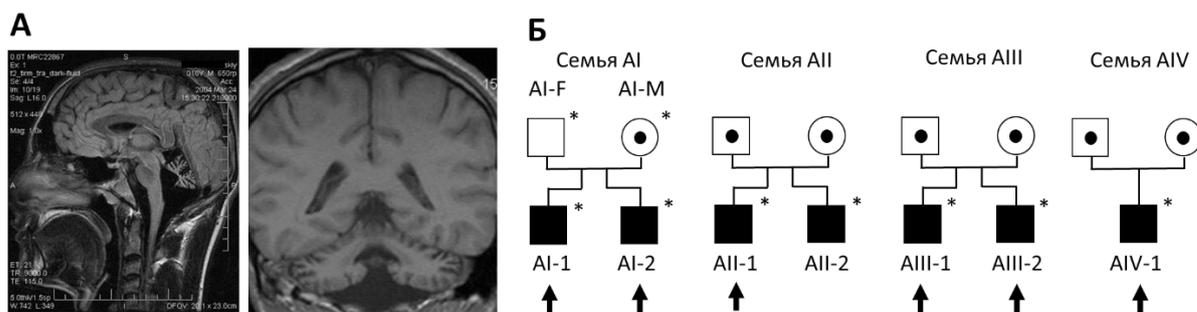


**Рисунок 2.** Снимки магнитно-резонансной томографии головного мозга пациента АХ-III-30 [Шариошкин et al., 1996]. А – Корональное Т1-взвешенное изображение, выявлена гипоплазия полушарий и червя мозжечка, вследствие чего также наблюдается увеличение четвёртого желудочка и большой цистерны. Б – Срединно-сагитальное Т1-взвешенное изображение, выявлена

гипоплазия каудального червя и парамедианных зон полушарий мозжечка, расширение борозды в переднем верхнем черве, увеличение четвёртого желудочка и большой цистерны и небольшое истончение верхней части покрышки ствола мозга, также наблюдается умеренное расширение борозд в латеральных отделах полушарий головного мозга.

### **2.1.2.2. Московская семья**

В Московской семье (AI) оба брата, AI-1 и AI-2, имели речевую и моторную задержку развития с младенчества (Таблица 2 Приложения, Рисунок 3) [Protasova et al., 2022]. С раннего возраста отмечались нарушения координации и плавности движений. Речь была замедленной и скандирующей. Течение заболевания у обоих больных было непрогрессирующим. Однако после тяжёлой вирусной инфекции в возрасте 15 лет у пациента AI-2 появился тремор рук, туловища и головы. При неврологическом обследовании обоих пациентов в возрасте 33 и 23 лет были выявлены следующие симптомы: дизартрия со скандирующей речью, мышечная гипотония, дискоординация конечностей, интенционный тремор, положительная проба Ромберга, самостоятельная атаксическая походка на широком основании. У младшего брата, пациент AI-2, также отмечался выраженный осцилляторный тремор рук, туловища и головы. При МРТ была выявлена выраженная гипоплазия полушарий и червя мозжечка (Рисунок 3А). Исследования нервной проводимости с помощью стимуляционной электронейромиографии (ЭНМГ) показали генерализованное сенсомоторное поражение демиелинизирующего типа.



**Рисунок 3.** Семьи с мозжечковой атаксией. А – Снимки магнитно-резонансной томографии головного мозга пациента AI-1, показана выраженная гипоплазия червя мозжечка и полушарий. Б – Родословные семей AI-IV. Квадратные символы обозначают индивидов мужского пола, круглые символы – индивиды женского пола. Звёздочкой обозначены индивиды, для которых проведён генетический анализ; стрелками обозначены индивиды, для которых проведено полноэкзомное секвенирование.

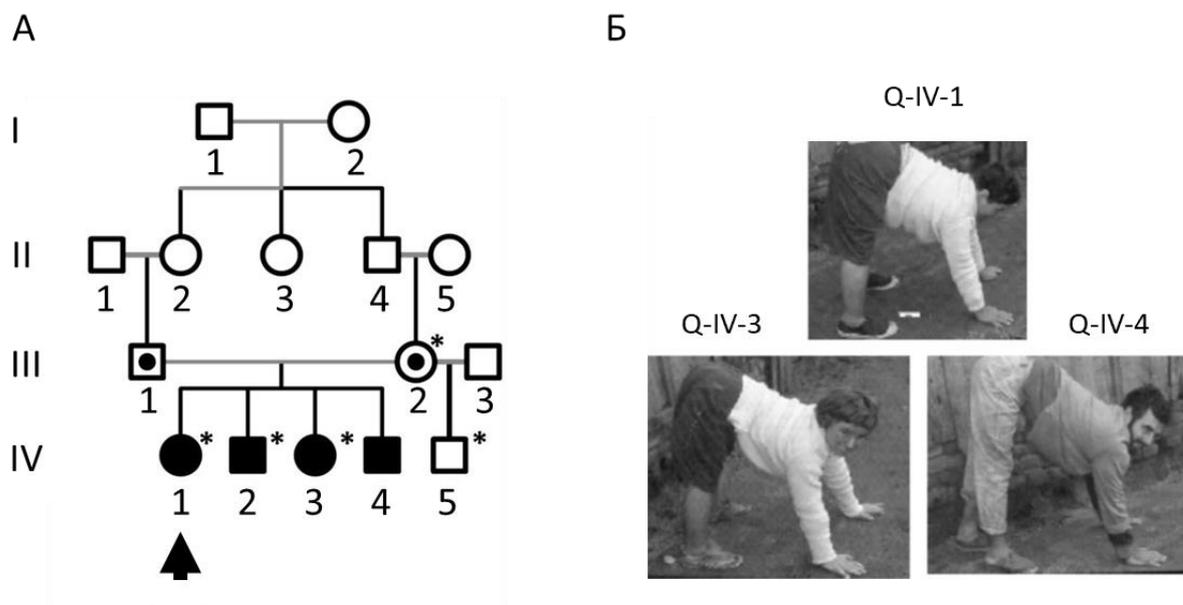
### 2.1.2.3. Северо-Кавказские семьи

В семьях AII и AIII (Рисунок 3Б) раннее развитие исследуемых пациентов (AII-1, AII-2, AIII-1 и AIII-2) было нормальным [Protasova et al., 2022]. Возраст дебюта заболевания варьировал от 8 до 17 лет (Таблица 2 Приложения). Первыми симптомами заболевания были шаткость при ходьбе, нарушение координации и смазанность речи. У больного AII-1 при неврологическом обследовании в возрасте 14 лет выявлен горизонтальный нистагм, нарушение координации и дисдиадохокинез, интенционный тремор правой руки, неустойчивость в пробе Ромберга и атаксическая походка без опоры. У больных AIII-1 и AIII-2 при неврологическом обследовании в возрасте 22 и 20 лет выявлен ротаторный нистагм, дизартрия с неразборчивой речью, нарушение координации и дисдиадохокинез в конечностях (руки и ноги поражены в равной степени), положительная проба Ромберга и неустойчивая походка без поддержки. У всех обследованных пациентов при МРТ была выявлена гипоплазия полушарий и червя мозжечка. Нарушений интеллекта у пациентов не выявлено.

Пациент AIV-1 был болен с рождения: на первом-втором году жизни отмечалась задержка физического развития, ходить начал примерно с 4-4,5 лет, с самого начала ходьба была неловкой, "спотыкающейся". Примерно с 6-7-летнего возраста состояние оставалось относительно стабильным. Обучение проходил в специальной школе-интернате. Обследование в Научном Центре Неврологии проходил в третьей декаде жизни (возраст 20 с небольшим лет). При неврологическом осмотре были выявлены следующие симптомы: дизартрия, атаксия туловища при стоянии и ходьбе, негрубая дискоординация при выполнении динамических проб в руках. Пациенту был поставлен диагноз – врождённая гипоплазия мозжечка. Клинически значимые когнитивные нарушения не были установлены.

#### **2.1.2.4. Бразильская семья**

В результате близкородственного брака между двоюродными братом и сестрой (матери пациентов Q-III-2) родились четыре индивида (Q-IV-1, Q-IV-2, Q-IV-3, Q-IV-4) с неврологической патологией (Рисунок 4) [Garcias, Roth, 2007]. У всех пациентов (две женщины и двое мужчин) отмечалось отсутствие способности ходить без опоры – квадропедия (передвижение на всех четырёх конечностях) на протяжении всей жизни, неспособность поддержания позы стоя без опоры, расходящееся косоглазие, судороги (Таблица 3 Приложения). Из внешних признаков у пациентов присутствовали гирсутизм, грубые черты лица, короткие и маленькие кисти и стопы, небольшой рост. Вторичные половые признаки без нарушений. Все пациенты имели тяжелую форму умственной отсталости и не были способны говорить. Однако они демонстрировали дружелюбное поведение по отношению к другим людям и не проявляли признаков аутизма. У пациентов есть здоровый сводный брат (Q-IV-5) от второго некровного брака матери.



**Рисунок 4.** Бразильская близкородственная семья (Q). А – родословная семьи Q в четыре поколения (I - IV). Полногеномное секвенирование выполнено для пациента, обозначенного стрелкой. Квадратные символы обозначают индивидов мужского пола, круглые символы – индивиды женского пола. Сплошные символы обозначают больных индивидов; символы с точками – облигатные гетерозиготные носители, родители пациентов; прозрачные символы – здоровые индивиды; звёздочки – индивиды, для которых было проведено генетическое исследование. Б – фотографии пациентов, использующих для перемещения верхние и нижние конечности (квадропедия) [Garcias, Roth, 2007].

## 2.2. Методы генетического анализа ДНК

### 2.2.1. Выделение ДНК из крови и оценка качества

Выделение ДНК проводилось из периферической крови с помощью набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Хильден, Германия) согласно протоколу производителя. Качество ДНК оценивалось с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле, для приготовления которого было взято 1,25 г агарозы (Amresco) и разведено в 125 мл буфера TAE (трис-ацетат 40 мМ, ЭДТА 1 мМ, рН 7,6). Электрофорез ДНК проводился в течение 40 мин

при напряжении 100 В и силе тока 180 мА с использованием источника питания Эльф-4 (ДНК-Технология, Москва, Россия). Для определения длины фрагментов выделенной ДНК использовался маркер с длиной фрагментов от 250 п.н. до 10 000 п.н. фирмы GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США). Измерение концентрации ДНК проводилось с помощью спектрофотометра NanoDrop One<sup>c</sup> (Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США) и флуориметра Qubit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США).

### **2.2.2. Приготовление библиотек ДНК и их массовое параллельное секвенирование**

Приготовление геномных библиотек проводилось из 2 мкг исходной ДНК с помощью набора Paired-End DNA Sample Prep Kit (Illumina, Калифорния, США) по протоколу производителя и включало следующие этапы: (1) фрагментация ДНК с помощью ультразвука на приборе Covaris; (2) восстановление липких концов фрагментов ДНК; (3) аденилирование фрагментов ДНК; (4) лигирование Illumina-адапторов к фрагментам ДНК; (5) ПЦР-обогащение библиотеки ДНК; (6) селекция библиотек ДНК по размеру в 2%-ном агарозном геле E-gel EX 2% Agarose (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США). Очистка продуктов на промежуточных этапах проводилась с помощью MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN, Хильден, Германия) по протоколу производителя. Очистка библиотек из агарозного геля проводилась с помощью MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN, Хильден, Германия).

Приготовление экзомных библиотек проводилось с помощью наборов TruSeq Exome kit (Illumina, Калифорния, США) и SureSelect Human All Exon V6 (Agilent Technologies, Калифорния, США) в разное время и в разных лабораториях. Приготовление библиотек из 200 нг ДНК с помощью наборов TruSeq Exome kit (Illumina, Калифорния, США) проводилось по протоколу производителя в коммерческой лаборатории Генетико. Приготовление

экзомных библиотек из 400 нг ДНК с помощью набора SureSelect Human All Exon V6 (Agilent Technologies, Калифорния, США) проводилось по протоколу производителя в лаборатории эволюционной геномики и включало следующие этапы: (1) фрагментацию тотальной ДНК до среднего размера фрагментов 150 п.н. с помощью ультразвука на ультрасоникаторе Covaris S2 (Covaris, Массачусетс, США); (2) восстановление липких концов фрагментов ДНК; (3) аденилирование фрагментов ДНК; (4) лигирование Illumina-адапторов к фрагментам ДНК; (5) ПЦР-обогащение библиотеки ДНК; (6) валидацию библиотек на биоанализаторе; (7) гибридизацию экзомных зондов меченых биотином; (8) селекцию таргетных экзомных последовательностей на стрептовидиновых бидцах; (9) индексирование экзомных библиотек. Очистка проб на промежуточном и финальном этапе проводилась с помощью магнитных частиц Agencourt AMPure XP Kit (Beckman Coulter Genomics, Индиана, США) по протоколу производителя набора для приготовления экзомных библиотек.

Проверка размера и молярности фрагментов библиотеки проводилась с помощью набора High Sensitivity DNA kit на электрофоретическом биоанализаторе Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Калифорния, США). Определение точной молярной концентрации проводилось с помощью количественной ПЦР в реальном времени на амплификаторе 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США). Для приготовления реакционной смеси был использован набор KAPA Library Quantification Kit (KAPA Biosystems, Массачусетс, США).

Полноэкзомное и полногеномное массовое параллельное секвенирование проводилось на платформах HiSeq 2000/2500 System и NovaSeq 6000 System (Illumina, Калифорния, США) (Таблица 1). Секвенирование геномных библиотек пациентов AX-III-17 и AIV-1 было проведено на платформе HiSeq 2000/2500 System в лаборатории Эволюционной геномики ИОГен РАН. Секвенирование экзомных библиотек

пациентов из малых семей с мозжечковой атаксией (AI-IV) было проведено в разное время и в разных лабораториях. Секвенирование экзомных библиотек пациентов AI-1, AI-2, AII-1 и AIV-1 было проведено на платформе NovaSeq 6000 System в коммерческой фирме Генетико. Секвенирование экзомных библиотек пациентов AIII-1 и AIII-2 было проведено на платформе HiSeq 2000/2500 System в лаборатории Эволюционной геномики ИОГен РАН.

**Таблица 1.** Анализ исследуемых семей с мозжечковыми атаксиями с помощью массового параллельного секвенирования

Диагноз	Семья, №	Индивиды	Метод	Прибор	Покрывтие генома GRCh37
Врождённая X-сцепленная рецессивная мозжечковая атаксия	AX	AX-III-17	Полногеномный анализ	HiSeq 2000/2500 System	28X
Врождённая мозжечковая атаксия	AI	AI-1, AI-2	Полноэкзомный анализ (TruSeq Exome kit)	NovaSeq 6000 System	112-116X; 99,9% локусов прочтены
Мозжечковая атаксия	AII	AII-1	Полноэкзомный анализ (TruSeq Exome kit)	NovaSeq 6000 System	135X; 98,9% локусов прочтены
Мозжечковая атаксия	AIII	AIII-1, AIII-2	Полноэкзомный анализ (SureSelect Human All Exon V)	HiSeq 2000/2500 System	17X; 99-99,1% локусов прочтены
Врождённая мозжечковая атаксия	AIV	AIV-1	Полноэкзомный анализ (TruSeq Exome kit)	NovaSeq 6000 System	136X; 94,6% локусов прочтены
Синдром мозжечковой атаксии, умственной отсталости и квадропедии	Q	Q-IV-1	Полногеномный анализ	HiSeq 2000/2500 System	90X

### **2.2.3. Методы биоинформатического анализа данных массового параллельного секвенирования и поиска кандидатных вариантов**

Качество сырых чтений в формате fastq оценивалось с помощью программы FastQC. Необработанные чтения были выравнены на референсный геном человека GRCh37/hg19 с помощью программы BWA MEM [Li et al., 2009; Li, Durbin, 2010]. Дуплицированные чтения были определены с помощью программы MarkDuplicate пакета The Genome Analysis Toolkit (GATK) [McKenna et al., 2010]. Качество выравнивания определялось с помощью программы SAMtools flagstat. Средняя глубина покрытия и глубина покрытия отдельных локусов определялась с помощью программы DepthOfCoverage из программного пакета GATK.

Далее ОНП и инделлы были определены с помощью пакета программ GATK, рекомендованных для анализа в гиде Best Practices Workflows [McKenna et al., 2010; DePristo et al., 2011; Van der Auwera et al., 2013]. Для этого последовательно были проведены следующие операции: (1) рекалибровка базового показателя качества с помощью программ BaseRecalibrator и ApplyRecalibration; (2) определение ОНП и инделлов с помощью локальной повторной сборки гаплотипов с использованием программы HaplotypеCaller; (3) рекалибровка качества названных вариантов с помощью программ VariantRecalibrator и ApplyVQSR (оптимальное значение параметра --max-gaussians было подобрано для каждого экзома/гена отдельно).

Затем была проведена аннотация вариантов с помощью программы Ensembl Variant Effect Predictor (VEP) [McLaren et al., 2016]. Аннотация каждого варианта включала: (1) тип варианта отдельно для всех транскриптов (1) расположение во всех транскриптах и белке (3) статус варианта в базе данных ClinVar; (4) предсказание патогенности с помощью программ SIFT и PolyPhen2 [Sim et al., 2012; Adzhubei et al., 2010] (5); частоты в популяциях Проекта 1000 Геномов и gnomAD (частоту минорного аллеля в мировой

популяции, частоты в отдельных популяциях, максимальную частоту минорного аллеля). Структурные варианты были определены с помощью программ Pindel [Ye et al., 2009] и BreakDancer [Chen et al., 2009]. Эволюционная консервативности оценивалась с помощью визуализации выравнивания последовательностей ортологов 100 видов позвоночных (Multiz Alignments of 100 Vertebrates) с помощью геномного браузера UCSC и значений счёта консервативности (PhyloP100way и phastCons100way) [Pollard et al., 2010; Siepel et al., 2005]. Дополнительно предсказание патогенности вариантов проводилось с помощью программы CADD [Kircher et al., 2014]. Предсказание пространственной структуры белков, содержащих аминокислоты дикого типа и мутантного, проводилось с помощью Pyyre2, iTasser и AlfaFold [Kelley et al., 2015; Yang, Zhang, 2015; Jumper et al., 2021]. Выравнивание предсказанных пространственных моделей белков с аллелями дикого типа и мутантного проведено с помощью программы PyMOL Molecular Graphics System 97 (Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC).

Экспрессия генов оценивалась с помощью данных Illumina Body Map [Barbosa-Morais et al., 2012] и базы данных Expression Atlas [Kapushesky et al., 2010; Papatheodorou et al., 2020], в которой визуализированы данные экспрессии в пренатальный период проекта HDBR [Lindsay et al., 2016], и в постнатальный период Fantom5 [Lizio et al., 2015], GTEx (The Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project) [GTEx Consortium, 2013]. Сравнение экспрессии кандидатных генов в развивающемся мозжечке проводилось с помощью платформы анализа и визуализации геномики R2 (<http://r2.amc.nl>). Сравнение экспрессии генов у человека и животных проводилось с помощью данных проекта Mammalian Kaessmann [Cardoso-Moreira et al., 2019]. Экспрессия генов в мозге у мышей оценивалась с помощью данных проекта Allen Brain Atlas [Lein et al., 2007]. Экспрессия генов в одиночных клетках тканей мозга оценивалась с помощью баз данных проектов Brain RNA-Seq и DropViz [Zhang et al., 2014; Zhang et al., 2016; Saunders et al., 2018]. Экспрессия белков оценивалась с помощью базы данных Human Protein Atlas [Uhlén et al., 2015;

Sjöstedt et al., 2020]. Анализ экспрессии генов и их паралогов был проведён с помощью специально разработанной онлайн программы “Essential Paralogue by Expression” (EPbE), написанной на программном языке R [Protasova et al., 2022].

#### **2.2.4. Проверка кандидатных вариантов**

Проверка кандидатных ОНП проводилась с помощью ПЦР и прямого секвенирования по Сэнгеру на приборе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Калифорния, США). Подбор праймеров проводился с помощью программы Primer3 и NCBI Primer BLAST [Untergasser et al., 2012; Ye et al., 2012]. Последовательности олигонуклеотидов, использованные для валидации кандидатных вариантов, приведены в Таблицах 4-7 Приложения. Амплификация локусов, содержащих кандидатные варианты проводилась с помощью набора GenPak PCR Master Mix Core (Isogene, Россия) в следующем режиме амплификации: 1-й цикл: 94 °C – 4 мин, следующие 35 циклов: 94 °C – 30 сек, Tm °C – 30 сек, 72 °C – 30 сек, завершающих цикл – 72 °C – 7 мин, где Tm – температура отжига праймеров для каждой пары праймеров была определена с помощью программы NCBI Primer BLAST и тестово. Наличие и качество ПЦР продуктов оценивалось с помощью электрофореза в 2% агарозном геле, для приготовления которого было взято 2,5 г агарозы (Amresco) на 125 мл буфера TAE (трис-ацетат 40 mM, ЭДТА 1 mM, pH 7,6). Размер ПЦР продуктов валидировался с помощью 100bp+50bp ДНК-маркера, состоящего из 11 фрагментов от 50 п.н. до 1000 п.н (SibEnzyme, Новосибирск, Россия).

Проверка кандидатных структурных вариантов проводилась с помощью ПЦР и разделения фрагментов ПЦР продуктов по величине с помощью электрофореза в агарозном геле. ПЦР продукты, размер которых соответствовал локусам, содержащим структурные варианты, дополнительно были валидированы с помощью секвенирования по Сэнгеру на приборе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Калифорния, США).

Для подтверждения делеции в гене *ATP7A* была подобрана система праймеров. Так как область делеции большая и составляет 41,5 т.п.н., то пары праймеров были подобраны на обе границы, таким образом, чтобы один праймер был комплементарен области делеции (внутренний праймер), а другой – неповреждённой фланкирующей области (внешний праймер), в результате образование продуктов происходит только в том случае, если делеция отсутствует. Дополнительно была подобрана пара праймеров внутри уникальной области делеции, образование продуктов с которой также подтверждало отсутствие делеции. Для получения продукта амплификации, подтверждающего наличие делеции, амплификация проводилась с внешних праймеров, лежащих во фланкирующих границы делеции геномных областях. Так как размер делетируемой области больших размеров, образование продуктов с такой пары праймеров происходит только в том случае, если присутствует делеция. Последовательности праймеров приведены в Таблице 5 Приложения. С помощью секвенирования по Сэнгеру продукта амплификации пары праймеров с обеих границ фланкирующих делетированную область было подтверждено наличие делеции и границы генетических последовательностей, фланкирующих делетированную область.

Подтверждение делеции в гене *GRID2* было проведено с помощью системы праймеров. Последовательности праймеров приведены в Таблице 7 Приложения. Так как область делеции большая 36,2 т.п.н., проверка проводилась с помощью 3х праймеров, из которых два праймера (первая пара праймеров, прямой и обратный) были комплементарны фланкирующим границы делеции геномным областям и ещё один праймер (второй обратный) был комплементарен делетированной области. В случае наличия делеции происходило образование продукта амплификации размером 432 п.н. с первой пары праймеров. В случае отсутствия делеции образование продукта амплификации размером 345 п.н. происходило со второй пары праймеров (прямого и второго обратного). В случае гетерозиготы оба продукта были обнаружены в одной реакции ПЦР. С помощью секвенирования по Сэнгеру

продуктов амплификации с первой пары праймеров была подтверждена делеция и генетические последовательности фланкирующие делетированную область.

Амплификация локусов структурных вариантов проводилась с помощью набора GenPak PCR Master Mix Core (Isogene, Россия) в следующем режиме амплификации: 1-й цикл: 94 °C – 4 мин, следующие 35 циклов: 94 °C – 30 сек,  $T_m$  °C – 1 мин, 72 °C – 30 сек, завершающих цикл – 72 °C – 7 мин, где  $T_m$  – температура отжига праймеров для каждой пары праймеров была определена с помощью программы NCBI Primer BLAST и тестово.

Очистка ПЦР продуктов проводилась с помощью набора Cleanup Standard для выделения ДНК из агарозного геля и реакционных смесей (Евроген, Москва, Россия) по протоколу производителя. Сиквенная реакция проводилась с помощью набора BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США). Реакционная смесь сиквенной реакции содержала BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix – 2 мкл, 5x сиквенный буфер – 1 мкл, прямой или обратный праймер в концентрации 1  $\mu$ M – 2 мкл, ПЦР продукт от 1 до 4 мкл. Общий объем реакционной смеси доводился очищенной DEPC водой до 10 мкл. Количество вносимого ПЦР продукта (нг) – Q, было рассчитано по формуле:  $Q=L_{\text{лок.}}/50$ , где  $L_{\text{лок.}}$  – длина амплифицируемого локуса (п.н.). Режим амплификации для всех анализируемых локусов был следующий: 96 °C – 1 мин, следующие 25 циклов: 96 °C – 10 сек, 50 °C – 5 сек, 60 °C – 4 мин. Очистка продуктов сиквенной реакции проводилась с помощью набора DyeEx 2.0 Spin Kit (QIAGEN, Хильден, Германия) по протоколу производителя. Перед прямым секвенированием по Сэнгеру к 10 мкл очищенных продуктов сиквенных реакций добавлялось 20 мкл формамида. Данные сиквенных реакций анализировались с помощью программы Sequencing Analysis Software Version 5.4 (Applied Biosystems, Калифорния, США).

### **2.2.5. Анализ генов-кандидатов методом прямого секвенирования по Сэнгеру**

Анализ всех экзонов в гене *ABCB7* в образцах ДНК пациентов из семей AI-IV проводился с помощью прямого секвенирования по Сэнгеру. Олигонуклеотидные последовательности праймеров представлены в Таблице 4 Приложения. Амплификация всех локусов проводилась с помощью набора GenPak PCR Master Mix Core (Isogene, Россия) в следующем режиме амплификации: 1-й цикл: 94 °C – 4 мин, следующие 35 циклов: 94 °C – 30 сек, Tm – 30 сек, 72 °C – 30 сек, завершающих цикл – 72 °C – 7 мин, где Tm – температура отжига пар праймеров. Аналогично проводился анализ 20 экзона гена *ATP2B3*, 2 и 3 экзонов гена *ATP7A*, олигонуклеотидные последовательности праймеров представлены в Таблице 4, 5 Приложения. Также в семьях AI-IV проводился анализ кодирующей последовательности ретрогена *PGAM4*. Так как размер единственного экзона ретрогена составляет 1690 п.н., из которых 762 п.н. белок-кодирующая последовательность, чтобы обеспечить высокое качество прочтения всей белок-кодирующей последовательности, для его анализа было подобрано две пары праймеров: внешние, охватывающие всю белок-кодирующую последовательность экзона, и дополнительные внутренние. ПЦР была проведена только с внешней пары праймеров в следующем режиме амплификации: 1-й цикл: 94 °C – 4 мин, следующие 35 циклов: 94 °C – 30 сек, 60 – 30 сек, 72 °C – 2 мин, завершающих цикл – 72 °C – 7 мин. Сиквенсная реакция для каждого ПЦР продукта проводилась с каждым праймером отдельно (с двух прямых: внешнего и внутреннего; и двух обратных: внешнего и внутреннего). Условия сиквенсной реакции и прямого секвенирования по Сэнгеру не отличались от вышеописанных.

### **2.2.6. Методы анализа экспрессии кандидатных генов**

Выделение РНК проводилось из постмортальных образцов мозга (мозжечок и лобная кора) и печени с помощью набора RNeasy Mini Kit

(QIAGEN, Хильден, Германия) согласно протоколу производителя. Выделенную РНК обрабатывали ДНКазой (Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США). Качество РНК оценивалось с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле в течение 40 мин при напряжении 100 В и силе тока 180 мА с использованием источника питания Эльф-4 (ДНК-Технология, Москва, Россия). Для определения длины фрагментов выделенной РНК использовался маркер с длиной фрагментов от 250 п.н. до 10 000 п.н. фирмы GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США). Измерение концентрации РНК проводилось с помощью спектрофотометра NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США).

Анализ экспрессии генов кандидатов в семье АХ в областях мозга проводился с помощью ПЦР с обратной транскрипцией. Реакция обратной транскрипции проводилась с помощью набора The AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, Калифорния, США) по протоколу производителя. Олигонуклеотидные последовательности праймеров на транскрипты генов *ABCB7* и *ATP7A* были подобраны с помощью Primer3 и NCBI Primer BLAST, представлены в таблице (Таблица 8 Приложения). В качестве положительного контроля были использованы праймеры на транскрипт гена *HPRT*, в качестве отрицательного контроля были использованы праймеры на неэкспрессируемую область ДНК.

### **2.2.7. Методы этнической идентификации и установления родства**

Используя данные полногеномного секвенирования, была реконструирована полная последовательность митохондриального генома. Митохондриальная гаплогруппа была определена с помощью программы MitoMaster и базы данных митохондриального генома человека MitoMap [Ruiz-Pesini et al., 2007]. Гаплогруппа Y хромосомы была определена с использованием базы данных Международного общества генетической генеалогии Древа гаплогруппы Y-ДНК 2014 (International Society of Genetic Genealogy Y-DNA Haplogroup Tree 2014, <http://www.isogg.org/tree/>). Анализ

родства был выполнен с помощью коммерческого набора AmpF/STR Identifier Plus Kit (панель Identifier Plus v1.2X), включающего 15 CODIS STR маркеров. Визуализация и анализ STR маркеров проведены с помощью программы GeneMapper (Applied Biosystems, Калифорния, США).

### 2.2.8. Методы эволюционного анализа

Белок-кодирующие последовательности основного транскрипта гена *GRID2* были получены из базы данных NCBI [Pruitt et al., 2014], Ensembl [Aken et al., 2016] и геномного браузера UCSC [Karolchik et al., 2004]. Трансляция и выравнивание последовательностей были выполнены с использованием алгоритма MUSCLE в программе MEGA v6 [Tamura et al., 2013]. Филогенетическое древо, включающее 23 вида таксона приматов, было реконструировано в соответствии с опубликованной филогенией [Perelman et al., 2011]. В качестве аутгруппы была выбрана пика (*Ochotona princeps*). Эволюционный анализ проводился с помощью программы CodeML в пакете PAML v4.8 [Yang, 1997; Yang, 2007]. Было проведено множественное тестирование моделей с использованием критериев AIC, cAIC и BIC, и наиболее статистически значимо подходящей была определена модель замены кодонов FMutSel-F [Yang et al., 2008]. Ветвь-специфичный анализ белок-кодирующих последовательностей приматов был проведён с помощью однопараметрической модели, двухпараметрической и свободнопараметрической моделей. Ветвь-сайт-специфичный анализ белок-кодирующих последовательностей приматов был проведён с помощью модели А. Апостериорные вероятности оценивались с помощью эмпирического байесовского теста (Bayes empirical Bayes, BEB), реализованного в программе CodeML.

Для всех синонимичных замен в белок-кодирующей последовательности современного человека (*Homo sapiens*) по сравнению с древними гоминидами (*Homo neanderthalensis*, *Denisovans*) и шимпанзе обыкновенным (*Pan troglodytes*) был проведён анализ влияния на

термодинамическую стабильность мРНК. Такой же анализ был проведён для всех замен в консервативных сайтах дерева приматов. Свободная энергия Гиббса была рассчитана для фрагментов длиной 25, 51, 75, 151 и 301 нуклеотидов и полноразмерных кодирующих последовательностей с помощью программы Mfold [Zuker, 2003; Zuker, 1998; Waugh, 2002]. Уровень статистической значимости оценивался с помощью Критерия Знаков.

## **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ**

### **3.1. Анализ генетических причин врождённой X-сцепленной рецессивной мозжечковой атаксии в большой бурятской семье**

В первую очередь генетический анализ был проведён для пациентов с врождённой X-сцепленной рецессивной формой гипоплазии мозжечка из большой бурятской семьи (АХ) (Рисунок 1). Детали клинической картины пациентов были описаны ранее [Illarioshkin et al., 1996]. Краткое описание заболевания и родословная семьи представлены в разделе в главе 2, пункт 2.1.2.1. Главным клиническим отличием от многих других известных врождённых атаксий является наличие моторной задержки развития, мозжечковой атаксии с непрогрессирующим течением заболевания и отсутствие когнитивных нарушений.

#### **3.1.1. Биоинформатический анализ данных полногеномного секвенирования ДНК пациента с X-сцепленной рецессивной мозжечковой атаксией**

Было проведено массовое параллельное секвенирование образца ДНК пациента АХ-III-17 с диагнозом врождённой X-сцепленной рецессивной мозжечковой атаксии семьи АХ. Всего было получено 542 млн сырых чтений, которые были выравнены на референсный геном человека (версия сборки GRCh37), достигнув не менее 14X покрытия гаплоидного генома. В общей сложности было предсказано 4,2 млн однонуклеотидных вариантов, инделов

и структурных вариантов. Была проведена реконструкция митохондриальной ДНК пациента и по женской линии была определена гаплогруппа C4b (Таблица 9 Приложения). Выявленная митохондриальная гаплогруппа является распространённой среди коренного населения Южной Сибири [Derenko et al., 2010; Ruiz-Pesini et al., 2007]. С помощью анализа последовательности Y-хромосомы по мужской линии была установлена гаплогруппа N1c1a1a\* (Таблица 10 Приложения), которая принадлежит к подгруппе N1c1, имеющей азиатское происхождение и распространённой среди бурят и монголов (International Society of Genetic Genealogy Y-DNA Haplogroup Tree 2007, [Rootsi et al., 2007; Харьков и др., 2014]). Результаты анализа гаплогрупп подтверждают бурятское происхождение анализируемого пациента. Отсеквенированный полный геном пациента АХ-III-17 является первым опубликованным геномом этнического бурята монгольского происхождения. Необработанные данные генома загружены в базу данных NCBI Sequence Read Archive под номером доступа SRP049620. Полная митохондриальная геномная последовательность загружена в базу данных NCBI GenBank под номером доступа KR153486.

С помощью ранее проведённого анализа парного сцепления и реконструкции гаплотипов было установлено, что патогенный вариант в семье АХ расположен в хромосомном локусе Xp11.21-q24 между STR маркерами DXS991 и DXS1001, соответствующими координатам X:55519052-119836873 генома человека версии GRCh37 [Illarioshkin et al., 1996]. Поэтому дальнейший поиск кандидатных вариантов был проведён в данном локусе. Были отобраны все редкие варианты с минорной аллельной частотой (MAF) менее 5% по данным проекта 1000 Геномов. Всего было обнаружено 5 однонуклеотидных вариантов и одна большая делеция размером 41 456 п.н. (Таблица 2).

**Таблица 2.** Редкие варианты в геноме пациента АХ-III-17 в локусе гомозиготности в семье АХ.

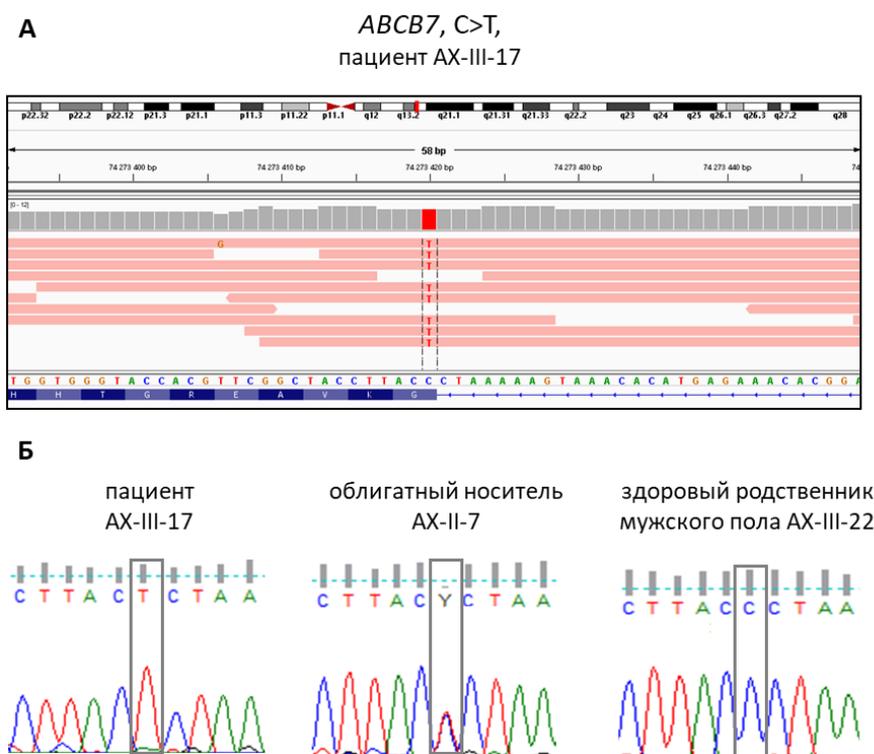
Ген	Координаты в геноме GRCh37	RS	Нукл. замена	АК замена	g/max MAF		SIFT/ PolyPhen2	CAD D	Phylo P	Заболевание, известное для гена
					1000G	gnomAD				
<i>AMER1</i>	X:63412133	rs763438860	G>A	A345V	-/-	0,00002/ 0,00007 В.Азиаты	допустим./ возможно патогенный	23,5	5,87	Полосчатая остеопатия с краниальным склерозом (ОМIM: 300373)
<i>NHSL2</i>	X:71354380	rs72630038	G>A	E196K	0,031/ 0,189 Японцы	0,0103/ 0,136 В.Азиаты	допустим./ доброкач.	16,9	2,47	-
<i>PHKA1</i>	X:71830999	rs782159405	C>T	R802Q	0,0003/ 0,0063 Хань	0,00023/ 0,003 В.Азиаты	допустим./ доброкач.	7,40	0,18	X-сцепл. мышечный гликогеноз (ОМIM: 300559)
<i>ABCB7</i>	X:74273420	-	C>T	G682S	-/-	-/-	патогенный/ наиболее вероятно патогенный	34,0	7,34	X-сцепл. сидеробластная анемия и атаксия (ОМIM: 301310)
<i>ATP7A</i>	X:77190006- 77231471	-	Делеция 41 456 п.н.	Делеция 1-68 АК	-/-	-/-	-	max 6,48	-	Болезнь Менкеса (ОМIM: 309400), Синдром затылочного рога (ОМIM: 304150), X-сцепл. ДСМА 3 типа (ОМIM: 300489)
<i>PGAM4</i>				Делеция целого продукта						-
<i>RGAG1</i>	X:109697207	rs771130284	C>T	S1121L	-/-	0,000016/ 0,000073 Латино/ см.амер.	патогенный низкая достоверн./ доброкач.	16,7	1,86	-

На основе популяционного и эволюционного анализа, анализа экспрессии генов и топологии аминокислотных замен в белке варианты в генах *NHSL2*, *AMER1*, *PHKA1* и *RGAG1* были исключены из дальнейшего анализа (Таблица 2, Рисунок 1 Приложения, Рисунок 2А Приложения). Вариант rs72630038 в гене *NHSL2* имеет высокую частоту среди Восточных Азиатов (MAF 0,1357 gnomAD) и по данным проекта 1000 Геномов достигает наибольшего распространения (MAF 0,1892) среди Японцев в Токио, при этом

отсутствуют данные патогенности варианта rs72630038 (Таблица 2). В генах-ортологах минорный аллель присутствует у некоторых млекопитающих (Рисунок 1 Приложения). В дополнение к этому данный ген имеет низкую экспрессию в мозжечке в пренатальный период [Lindsay et al., 2016]. Мутации в гене *AMER1* известны как генетические причины полосчатой остеопатии с краниальным склерозом и умственной отсталостью (OMIM: 300373). Вариант в гене *AMER1* был исключён из-за различий в клиническом фенотипе, описанном для данного гена и пациентов из семьи АХ, а также на основании локализации варианта rs763438860 в эволюционно неконсервативной области белка. Ген *RHKA1* имеет низкую экспрессию в мозжечке [Lindsay et al., 2016], а мутации в данном гене приводят к X-сцепленному мышечному гликогенозу (OMIM 300559), который не обнаружен у пациентов из семьи АХ. Аминокислотная замена аргинина на глутамин в белке RHKA1 произошла в неконсервативном положении, а минорный вариант присутствует у некоторых млекопитающих (Рисунок 1 Приложения). Экспрессия гена *RGAG1* в мозжечке очень низкая или практически отсутствует, а найденный вариант в этом гене также локализован в неконсервативном положении.

Только один однонуклеотидный вариант, замена С>Т в позиции X:74273420 (NM\_001271696.3:c.2044G>A), обнаруженный впервые у пациента АХ-III-17 (отсутствует в базах данных 1000 Геномов и gnomAD, позднее данному варианту был присвоен номер rs797044558 в базе данных dbSNP), был найден в локусе гомозиготности, в высоко консервативной белок-кодирующей области гена *ABCB7* (Таблица 2, Рисунок 5). Данный ген кодирует митохондриальный АТФ-связывающий транспортёр субсемейства В член 7, расположенный на внутренней митохондриальной мембране, играющий важную роль в транспорте ионов железа и синтезе гемопротейнов [Hollenstein et al., 2007]. В период пренатального развития *ABCB7* экспрессируется в мозжечке, а нарушения его функций вызывают накопление ионов железа и протопорфирина IX в митохондриях, приводя к заболеванию сидеробластной анемии и атаксии (ASAT) [Nikpour et al., 2013; D'Hooghe et al.,

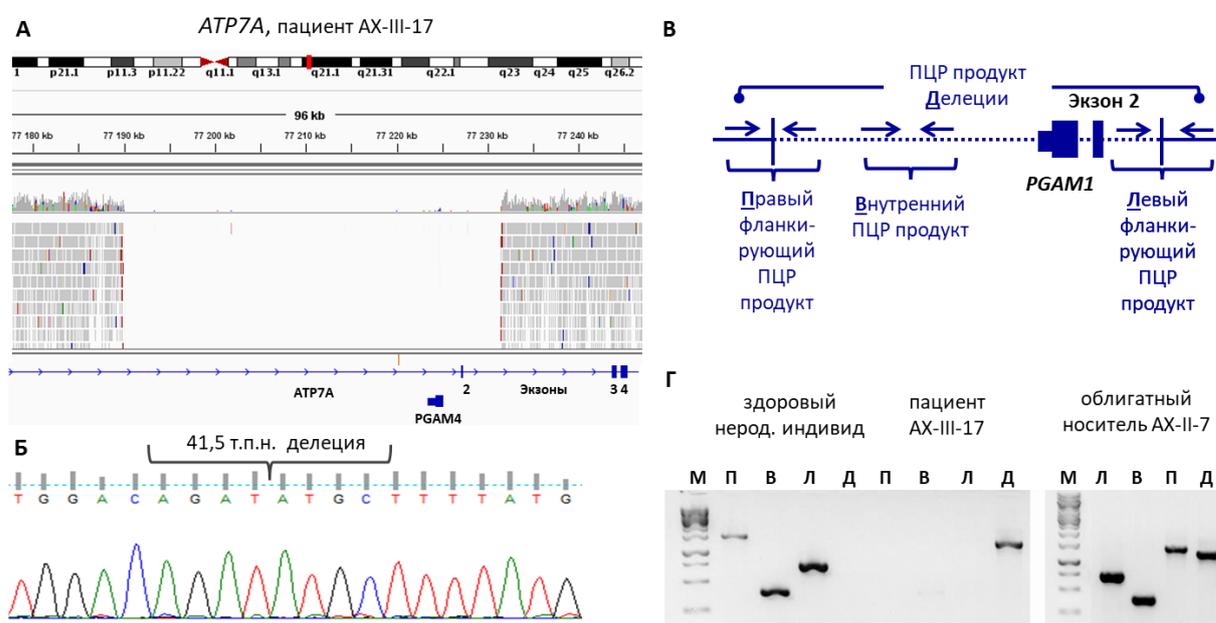
2012; Sato et al., 2011; Boultwood et al., 2008; Pondarre et al., 2007]. Данный вариант в гене *ABCB7* был отобран в качестве кандидатного для дальнейшего анализа.



**Рисунок 5.** Идентификация нового кандидатного варианта в гене *ABCB7* в семье АХ. А – Визуализация области генома, содержащей кандидатный вариант chrX:g.74273420C>T в гене *ABCB7* с помощью программы IGV (Integrative Genomics Viewer); Б – Проверка гемизиготного варианта у пациента АХ-III-17, гетерозиготы у облигатного носителя, его матери (АХ-II-7), и гемизиготы по аллелю дикого типа у здорового родственника мужского пола (АХ-III-22) с помощью прямого секвенирования по Сэнгеру.

Помимо этого в локусе гомозиготности была выявлена крупная делеция X:77190006-77231471 в гене *ATP7A* (NC\_000023.10:g.77190006\_77231471del), приводящая к полному удалению второго экзона и значительной интроной части между 1 и 3 экзонами, богатую регуляторными элементами и диспергированными повторами (Таблица 2, Рисунок 6). В результате данной делеции также происходит полное удаление ретрогена *PGAM4*,

расположенного в антисмысловом направлении в интронной области гена *ATP7A*. Белок, кодируемый данным геном, является АТФазой транспортёром меди, располагающимся внутриклеточно на мембранах аппарата Гольджи, эндоплазматического ретикулума, а также на цитоплазматической мембране [Uhlemann et al., 2021]. Ген *ATP7A* экспрессируется во многих тканях, в значительной степени в печени, гематоэнцефалическом барьере, в том числе в мозге (Рисунок 2 и 4 Приложения) [Telianidis et al., 2013; Kapushesky et al., 2010; Fagerberg et al., 2014; Miller et al., 2014]. Мутации в гене *ATP7A* вызывают нарушение транспорта меди и её накопление в различных тканях, и приводят к нескольким заболеваниям: классической и умеренной формам болезни Менкеса [Møller et al., 2013; Bull et al., 1993; Chelly et al., 1993], X-сцепленной дистально-спинально-мышечной атрофии 3-го типа (ДСМА, SMAХ3) [Kennerson et al., 2010], синдрому затылочного рога (OHS) [Byers et al., 1980; Das et al., 1995].



**Рисунок 6.** Идентификация делеции в гене *ATP7A* в семье АХ. А – Визуализация области генома, содержащей делецию hg19 chrX:g.77190006\_77231471del в гене *ATP7A* с помощью программы IGV. Б – Проверка гемизиготной делеции у пациента АХ-III-17 с помощью прямого секвенирования по Сэнгеру. В – Схема системы праймеров для валидации

большой, 41,5 т.п.н., делеции в гене *ATP7A*, состоящей из 4х пар праймеров: одна пара внешних праймеров, комплементарных обеим границам с делецией и подтверждающая её наличие (Д); три пары праймеров, подтверждающих отсутствие делеции, из них две пары праймеров комплементарны границам делеции (П и Л) и одна пара – последовательности внутри делеции (В). Г – Электрофореграмма ПЦР продуктов области делеции: наличие трёх продуктов (П, В и Л) и отсутствие продукта с внешних границ делеции (Д) подтверждает гемизиготу дикого типа у здорового неродственного индивида; наличие продукта с внешних границ делеции (Д) и отсутствие остальных продуктов (П, В и Л) подтверждает гемизиготную делецию у пациента АХ-III-17; наличие всех четырёх продуктов подтверждает гетерозиготную делецию у облигатного носителя АХ-II-7, матери исследуемого пациента.

В 1-2 интроне гена *ATP7A* по антисмысловой цепи находится белок-кодирующий ретроген *PGAM4*, в результате делеции также происходит его полное удаление (Рисунок 6). *PGAM4* представляет собой функциональную ретрокопию гена *PGAM1*, кодирующую фосфолицератмутаза, которая катализирует реакцию изомеризации 3-фосфолицерата в 2-фосфолицерат в гликолитическом пути. Данный ретроген присутствует только у человека и ближайших ему приматов, шимпанзе и гориллы. Так как *PGAM4* ретроген не экспрессируется в мозге и других тканях, за исключением тестикул (Illumina Human Body Map 2.0, номер доступа ArrayExpress E-MTAB-513), данный ретроген не был отобран в качестве кандидатного гена, связанного с врождённой патологией мозжечка в семье АХ. Ввиду наличия некоторых данных о связи данного ретротгена с бесплодием [Okuda et al., 2012], было проведено дальнейшее исследование на предмет фертильности пациентов в семье АХ.

### 3.1.2. Проверка кандидатных вариантов в семье АХ

Проверка кандидатных вариантов, выявленных в данных полногеномного секвенирования пациента АХ-III-17, была проведена на образцах ДНК четырёх пациентов и их клинически здоровых родственников из семьи АХ с помощью ПЦР и прямого секвенирования по Сэнгеру. Проверка варианта в гене *ABCB7* проводилась с помощью секвенирования по Сэнгеру продуктов ПЦР, содержащих область 16 экзона и примыкающей интронной области. Проверка крупной делеции 41,5 т.п.н. в гене *ATP7A* проводилась с помощью ПЦР на разные участки делетируемой области (в случае отсутствия делеции – трёх продуктов участков, фланкирующих делецию с одной из сторон и внутри делеции и, в случае наличия делеции, продукта с обеих сторон фланкирующей последовательности) с последующим их разделением по длине в агарозном геле методом электрофореза продуктов ПЦР (Рисунок 6В). Наличие делеции также было подтверждено прямым секвенированием по Сэнгеру продукта, полученного с обеих сторон фланкирующей последовательности (см. раздел Методы).

Оба кандидатных варианта, однонуклеотидная замена в гене *ABCB7* и делеция в гене *ATP7A*, были подтверждены в гемизиготном состоянии у всех исследуемых пациентов (4 индивида) и в гетерозиготном состоянии у всех исследуемых клинически здоровых женщин-носителей (4 индивида). Так же были проанализированы здоровые мужчины (4 индивида) из семьи АХ, у которых не были зафиксированы случаи рождения больных детей. Все четверо клинически здоровых мужчин не имеют данных вариантов и являются гемизиготами по вариантам дикого типа в обоих генах (Таблица 3).

**Таблица 3.** Результаты генотипирования генов *ABCB7* и *ATP7A* у пациентов и их клинически здоровых родственников из семьи АХ.

№	Пол	Диагноз	<i>ABCB7</i>	<i>ATP7A</i>	<i>PGAM4</i>
			16 экзон	2 экзон	1 экзон
АХ-III-6	муж.	пациент	мутация, Т	делеция	
АХ-III-17	муж.	пациент	мутация, Т	делеция	
АХ-III-18	муж.	пациент	мутация, Т	делеция	
АХ-IV-26	муж.	пациент	мутация, Т	делеция	
АХ-II-7	жен.	носитель	дикий тип / мутация, СТ	гетерозиготная делеция	
АХ-II-11	жен.	носитель	дикий тип / мутация, СТ	гетерозиготная делеция	
АХ-III-19	жен.	носитель	дикий тип / мутация, СТ	гетерозиготная делеция	
АХ-III-31	жен.	носитель	дикий тип / мутация, СТ	гетерозиготная делеция	
АХ-III-22	муж.	здоровый	дикий тип, С	дикий тип	
АХ-III-35	муж.	здоровый	дикий тип, С	дикий тип	
АХ-III-37	муж.	здоровый	дикий тип, С	дикий тип	
АХ-III-4	муж.	здоровый	дикий тип, С	дикий тип	

### 3.1.3. Биоинформатическое предсказание структурных изменений в белках с выявленными вариантами в семье АХ

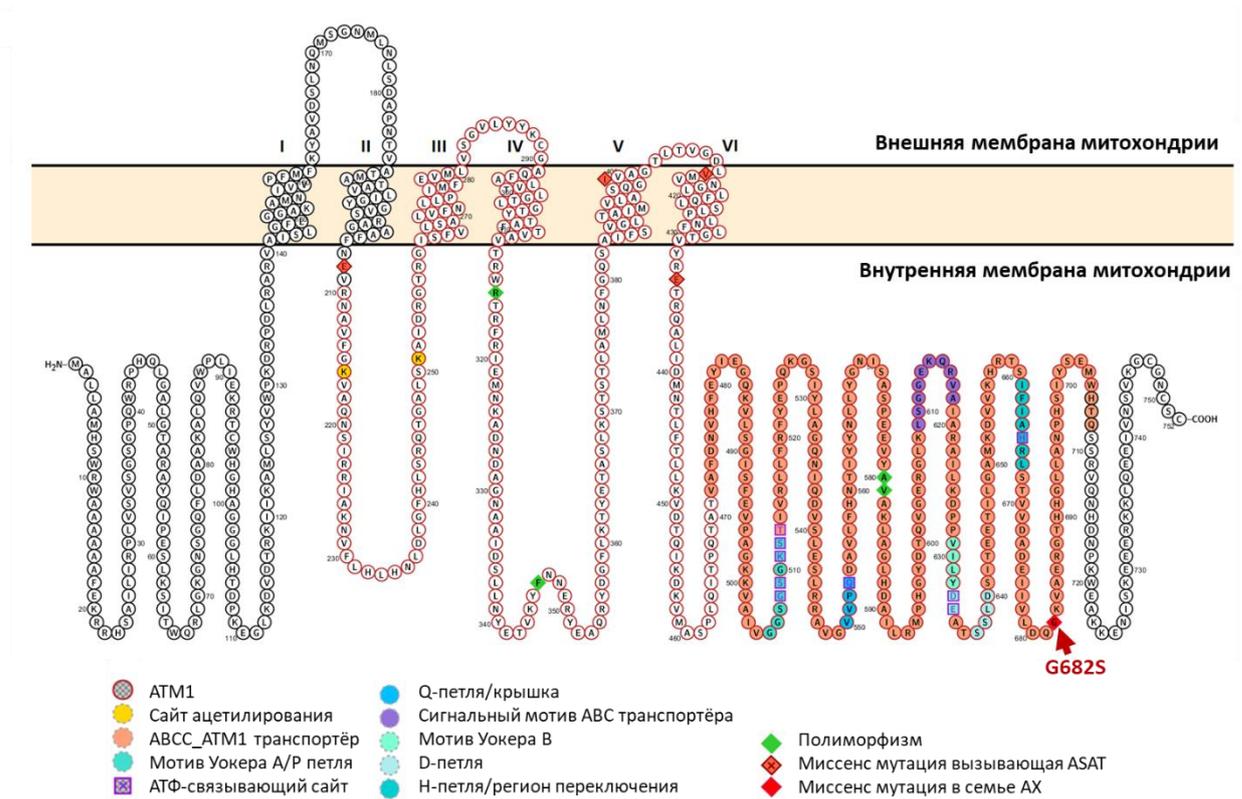
Для того, чтобы выявить патогенный вариант, являющийся причиной развития заболевания мозжечковой атаксии в семье АХ, был проведён дополнительный анализ однонуклеотидной замены в гене *ABCB7* и крупной делеции в гене *ATP7A* и их расположение и влияние на изменение пространственной структуры белков.

#### 3.1.3.1. Биоинформатическое предсказание структурных изменений в белке, вызванных однонуклеотидной заменой в гене *ABCB7*

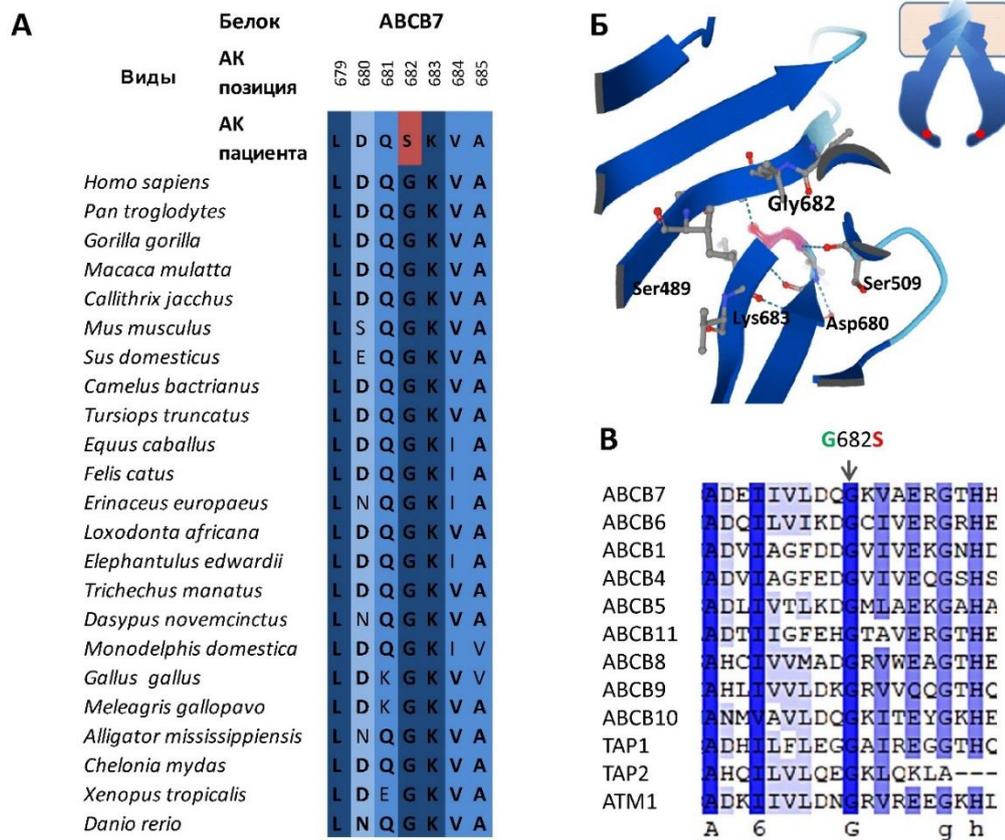
Однонуклеотидная замена С>Т в позиции X:74190145 происходит в первом кодоне 16 экзона гена *ABCB7* рядом с сайтом акцептора сплайсинга. Поэтому в первую очередь было проведено исследование влияния данной замены на сайт сплайсинга. Биоинформатический анализ, в основе которого лежит анализ по частотам нуклеотидов в каждом положении сайта (от -20 до +3), предсказал отсутствие изменений сайта сплайсинга (Таблица 11 Приложения) [Stamm et al., 2000; Нурдинов и др., 2006]. Дополнительно

анализ изменения сайта сплайсинга был проведён с помощью онлайн программы SpliceAI [Jaganathan et al., 2019], которая также показала отсутствие изменений для всех транскриптов (Таблица 12 Приложения).

Затем было проведено исследование влияния аминокислотной замены глицина на серин в положении 682 (p.Gly682Ser) на пространственную структуру белка. Предсказание пространственной структуры ABCV7 транспортёра с мутантным и диким вариантами было проведено с помощью программы Phyre2. Вариант p.Gly682Ser расположен в домене, связывающем нуклеотиды (NBD), располагающемся во внутримитохондриальном пространстве (Рисунок 7). Сравнительный анализ ортологичных и паралогичных аминокислотных последовательностей ABC транспортёров показал высокую консервативность аминокислоты глицина в положении 682 (Рисунок 8). С помощью дополнительного анализа в программе Phyre2 предсказано, что замена на серин в данном положении может приводить к появлению вращения в неподвижном сайте. В дополнение к этому данная замена p.Gly682Ser также предсказана, как “патогенная” с помощью программ SIFT и “наиболее вероятно патогенная” с помощью PolyPhen2.



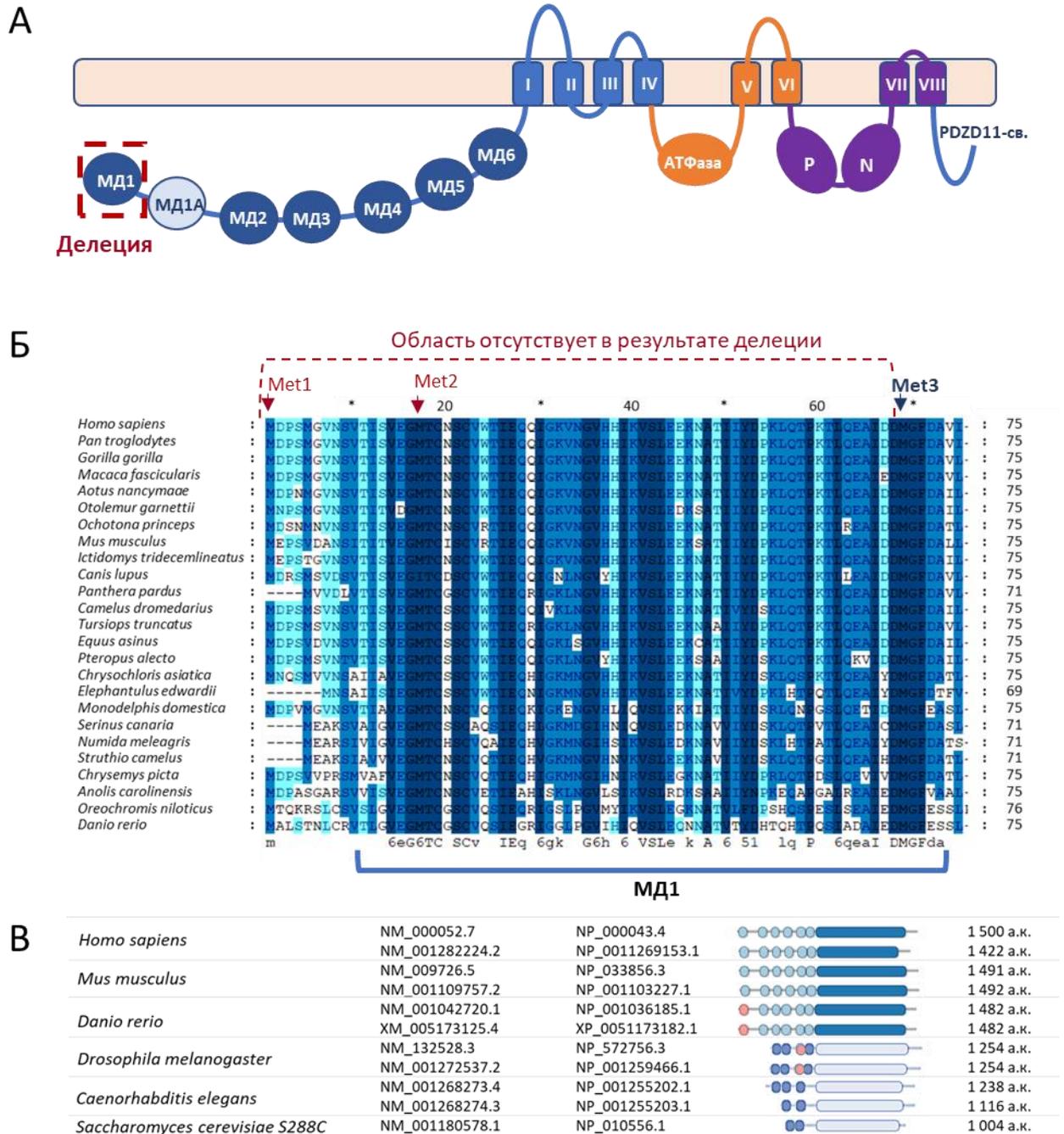
**Рисунок 7.** Схематичное изображение структуры белка ABCB7 и расположение новой замены, выявленной у пациентов из семьи AX (создано с помощью Protter [Omasits et al., 2014] с использованием данных UniProt [Salamov et al., 1998]). А – Белок ABCB7 представляет собой митохондриальный транспортёр, состоящий из 6 трансмембранных доменов, формирующих митохондриальный канал, и двух внутримитохондриальных областей, формирующих нуклеотид-связывающий домен (ABCC ATM1 транспортёр). Найденный вариант p.Gly682Ser (G682S), расположен в C-концевой внутримитохондриальной области, выделен красным и показан стрелкой.



**Рисунок 8.** Анализ области, содержащей замену p.Gly682Ser (G682S) в транспортёре ABCB7. А – Эволюционный анализ аминокислотных последовательностей ортологов, Gly682 высоко консервативен; Б – пространственная структура области ABCB7 транспортёра, содержащая аминокислоту Gly682, представлена бета-складкой (создана AlfaFold), глицин необходим для формирования жёсткой петли, дополнительный анализ с помощью программы Phyre2 предсказал повышение ротации в случае замены на серин в данном положении. В верхнем правом углу схематичное изображение ABCB7 транспортёра, расположенного на внутренней мембране митохондрии, выявленный вариант находится во внутримитохондриальном нуклеотид-связывающем домене (выделена красным). В – Эволюционный анализ аминокислотных последовательностей паралога человека и белка гомолога ATM1 (*Saccharomyces cerevisiae*), Gly682 высоко консервативен во всех последовательностях. АК- аминокислота.

### 3.1.3.2. Биоинформатическое предсказание структурных изменений в белке, вызванных делецией в гене *ATP7A*

Делеция в гене *ATP7A* приводит к удалению 2 экзона, содержащего сайт инициации трансляции мажорного транскрипта. Отсутствие данного экзона приводит к усечению основной изоформы белка на первые 68 аминокислотных остатков, наличие альтернативного сайта инициации трансляции позволяет сохранить остальную часть белка. Белок, кодируемый геном *ATP7A* принадлежит к классу АТФаз типа Р, имеющий несколько изоформ. Основная изоформа *ATP7A* транспортёра, содержит 6 металл-связывающих доменов. Делеция приводит к удалению первого металл-связывающего домена и сохранению остальной части белка во всех больших изоформах *ATP7A* транспортёра (Рисунок 9). Также происходит полное нарушение рамки считывания и полная утрата двух малых минорных изоформ, функциональное значение которых неизвестно (Рисунок 3 Приложения). Ортологи гена *ATP7A* присутствуют во многих организмах от одноклеточных до многоклеточных. Первый металл-связывающий домен консервативен у большинства млекопитающих, а также у некоторых рептилий. Однако у низших эукариот и прокариот присутствует только от одного до трёх металл-связывающих доменов в ортологе *ATP7A* транспортёра. В связи с чем можно предположить, что утрата одного из доменов не разрушает функцию белка, однако может отражаться в изменении эффективности транспорта ионов меди.



**Рисунок 9.** Схематичное изображение структуры транспортёра меди АТР7А и эволюционный анализ делетируемой области, выявленной у пациентов из семьи АХ. А – структура транспортёра меди АТР7А, белок состоит из 8 трансмембранных доменов (I-VIII), формирующих ионный канал; 6 внутриклеточных медь-связывающих доменов (МД1-6) и 1 вспомогательного медь-связывающего домена (МД1А); и области характерной для медь-транспортирующей АТФазы типа Р, включающей нуклеотид-связывающий домен (N), фосфорилирующий домен (P) и домен E1-E2 АТФазы; в С-

концевой области находится PZD11-связывающий домен. В результате найденной делеции (выделена красной пунктирной линией) транспортёр АТР7А утрачивает первый медь-связывающий домен (МД1). Б – эволюционный анализ области делеции среди ортологов. В – эволюционный анализ транспортёров меди, гомологов транспортёров АТР7А и АТР7В позвоночных, у представителей более примитивных организмов, используемых в качестве модельных объектов. У большинства позвоночных АТР7А содержит 6 медь-связывающих доменов (выделены светло-голубым). У данио-рерио первый медь-связывающий домен, аннотирован как шаперон (выделен светло-красным). Область медь транспортирующей АТФазы типа Р консервативна у всех организмов (выделена тёмно-голубым у позвоночных и светло-фиолетовым у остальных), тогда как количество медь-связывающих доменов снижается у беспозвоночных животных и одноклеточных грибов (медь-связывающие домены выделены тёмно-фиолетовым, шапероны – светло-красным).

### **3.1.4. Анализ естественного нокаута ретрогена *PGAM4* и его влияние на фертильность.**

Ретроген *PGAM4* имеет специфичные для промотора последовательности ТАТА-боксов и СААТ-боксов и экспрессируется исключительно в семенниках (Illumina Human Body Map 2.0, номер доступа ArrayExpress E-MTAB-513). Также есть некоторые данные о влиянии мутаций в *PGAM4* ретрогена на мужское бесплодие, вследствие нарушения инактивации половых хромосом во время мейоза [Okuda et al., 2012], хотя есть противоположные данные [Jin et al., 2013]. Пациенты из семьи АХ являются носителями естественного нокаута *PGAM4* гена, несмотря на это, один из пациентов в родословной имеет трёх здоровых сыновей. Дополнительно были исследованы его здоровые сыновья (2 инд.), ДНК которых была доступна, на наличие исследуемой делеции. У обоих сыновей было подтверждено отсутствие делеции, что согласуется с наследованием X хромосомы по

материнской линии. Чтобы подтвердить родство данного пациента и его клинически здоровых сыновей, был проведён анализ STR генетических маркеров. Используя отечественные и коммерческие информативные STR маркеры, было подтверждено подлинное биологическое отцовство. Таким образом, отсутствие данного гена не ведёт к полному нарушению фертильности. Однако, учитывая, что все потомки пациента были мужского пола, нельзя исключать патогенный эффект потери гена на образование или поддержание сперматозоидов, несущих X-хромосому.

### **3.2. Анализ генетических причин мозжечковой атаксии в семьях AI-IV**

Дальнейший генетический анализ был проведён на ядерных (малых) семьях (AI-IV), в которых были пациенты, братья, с врождённой атаксией вследствие гипоплазии мозжечка. Заболевание у пациентов из семьи AI было выявлено с младенчества, тогда как в семьях AII и AIII первые симптомы появились в позднем детстве или в пубертатный период. Симптоматика во всех семьях была похожа, у пациентов наблюдались атаксия, дизартрия, дисдиадохокинез, неустойчивая самостоятельная походка, нарушена координация в конечностях и положительная проба Ромберга. Клиническая картина в семьях AI-IV отличается от наиболее распространённых форм мозжечковых атаксий, однако имеет большое сходство со случаями в семье AX и с описанным ранее [Zanni et al., 2012]. Подробное клиническое описание представлено в разделе “Материалы и Методы”.

#### **3.2.1. Таргетный генетический анализ кандидатных генов *ABCB7*, *ATP7A*, *PGAM4* и *ATP2B3* и найденных в них мутаций**

Клиническая картина пациентов из малых семей (AI-IV) имела большое сходство со случаем, выявленным в семье AX, и имело сходство со случаем, описанным в литературе [Zanni et al., 2012]. В связи с этим в первую очередь был проведён генетический анализ всех экзонов гена *ABCB7* с помощью

прямого секвенирования по Сэнгеру (Таблица 4). И не было выявлено ни одной из мутаций, приводящих к изменению структуры ABC-транспортера B7. Затем был проведён анализ области делеции в гене *ATP7A* и ретрогена *PGAM4* с помощью ранее разработанной системы ПЦР и последующего секвенирования по Сэнгеру. Аналогично не было выявлено никаких различий по сравнению с референсной последовательностью человека (версия сборки GRCh37). В заключение был проведён генетический анализ наличия мутации NM\_001001344.2:c.3321G4A (p.Gly1107Asp) в гене *ATP2B3*, ранее описанной в случае мозжечковой атаксии, клинически схожей с исследуемыми случаями в данной работе [Zanni et al., 2012]. В результате также не было выявлено носительства патогенного варианта и каких-либо отличий в этой области от референсной последовательности.

**Таблица 4.** Результаты генетического анализа генов *ABCB7* и *ATP7A*, *PGAM4* и *ATP2B3* у пациентов из семей AI-IV с помощью секвенирования по Сэнгеру.

Семья	Пациент	<i>ABCB7</i>	<i>ATP7A</i>	<i>PGAM4</i>	<i>ATP2B3</i>
		Все экзоны	2 экзон	1 экзон	21 экзон
AI	AI-1	Последовательность ДНК пациентов соответствует референсной последовательности генома человека (GRCh37/hg19). Мутаций не обнаружено.			
AI	AI-2				
AII	AII-1				
AII	AII-2				
AIII	AIII-1				
AIII	AIII-2				
AIV	AIV-1				

### 3.2.2. Биоинформатический анализ данных полноэкзомного секвенирования ДНК пациентов с мозжечковой атаксией

Было проведено полноэкзомное секвенирование у шести пациентов из четырёх семей из Московского и Северо-Кавказского региона. Необработанные чтения были выравнены на референсный геном человека (версия сборки GRCh37) и для пациентов из семей AI и AII было достигнуто 112-132X покрытие таргетных экзомных локусов. Для пациентов из семьи AIII было

получено 17X покрытие, тем не менее было достигнуто равномерное выравнивание чтений на целевые экзомные локусы в связи с избыточным количеством ДНК, взятой для приготовления экзомных библиотек (Таблица 1). Для каждого образца более 98,4% целевых локусов экзомов было покрыто. В среднем было выявлено 13,8 тыс. гомозиготных и 26,1 тыс. гетерозиготных вариантов на образец. Затем были отобраны варианты, которые присутствовали у обоих пациентов из одной семьи с частотой минорного аллеля (MAF)  $<0,01$  в базах данных Проекта 1000 Геномов и gnomAD [1000 Genomes Project Consortium et al., 2012; Lek et al., 2016; Karczewski et al., 2020; Karczewski et al., 2021] и которые отсутствуют в данных параллельного секвенирования здоровых индивидов лаборатории эволюционной геномики ИОГЕН РАН. Так как тип наследования в исследуемых семьях может быть либо X-сцепленным, либо аутосомно-рецессивным (Рисунок 3), были отобраны все варианты в экзоне, которые нарушают целостность кодируемого продукта или приводят к изменению аминокислотной последовательности. Среди всех гетерозиготных вариантов были отобраны только те, которые потенциально могут быть компаундными. Затем были отобраны варианты, которые соответствуют следующим критериям: расположение в эволюционно консервативных сайтах, изменение белок-кодирующей последовательности, расположение в генах, экспрессирующихся в головном мозге, в частности в мозжечке, и участвующих в развитии нейронов или связанных с мозжечковой патологией. В первую очередь внимание было уделено генам, вовлечённым в те же биологические пути, что и гены *ABCB7*, *ATP7A* и *ATP2B3*, отобранным с использованием программы GeneMania (N=51) [Warde-Farley et al., 2010]. Однако среди всех выявленных редких вариантов, ни один не был идентифицирован в качестве кандидатного.

### 3.2.2.1. Биоинформатический анализ данных полноэкзомного секвенирования ДНК пациентов из семьи АІ

В общей сложности у обоих пациентов из семьи АІ было найдено 8 редких вариантов, изменяющих аминокислотную последовательность: 1 вариант с описанным клиническим значением и 7 вариантов с неизвестным клиническим значением (Таблица 5). Первый вариант rs45439799, расположенный на X хромосоме, приводит к аминокислотной замене p.Asn1860Ser в гене *ATRX*, который связан с альфа-талассемией и умственной отсталостью. Вариант rs45439799 имеет неоднозначное клиническое значение; по более ранним данным он описывается как патогенный [Gibbons et al., 1995], но в большинстве других исследований считается доброкачественным [Landrum et al., 2018]. Кроме того, этот вариант присутствует в гемизиготном состоянии у людей из базы данных NHLBI ESP, которая включает индивидов без снижения когнитивных функций. На основании того, что клиническая картина у пациентов отличается от описанной при патологии *ATRX* и прогнозируемого «доброкачественного» статуса, маловероятно, что вариант rs45439799 привёл к атаксии в исследуемой семье. Из остальных 7 редких вариантов с неизвестным клиническим значением были исключены из дальнейшего анализа 5 вариантов (Рисунок 2 и 5 Приложения). Найденный вариант в гене *CCDC22* приводит к аминокислотной замене валина на изолейцин в положении 143, консервативность валина в данном положении невысока и вариант с изолейцином обнаружен у млекопитающих отряда прыгунчиковых. Варианты в гене *CCDC22* приводят к умственной отсталости и тяжёлой мультиорганной недостаточности, что не наблюдается у исследуемых пациентов [Starokadomskyy et al., 2013; Kolanczyk et al., 2015]. Экспрессия генов *ZNF674*, *RAB40A* и *DNAH2* чрезвычайно низка или отсутствует в мозжечке [Paratheodorou et al., 2020; Lindsay et al., 2016; GTEx Consortium, 2013; Miller et al., 2014]. Более того, усеченные варианты гена *ZNF674* присутствуют с относительно высокой частотой в NHLBI Exome Sequencing Project [Piton et al., 2013]. Ген *DNAH2* связан с другой патологией

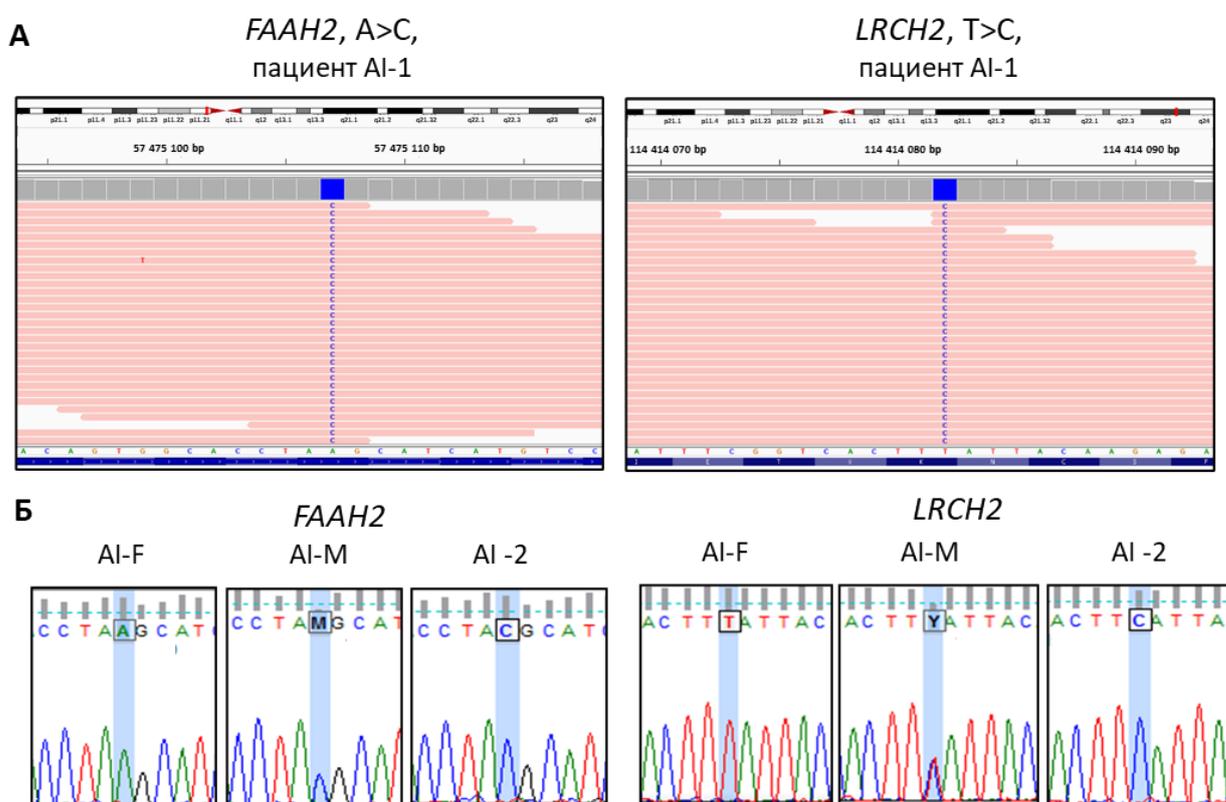
[Li et al., 2020]. Кроме того, найденные аминокислотные изменения в кодируемых продуктах генов *CCDC22* и *DNAH2* предсказаны как «допустимые» или «доброкачественные» с помощью программ SIFT и PolyPhen2.

**Таблица 5.** Редкие рецессивные варианты с неизвестным клиническим значением, выявленные в экзомах пациентов AI-1 и AI-2.

Ген	Координаты в геноме GRCh37	RS	Нукл. замена	АК замена	g/max MAF		SIFT/ PolyPhen2	CA DD	PhyloP	Заболевание, известное для гена
					1000G	gnomAD				
<b>Гемизиготные варианты</b>										
<i>ZNF674</i>	X:46359564	rs776225546	T>C	H487R	- / -	0,00003/ 0,00021 Европ.	патогенный/ возможно патоген.	24,1	6,72	X-сцепленная умственная отсталость 92 типа (OMIM: 300851)
<i>CCDC22</i>	X:49099417	rs145976849	G>A	V143I	0,0005/ 0,013 Финны	0,00024/ 0,0018 Эстонцы	допустим./ доброкач.	14,4	2,14, Г есть у прыгунчиковых	Синдром Ритчера–Шинцеля 2 типа (OMIM: 300963)
<i>FAAH2</i>	X:57475107	rs760074041	A>C	K460T	- / -	0,000095/ 0,00199 Эстонцы	допустим./ возможно патоген.	22,5	1,31, ген отс. у некот. видов	Атаксия и аутизм [Sirrs et al., 2015]
<i>RAB40A</i>	X:102755560	rs61739206	G>A	P42L	0,0032/ 0,025 Иберы	0,0058/ 0,0127 Ашкеназ.	патогенный / вероятно патоген.	19,2	4,17, ген отс. у некот. видов	-
<i>LRCH2</i>	X:114414082	-	T>C	K258E	- / -	- / -	патогенный / возможно патоген.	-	7,35	-
<b>Гетерозиготные варианты, потенциальные компаундные</b>										
<i>DNAH2</i>	17:7644167	rs34511268	T>C	Y516H	0,0010/ 0,016 Колумб.	0,0029/ 0,013 Эстонцы	допустим./ доброкач.	25,0	4,74	Мужское бесплодие 45 типа (OMIM: 619094)
	17:7669761	rs35788701	G>A	E1213K	0,0068/ 0,029 Гуджар.	0,017/ 0,024 Финны	- /доброкач.	23,1	5,41	

Два варианта с неизвестной клинической значимостью соответствуют заданным критериям и в связи с чем были отобраны для дальнейшего

исследования. Первый вариант, hg19 chrX:g.114414082T>C (NM\_020871.4:c.772A>G), был идентифицирован в высоко консервативной области гена *LRCH2* (содержащий богатые лейцином повторы и кальпонин гомологичный домен 2) (Рисунок 10). Вариант приводит к аминокислотной замене лизина в высоко консервативном положении 258 на глутаминовую кислоту (p.Lys258Glu). Найденный вариант отсутствует в базах данных Проекта 1000 Геномов, gnomAD и dbSNP, а также у здоровых индивидов в данных лаборатории эволюционной геномики. Данный вариант был предсказан как «патогенный» и «возможно патогенный» с помощью программ SIFT и PolyPhen2 [Sim et al., 2012; Adzhubei et al., 2010]. Ген *LRCH2* эволюционно высоко консервативен и экспрессируется в различных областях мозга, включая мозжечок [Lindsay et al., 2016; GTEx Consortium, 2013; Miller et al., 2014] (Рисунок 2 и 6 Приложения). Таким образом, данный ген был выбран для дальнейшего анализа.



**Рисунок 10.** Идентификация редких кандидатных вариантов в семье AI. А – Визуализация областей генома, содержащих миссенс варианты в генах *FAAH2*

(hg19 chrX:g. 57475107A>C) и *LRCH2* (hg19 chrX:g.114414082T>C) с помощью программы IGV. Б – Проверка кандидатных гемизиготных вариантов у пациентов I-1 и I-2, гетерозиготных вариантов у их матери (I-M) и гемизиготных вариантов дикого типа у их отца (I-F).

Второй вариант, hg19 chrX:g.57475107A>C (NM\_174912.4:c.1379A>C, rs760074041), был обнаружен в гене *FAAH2* (гидролаза амидов жирных кислот 2). Выявленный вариант приводит к аминокислотной замене лизина на треонин в положении 460 (p.Lys460Thr) в белке FAAH2 (Рисунок 10). Предсказание биоинформатических программ оказались различны: вариант был предсказан как «допустимый» с помощью программы SIFT [Sim et al., 2012] и «возможно патогенный» – PolyPhen2 [Adzhubei et al., 2010]. Ген *FAAH2* отсутствует в геноме некоторых животных, например, у мышей. Однако аминокислота лизин сохраняется во всех ортологичных генах (Рисунок 7 Приложения). Ген *FAAH2* экспрессируется в различных тканях, включая мозжечок [Lindsay et al., 2016; GTEX Consortium, 2013; Miller et al., 2014]. Кроме того, есть описание одного пациента, у которого редкий вариант в гене *FAAH2* связан с врождённой атаксией и аутизмом [Sirrs et al., 2015]. Замена аланина на серин в положении 458 (p.Ala458Ser) у пациента с врождённой атаксией и аутизмом была локализована на расстоянии 2 аминокислот от замены p.Lys460Thr в исследуемой семье АI. Несмотря на некоторые различия в фенотипах, в обоих случаях наблюдалась врождённая атаксия, поэтому этот вариант был выбран для дальнейшего анализа. С помощью секвенирования по Сэнгеру было подтверждено, что выбранные варианты в генах *FAAH2* и *LRCH2* являются гемизиготными у обоих пациентов, гетерозиготными у их матери и отсутствуют у их отца (Рисунок 10).

### **3.2.2.2. Биоинформатический анализ данных полноэкзомного секвенирования ДНК пациентов из семей АII и АIII**

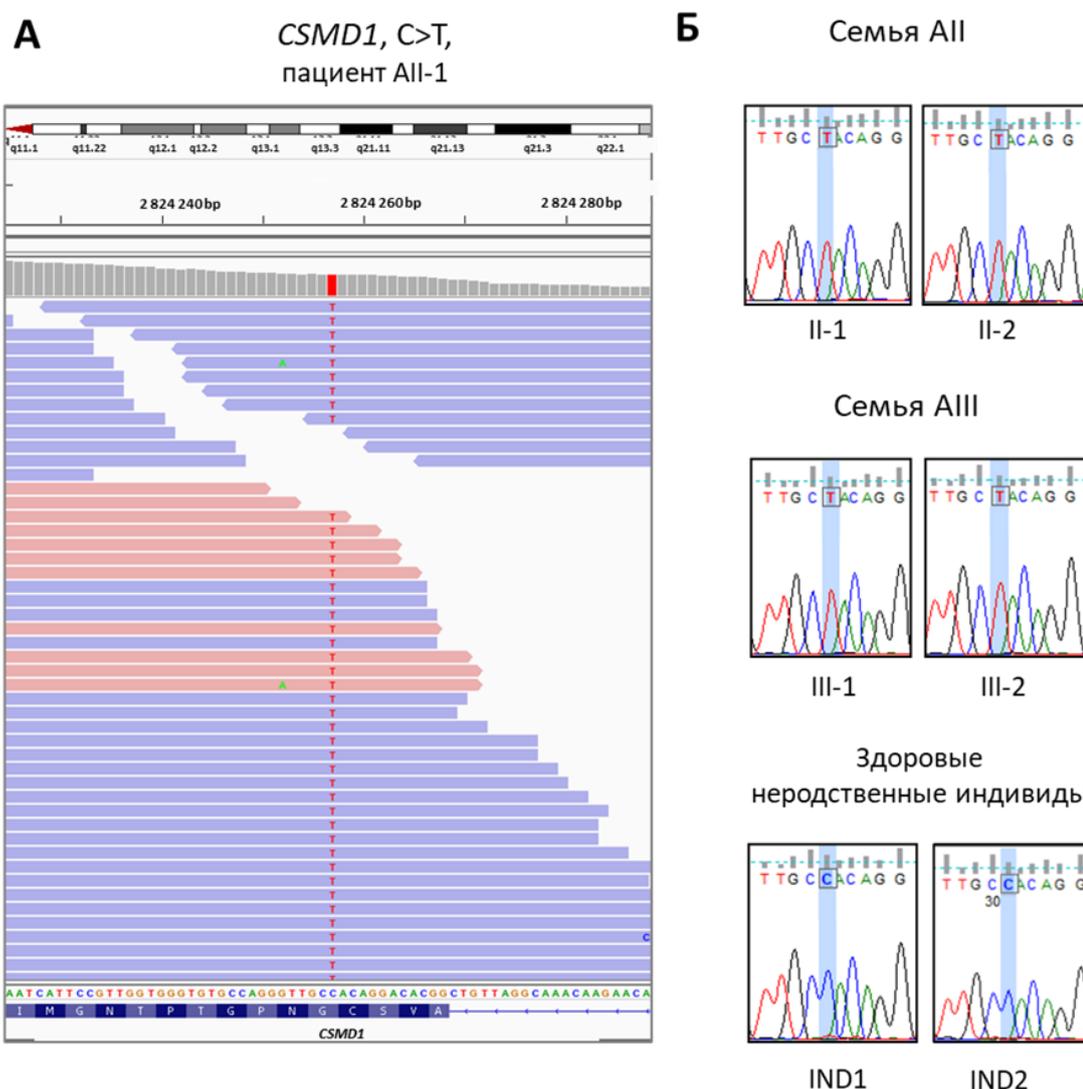
Северо-Кавказские семьи АII и АIII не являются родственными и принадлежат к разным этническим группам. Поэтому в начале генетический

анализ проводился отдельно для каждой семьи. В результате было найдено несколько редких вариантов, которые были исключены в связи с несоответствием заданным критериям. В семье АII было проведено экзомное секвенирование ДНК пациента АII-1, у которого были выявлены редкие несинонимичные варианты в генах *FECN* и *HEPH*, вовлеченных в тот же биологический путь, что и ген *ABCB7*, – биосинтез гемоглобина [Chiabrando et al., 2020; Taketani et al., 2003; Maio et al., 2019]. Гомозиготный вариант в гене *FECN*, кодирующем фермент феррохелатазу, является патогенным и приводит к эритропоэтической протопорфирии [Lamoril et al., 1991]. Другой вариант был обнаружен в гене *HEPH*, кодирующем белок гефестин, патология которого связана с тяжёлой микроцитарной анемией у мышей [Vulpe et al., 1999; Zheng et al., 2018; Chen et al., 2019]. Оба гена экспрессируются в головном мозге, но нет данных о дефектах этих генов, приводящих к патологии головного мозга. Оба варианта были валидированы с помощью секвенирования по Сэнгеру у пациента АII-1. Однако отсутствовали у его младшего брата, пациента АII-2. Таким образом, данные варианты не связаны с патологией мозжечка в этой семье.

В семье АIII было проведено экзомное секвенирование ДНК пациентов АIII-1 и АIII-2. У обоих пациентов был идентифицирован вариант rs61752387 в гене *MESP2*. Хотя данный ген связан с тяжёлой неонатальной энцефалопатией с микроцефалией и синдромом Ретта, выявленный вариант был зарегистрирован у здоровых людей и имеет статус «доброкачественный» в большом количестве исследований в базе данных ClinVar [Amano et al., 2000; Lee et al., 2001; Laccone et al., 2002; Kleefstra et al., 2004].

Один редкий гомозиготный миссенс вариант, hg19 chr8:g.2824257 C>T ((NM\_033225.6:c.8935G>A, rs117633452) в гене *CSMD1* (множественные домены CUB и Sushi 1, CUB and Sushi multiple domains 1), присутствовал у всех четырёх пациентов из двух семей и соответствовал всем критериям для дальнейшего анализа (Рисунок 11). Выявленный вариант приводит к

аминокислотной замене глицина на серин в высоко консервативной области p.Gly2979Ser (Рисунок 8 Приложения). Данный вариант предсказан «допустимым» в самом длинном транскрипте и «патогенным» в одном альтернативном транскрипте с помощью программы SIFT, тогда как с помощью программы PolyPhen2 данный вариант предсказан как «наиболее вероятно патогенный» во всех затронутых транскриптах. MAF для варианта rs117633452 составляет 0,0042 в базе данных Проекта 1000 Геномов и 0,0055 в базе данных gnomAD. Найденный вариант отсутствует в гомозиготном состоянии в базе данных Проекта 1000 геномов [1000 Genomes Project Consortium et al., 2012] и в контрольной группе в базе данных gnomAD [Karczewski et al., 2020; Karczewski et al., 2021]. Ген *CSMD1* экспрессируется в различных областях мозга, включая мозжечок [Lindsay et al., 2016; GTEx Consortium, 2013; Miller et al., 2014] (Рисунок 10 Приложения). *CSMD1* ассоциирован с шизофренией, аутизмом, когнитивными расстройствами и различными видами рака [Woo et al., 2020; Gialeli et al., 2018]. Данных о врождённых заболеваниях, вызванных мутациями в данном гене, не было.



**Рисунок 11.** Идентификация редкого варианта в гене *CSMD1* в семьях АII и АIII. А – Визуализация области генома, содержащей кандидатный миссенс вариант (hg19 chr8:g.2824257 C>T, rs117633452) с помощью программы IGV. Б – Проверка кандидатных гомозиготных вариантов у пациентов (II-1, II-2, III-1 и III-2) и гомозиготных вариантов дикого типа у здоровых неродственных индивидов (IND1-2).

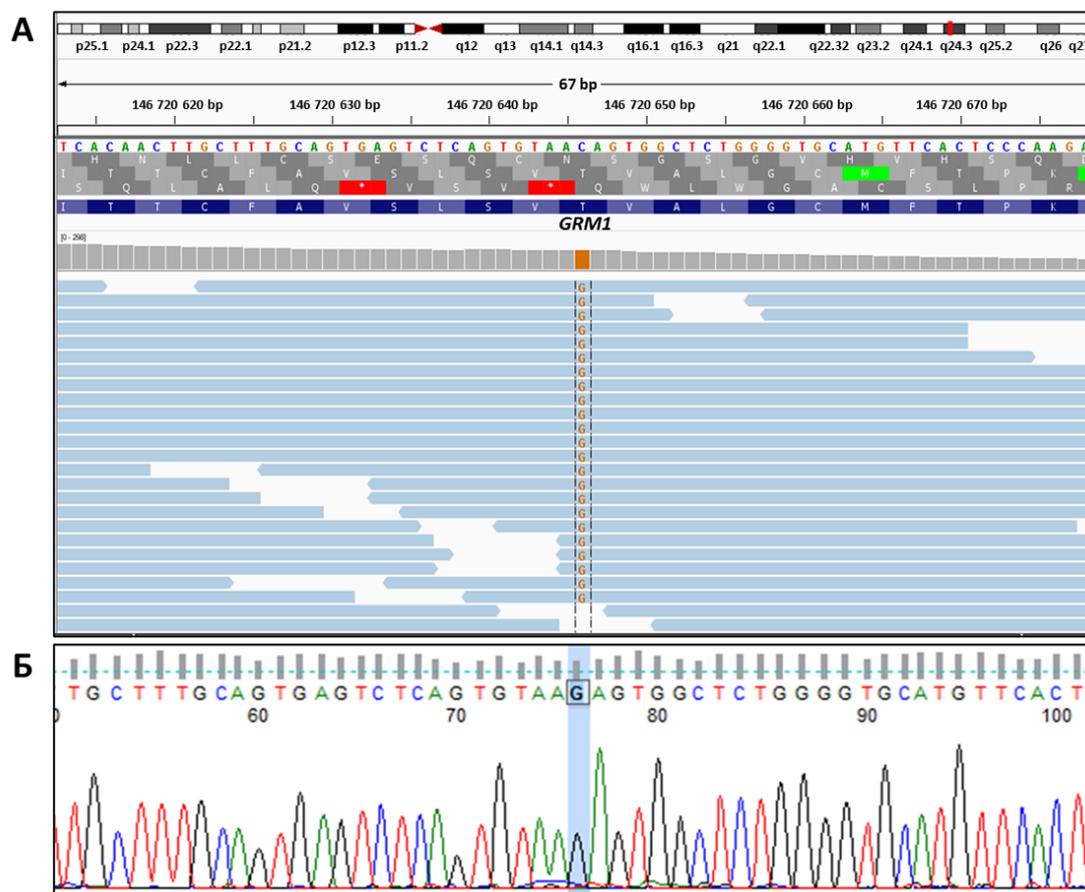
Обе семьи АII и АIII произошли из Северо-Кавказского региона России. Чтобы определить, имеет ли данный вариант общее происхождение в результате эффекта основателя или имеет независимое происхождение и является мутационной «горячей точкой», были проанализированы гомозиготные варианты в экзомных данных пациентов из обеих семей АII и

АIII. Был обнаружен гомозиготный участок размером 911,088 т.п.н. у пациентов из обеих семей. И поэтому можно предположить, что наличие исследуемого минорного варианта в семьях АII и АIII является результатом эффекта основателя. В связи с этим можно предположить, что частота данного минорного аллеля может быть повышена в популяциях Северного Кавказа. Для этого было проведено сравнение частоты в популяциях из конкретного региона и в мировой популяции. Общий MAF rs117633452 составляет 0,005932 для 60 703 человек из ExAC v.1.0 [Lek et al., 2016; Karczewski et al., 2017]. Аналогично MAF данного варианта составляет 0,0056 у 533 человек с Кавказа по данным базы данных Браузера RuSeq (<http://ruseq.ru>, Barbitoff et al., 2021, medRxiv). Для оценки MAF варианта rs117633452 среди населения Северного Кавказа из географического региона, совпадающего с анализируемыми семьями, было проведено генотипирование данного варианта с помощью секвенирования по Сэнгеру у 42 неродственных индивидов без неврологических нарушений. В результате не было выявлено носителей минорного аллеля. В связи с чем MAF в кавказских популяциях не превышает 0,0119. Таким образом, найденный вариант может быть фактором риска редкого заболевания.

### **3.2.2.3. Биоинформатический анализ данных полноэкзомного секвенирования ДНК пациента из семьи AIV**

У пациента AIV-1 был найден новый гомозиготный миссенс вариант hg19 chr6:g.146720646 C>G (NM\_000838.2:c.2471C>G), отсутствующий в базах данных 1000 Геномов, gnomAD и dbSNP, в гене *GRM1* (Рисунок 12). Мутации в данном гене вызывают аутосомно доминантную спиноцеребеллярную атаксию 44, SCA44 (OMIM 617691), и аутосомно-рецессивную спиноцеребеллярную атаксию 13, SCAR13 (OMIM 614831). Найденный вариант расположен в высоко консервативной области (PhyloP счёт 7,7842, Рисунок 9 Приложения). С помощью программ SIFT и PolyPhen новый вариант предсказан как “патогенный” и “наиболее вероятно

патогенный”. Вариант подтверждён с помощью секвенирования по Сэнгеру и отобран для дальнейшего анализа.



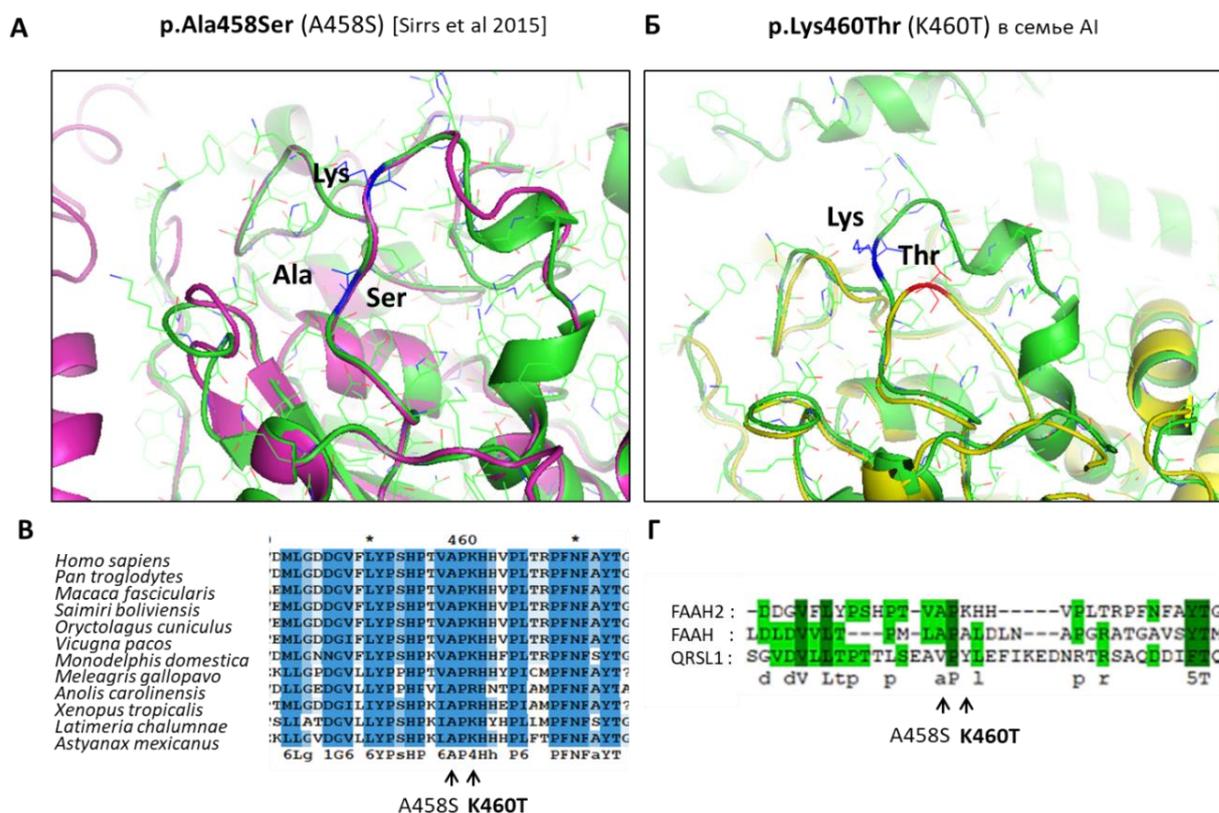
**Рисунок 12.** Идентификация нового варианта в гене *GRM1* у пациента AIV-1. А – Визуализация области генома, содержащей кандидатный миссенс вариант (hg19 chr6:g.146720646 C>G) с помощью программы IGV. Б – Проверка кандидатного гомозиготного варианта у пациента AIV-1 с помощью секвенирования по Сэнгеру.

### 3.2.3. Биоинформатическое предсказание структурных изменений в белках с выявленными вариантами в семьях AI-IV

Чтобы предсказать, какое влияние на пространственную структуру белков могут оказывать найденные варианты, и установить, какие варианты наиболее опасны и могут быть связаны с нарушениями развития мозжечка, был проведён анализ пространственной структуры белков кандидатных генов.

### **3.2.3.1. Биоинформатическое предсказание структурных изменений в белке, вызванных однонуклеотидной заменой в гене *FAAH2***

Было проведено предсказание пространственной структуры белка *FAAH2*, содержащего один из минорных вариантов, опубликованный ранее канадскими авторами p.Ala458Ser [Sirrs et al., 2015] и обнаруженный в семье AI p.Lys460Thr, а также была предсказана пространственная структура *FAAH2*, содержащая варианты дикого типа. Оба варианта расположены в консервативной области амидазного домена. Предсказание структуры с помощью iTasser не выявило различий между анализируемыми структурами белков. Анализ пространственной структуры с использованием Phyre2 предсказал, что замена p.Lys460Thr уменьшает близлежащую альфа-спираль (Рисунок 13). Такой же результат был получен для патогенного варианта p.Ala458Ser. Тестирование чувствительности сайта к мутации с помощью программы Phyre2 показало, что замена Ala458 на любую другую аминокислоту, за исключением пролина, неблагоприятна, тогда как замена Lys460 на другие аминокислоты менее критична. Сравнение белков, содержащих амидазные домены, показало, что сайт Ala458 более консервативен, чем сайт Lys460.

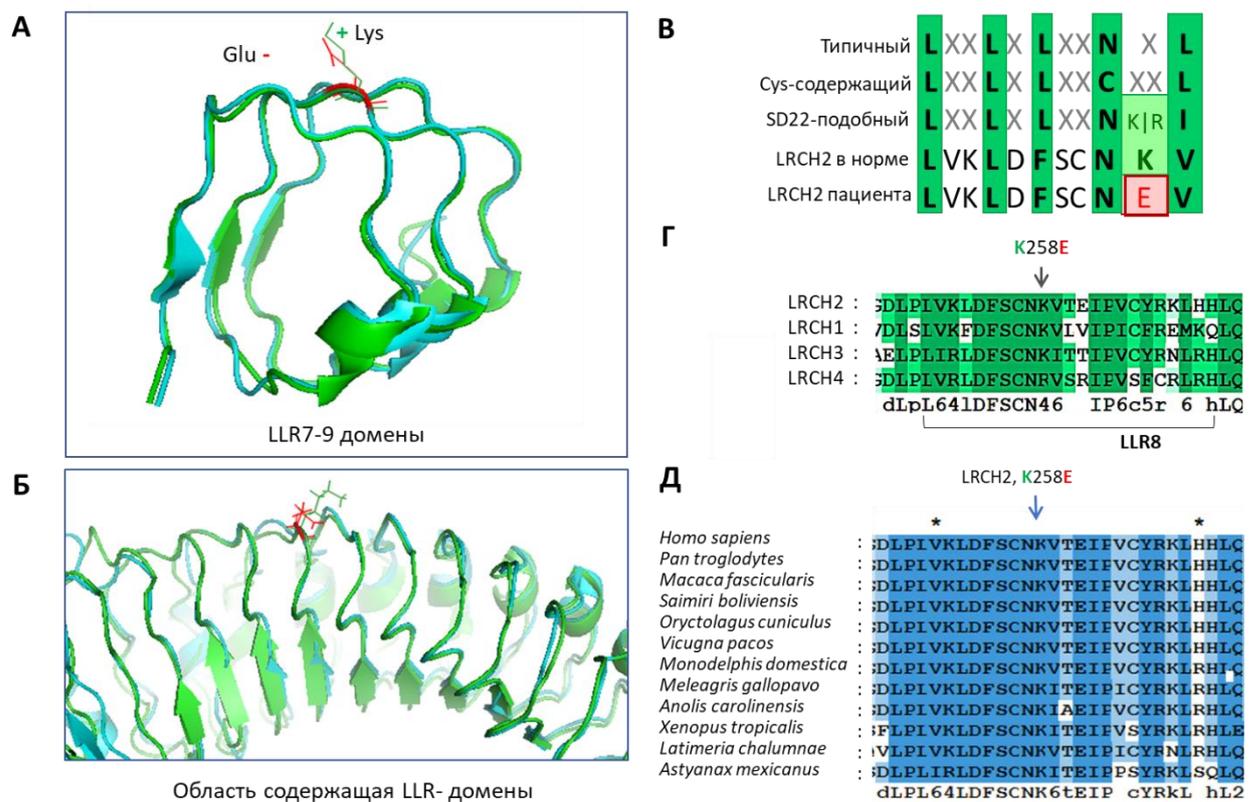


**Рисунок 13.** Анализ влияния аминокислотных замен p.Ala458Ser и p.Lys460Thr на структуру белка FAAN2. А, Б – Предсказание пространственной структуры белка FAAN2 с помощью Phyre2 (зелёным выделен белок дикого типа; фиолетовым – белок, содержащий замену p.Ala458Ser [Sirrs et al., 2015]; жёлтым – белок с заменой, выявленной в семье AI). В, Г – Эволюционный анализ консервативности области белка FAAN2, содержащей аминокислотные замены p.Ala458Ser (A458S) и p.Lys460Thr (K460T), среди ортологов (В) и паралогов (Г).

### 3.2.3.2. Биоинформатическое предсказание структурных изменений в белке, вызванных однонуклеотидной заменой в гене *LRCH2*

Аминокислотная замена p.Lys258Glu в белке LRCH2 происходит в высоко консервативной области лейцин-богатого повтора (LRR8). Анализ пространственной структуры не выявил каких-либо изменений в белке, содержащем варианты дикого типа и мутантный (Рисунок 14). Однако эволюционный анализ семейства белков LRCH показал, что домен LRR8 является консервативным и содержит только аминокислоты с положительно

заряженной боковой цепью (лизин или аргинин) в этом положении (Рисунок 14Г). Более того, повтор LRR8 в белке LRCH2 классифицируется как SD22-подобный; при этом типе LRR в исследуемом положении остаются только аминокислоты с положительной боковой цепью (лизин или аргинин) (Рисунок 14В) [Kajava, 1998; Rivière et al., 2020; Kobe, Kajava, 2001; Ng et al., 2011]. Найденный вариант приводит к замене на отрицательно заряженную глутаминовую кислоту. Таким образом, эта замена может влиять на аффинность связывания LRCH2 с взаимодействующими с ним белками.

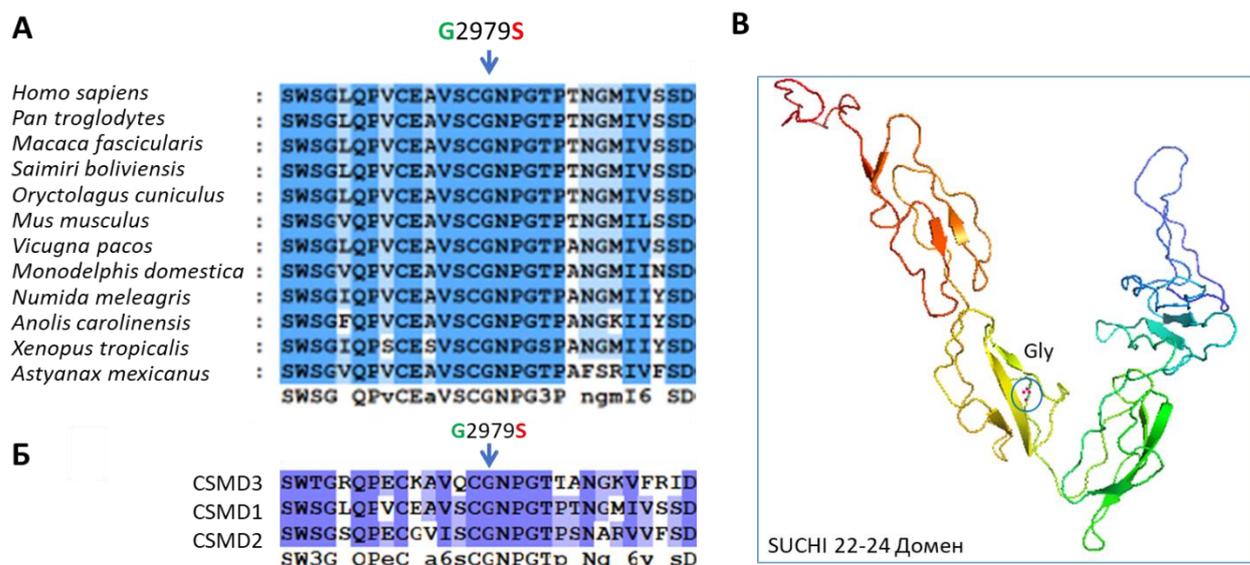


**Рисунок 14.** Анализ влияния аминокислотной замены p.Lys258Glu на структуру белка LRCH2. А, Б – Предсказание пространственной структуры области белка LRCH2, содержащей лейцин богатые повторы LRR7-9 (А) и всей области LRR целиком (Б) с помощью программы Phyre2. Выравнивание доменов белков LRCH2, содержащих положительно заряженный лизин вариант дикого типа (выделен зелёным) и мутантный вариант, отрицательно заряженную глутаминовую кислоту (выделена красным), в положении 258, выполнено с использованием программного обеспечения PyMOL. В – Анализ

положения замены в лейцин богатых повторах, LRR, где L — Leu, Ile, Val или Phe; N — Asn, Thr, Ser или Cys; C — Cys, Ser или Asn [Kajava, 1998; Rivière et al., 2020; Kobe, Kajava, 2001; Ng et al., 2011]; мутантный вариант E — Glu. Г - Эволюционный анализ консервативности семейства белков LRCH в области аминокислотной замены p.Lys258Glu (K258E). Д - Эволюционный анализ консервативности белков ортологов LRCH2 в области, содержащей аминокислотную замену p.Lys258Glu.

### **3.2.3.3. Биоинформатическое предсказание структурных изменений в белке, вызванных однонуклеотидной заменой в гене *CSMD1***

Миссенс вариант rs117633452 приводит к замене p.Gly2979Ser во внеклеточном Суши домене 23 (sushi 23, комплемент-взаимодействующий домен) в белке *CSMD1*. Данный вариант сохраняется у всех ортологов и паралогов (Рисунок 15). Однако в результате анализа пространственной структуры белка не было выявлено каких-либо различий в областях, содержащих дикий тип или минорный варианты. В одном исследовании в семьях с поздними формами болезни Паркинсона были выявлены гетерозиготные варианты в домене модуля белка контроля комплемента (ССР) *CSMD1*, а у некоторых пациентов заболевание осложнялось дизартрией, атаксией и нарушениями ходьбы [Ruiz-Martínez et al., 2017]. *CSMD1* с помощью своего ССР-модуля может ингибировать классический путь комплемента, ингибируя накопление основного компонента комплемента C3 на клеточной поверхности [Kraus et al., 2006; Kraus et al., 2007; Escudero-Esparza et al., 2013]. Более того, удаление ССР в *CSMD3* приводит к уменьшению плотности шипиков и разветвлений дендритов [Mizukami et al., 2016]. Поскольку вариант обнаружен в высоко консервативной области домена, предназначенного для взаимодействия с другими белками, найденная замена p.Gly2979Ser, скорее всего, влияет на эффективность этого взаимодействия.

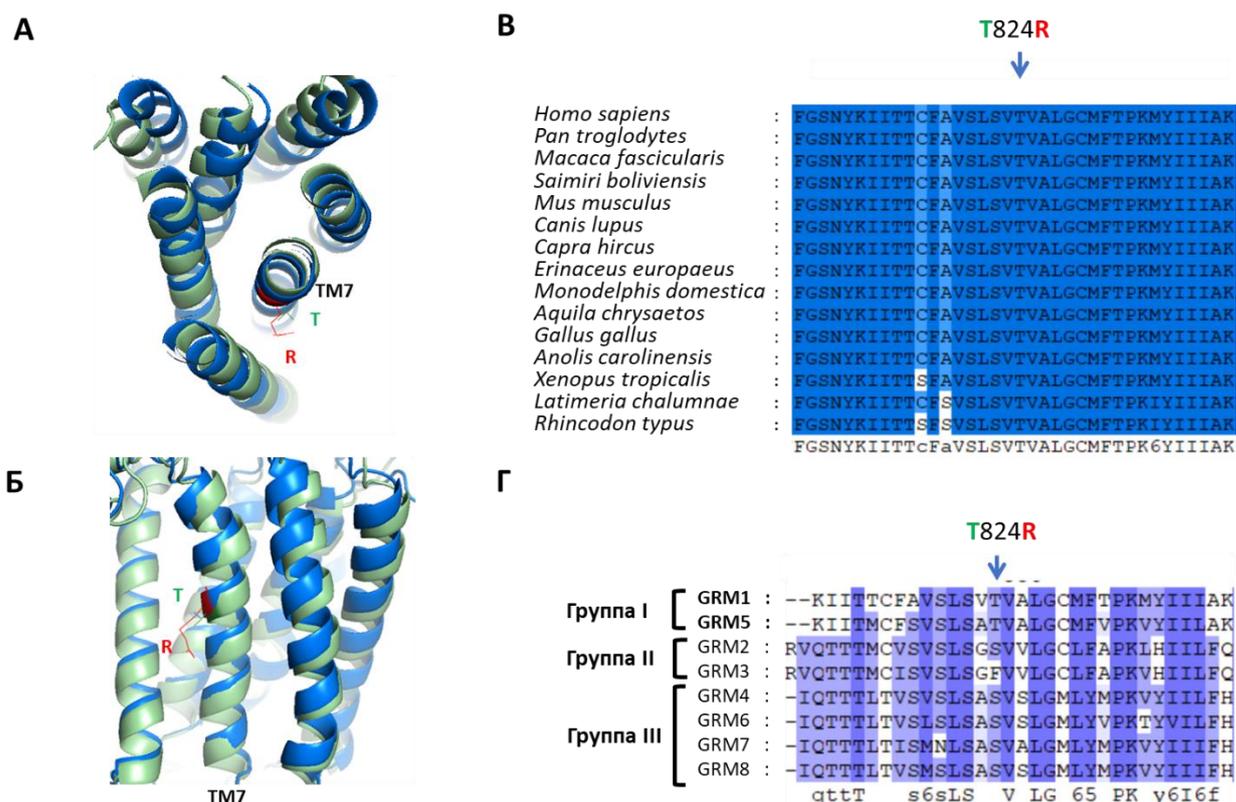


**Рисунок 15.** Анализ влияния аминокислотной замены p.Gly2979Ser (G2979S) на структуру белка CSMD1. А, Б – Эволюционный анализ консервативности области белка CSMD1, содержащей данную замену, среди ортологов (А) и паралогов (Б). В – Предсказание пространственной структуры области Suchi домена дикого типа, в котором найдена аминокислотная замена, с использованием программы Phyre2.

### 3.2.3.4. Биоинформатическое предсказание структурных изменений в белке, вызванных однонуклеотидной заменой в гене *GRM1*

Нуклеотидная замена C>G в гене *GRM1* приводит к аминокислотной замене треонина на аргинин в положении 824 (p.Thr824Arg) в длинной (альфа) и короткой (бета) изоформах глутаматного метаботропного рецептора 1 (mGluR1). Треонин расположен в большой высоко консервативной области и присутствует у всех проанализированных ортологов от круглоротых до приматов (Рисунок 16). Треонин также консервативен в обеих изоформах mGluR5, который вместе с mGluR1, составляют группу I постсинаптических глутаматных метаботропных рецепторов, повышающих активность рецептора NMDA [Мао et al., 2022]. В остальных метаботропных глутаматных рецепторах вместо треонина в данном положении находится наиболее близкая ей по структуре аминокислота серин, за исключением рецептора mGluR3, в котором в данном положении незаряженная гидрофобная аминокислота

фенилаланин. Замена р.Thr824Arg происходит в 7-ом трансмембранном домене (TM7), формирующем метаботропный канал. Полное удаление TM7 приводит к нарушению структуры mGluR1 и форме SCAR13, которая была описана ранее в семье из Рима, в результате 3 п.н. делеции в 8 экзоне в сочетании с мутацией в сайте сплайсинга интрона 8 [Guerguelcheva et al., 2012]. TM7 необходим для присоединения лигандов, которые модулируют передачу сигналов, действуя как положительные или отрицательные аллостерические модуляторы [Wu et al., 2014; Pin et al., 2016; Koehl et al., 2019; Zhang et al., 2021]. Аргинин по сравнению с треонином имеет длинную электрически положительно заряженную цепь, которая может образовывать избыточные водородные или ионные связи и, предположительно, может мешать функциональному взаимодействию с лигандом.



**Рисунок 16.** Анализ влияния замены р.Thr824Arg (T824R) на структуру mGluR1. А, Б – Пространственная структура трансмембранной области, содержащей данную замену, структура белка предсказана с помощью Phyre2 (зелёным цветом выделен белок с вариантом дикого типа; синим – с

мутантным вариантом). В, Г – Эволюционный анализ области mGluR1, содержащей данную замену, среди ортологов (В) и паралогов (Г).

### **3.2.4. Сравнительный анализ данных экспрессии генов и их паралогов**

Функция отобранных генов-кандидатов и их роль во врождённой гипоплазии мозжечка на настоящий момент изучены недостаточно. Чтобы сделать точные прогнозы и определить гены-кандидаты, был разработан подход, основанный на анализе и сравнении с их паралогами, используя накопленные знания о функциональных данных и данных экспрессии.

Для анализа генной избыточности и определения генов-кандидатов при редких моногенных заболеваниях была разработана онлайн-программа «Основной Паралог по Экспрессии» «Essential Paralogue by Expression» (EPbE). В основе данной программы лежит следующий алгоритм: EPbE оценивает, могут ли паралоги заданного гена-кандидата потенциально компенсировать потерю экспрессии его мажорной изоформы дикого типа. Такой анализ основан на наборе паралогов гена-кандидата, которые могут выполнять те же функции, что и ген-кандидат, и их экспрессии. EPbE получает предсказания паралогов из «Ортологической матрицы» (ОМА) [Altenhoff et al., 2021]. Алгоритм ОМА использует три этапа: оценка гомологичных последовательностей, определение ортологичных пар и идентификация ближайших гомологов на основе эволюционных расстояний. Однако функции многих генов и их паралогов в геноме человека точно не известны, и паралоги могут выполнять неидентичные функции. Поэтому необходимо также оценить опубликованные функциональные исследования этих генов. EPbE использует данные экспрессии генов в разных областях мозга и в разном возрасте из проекта «Нормальное развитие мозга» (BrainSpan) [Miller et al., 2014]. EPbE выполняет статистический анализ экспрессии паралогов с помощью теста Данна «многие к одному» и корректирует Р значения с помощью одноэтапного метода. Для проверки программы EPbE было выбрано несколько известных

генов, связанных со SCAR, которые имеют паралоги с доказательствами их избыточности: *SYNE1* и *SNX14* (Таблица 6А).

**Таблица 6.** Гены, связанные со SCAR, и их паралоги по данным ОМА, использованные для тестирования программы EPbE.

А. Гены и их паралоги, которые частично компенсируют друг друга				
Ген	Описание	Заболевание	Аббревиатура	Источник
<i>SYNE1</i>	Несприны, белки ядерной оболочки, содержащие спектриновые повторы, имеют несколько изоформ и играют важную роль в локализации ядра.	Аутосомно-рецессивная спиноцеребеллярная атаксия 8-го типа	SCAR8	OMIM: 610743
<i>SYNE2</i>		Аутосомно-доминантная мышечная дистрофия Эмери-Дрейфуса 5-го типа	EDMD5	OMIM: 612999
<i>SNX14</i>	Сортирующие нексины являются центральными регуляторами клеточного трафика и передачи сигналов.	Аутосомно-рецессивная спиноцеребеллярная атаксия 20-го типа	SCAR20	OMIM: 616354
<i>SNX13</i>		Задержка развития	-	PMID: 34879376
<i>SNX15</i>			-	
Б. Гены и их паралоги с дивергентными функциями				
Ген	Описание	Заболевание	Аббревиатура	Источник
<i>VPS13D</i>	Семейство вакуолярных белков, ассоциированных с сортировкой, 13-го типа. Исключительно <i>VPS13D</i> , но не <i>VPS13A-C</i> , необходим для нормальной митохондриальной морфологии и поддержания пероксисом	Аутосомно-рецессивная спиноцеребеллярная атаксия 4-го типа	SCAR4	OMIM: 607317
<i>VPS13C</i>		Болезнь Паркинсона 23-го типа, аутосомно-рецессивная форма с ранним началом	PARK23	OMIM: 616840
<i>SPTBN2</i>	$\beta$ III-спектрин играет важную роль в формировании цитоскелета узкой шеи дендритных шипиков. Кроме того, комплекс $\alpha$ II/ $\beta$ III регулирует ориентацию дендритных отростков клеток Пуркинье	Аутосомно-рецессивная спиноцеребеллярная атаксия 14-го типа; Спинаocereбеллярная атаксия 5-го типа	SCAR14; SCA5	OMIM: 615386; OMIM: 600224
<i>SPTB</i>	$\beta$ -спектрин	Эллиптоцитоз 3-го типа; Сфероцитоз 2-го типа	EL3; SPH2	OMIM: 617948; OMIM: 616649
<i>SPTBN1</i>	$\beta$ II-спектрин	Задержка развития, нарушение речи и поведенческие аномалии	DDISBA	OMIM: 619475
<i>SPTBN4</i>	$\beta$ IV-спектрин	Нарушение развития нервной системы с гипотонией, невропатией и глухотой	NEDHND	OMIM: 617519

Гены, связанные со SCAR, выделены жирным шрифтом.

*SYNE1* и его паралог *SYNE2* кодируют белки спектриновых повторов ядерной оболочки (несприны), которые участвуют в закреплении миоядер и иннервации двигательных нейронов. В экспериментах на мышах только при двойном нокауте генов *SYNE1* и *SYNE2* происходила гибель особей сразу после рождения, в то время как мыши с одиночным нокаутом были

жизнеспособны и фертильны [Zhang et al., 2007]. Что свидетельствует о том, что паралоги *SYNE1* и *SYNE2* могут компенсировать друг друга. Ген *SNX14* и его паралоги *SNX13* и *SNX25* кодируют нексины, участвующие в клеточной передаче сигналов, метаболизме липидов и аутофагии. *SNX14*, *SNX13* и *SNX25* имеют очень схожую структуру белковых доменов, а в недавнем функциональном исследовании было показано наличие избыточности генов [Lauzier et al., 2022]. В качестве отрицательного контроля были протестированы гены, функции которых отличаются от их паралогов: *VPS13D* и *SPTBN2* [Baldwin et al., 2021; Efimova et al., 2017, Armbrust et al., 2014, Fujishima et al., 2020] (Таблица 6Б). Ген *VPS13D* на основе гомологии у млекопитающих имеет три паралога (*VPS13A*, *B* и *C*), однако алгоритмом ОМА был предсказан как паралог только *VPS13C*. Эти гены участвуют в транспорте, осуществляемом аппаратом Гольджи. Из всех паралогов только полная потеря *VPS13D* является летальной для эмбрионов мышей, мух и клеток человека [Baldwin et al., 2021, Anding et al., 2018, Seong et al., 2018]. Было показано, что *VPS13D* играет ключевую роль в морфологии митохондрий и биогенезе пероксисом [Baldwin et al., 2021]. *SPTBN2* кодирует  $\beta$ III-спектрин, который участвует в формировании цитоскелета, нейрональных проекций и синапсов [Efimova et al., 2017, Armbrust et al., 2014]. Для регуляции ориентации дендритов клеток Пуркинье необходимо образование комплекса  $\beta$ III-спектрина с ближайшим паралогом –  $\alpha$ II-спектрином, в случае нокаута одного из генов происходит значительное уменьшению плотности обоих белков в клетках Пуркинье и нарушение ветвления дендритов [Fujishima et al., 2020].

Экспрессию в коре мозжечка всех выбранных генов и их паралогов на разных стадиях онтогенеза от внутриутробного развития до взрослых анализировали с помощью ЕРЬЕ (Таблица 7). Для генов *SYNE1* и *SNX14*, паралоги которых частично компенсируют друг друга, был определён статистически значимо более высокий уровень экспрессии в коре мозжечка, чем для их паралогов, и это различие соответствует началу заболевания. В то же время гены с дивергентными функциями с их паралогами (отрицательный

контроль) не были идентифицированы с помощью EРbE. Таким образом, данная программа полезна для поиска генов-кандидатов путём анализа экспрессии паралогов, а предсказание более высокого уровня экспрессии по сравнению с их паралогами в определённой области мозга может быть связано с конкретной патологией.

**Таблица 7.** Сравнение экспрессии генов, связанных со SCAR, и их паралогов в коре мозжечка с использованием программы EРbE.

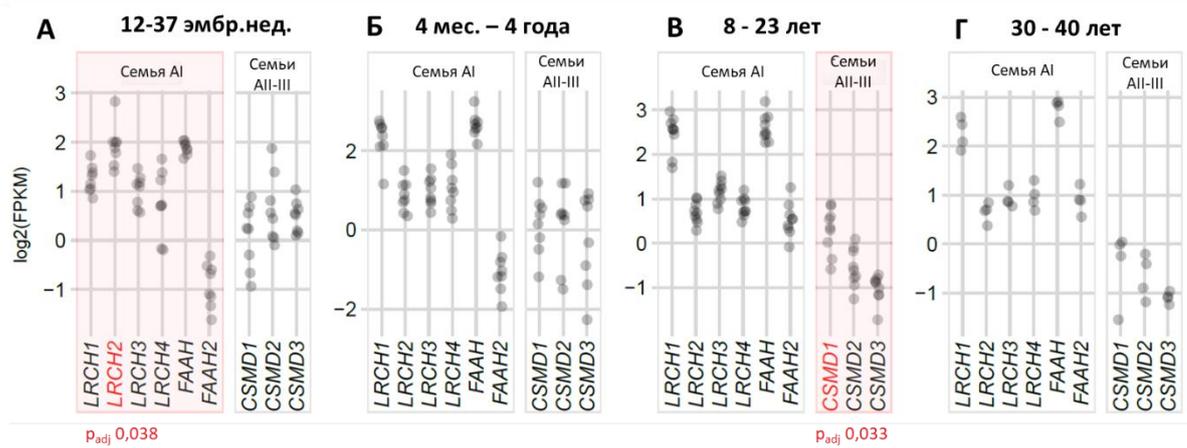
Заболевание	Начало заболевания	Ген св. с заб. (ген-кандидат)	OMA паралог гена-кандидата	Сравнение экспрессии гена-кандидата и паралога	Возраст					EРbE Предсказание
					8-37 эмбр. нед.	4 мес.-4 года	8-13 лет	15-23 лет	30-40 лет	
<b>А. Гены и их паралоги, которые частично компенсируют друг друга</b>										
SCAR8	с раннего детства до зрелого возраста	<i>SYNE1</i>	<i>SYNE2</i>	Р знач.	0,04	0,04	0,02	0,01	0,04	На основе данных экспрессии ген-кандидат является незаменимым паралогом с 4 месяцев до 40 лет.
				М э.п.	5,36	3,88	3,34	3,23	2,47	
				Log2FC	0,94	-1,66	-2,05	-1,84	-1,53	
SCAR20	с раннего детства	<i>SNX14</i>	<i>SNX13</i>	Р знач.	0,000014	0,0022	0,07	0,05	0,03	На основе данных экспрессии ген-кандидат является незаменимым паралогом в период пренатального развития
				М э.п.	2,00	2,07	2,21	2,38	1,83	
				Log2FC	-1,85	-1,82	-1,62	-1,63	-2,23	
			<i>SNX25</i>	Р знач.	0,04	1,00	0,78	0,56	0,97	
				М э.п.	3,63	7,45	8,10	9,25	8,37	
				Log2FC	-0,99	0,02	0,25	0,33	-0,04	
<b>Б. Гены и их паралоги с дивергентными функциями</b>										
SCAR4	с раннего детства до зрелого возраста	<i>VPS13D</i>	<i>VPS13C</i>	Р знач.	0,40	0,29	0,15	0,17	0,25	На основе данных экспрессии ген-кандидат НЕ является незаменимым паралогом
				М э.п.	3,10	3,18	3,36	3,69	2,27	
				Log2FC	-0,13	-0,35	-0,68	-0,50	-0,71	
SCAR14	с раннего детства	<i>SPTBN2</i>	<i>SPTB</i>	Р знач.	0,03	0,00	0,10	0,03	0,16	На основе данных экспрессии ген-кандидат НЕ является незаменимым паралогом
				М э.п.	4,14	15,87	19,70	22,80	17,56	
				Log2FC	-2,25	-2,15	-1,68	-1,52	-1,57	
			<i>SPTBN1</i>	Р знач.	0,26	0,76	1,00	0,89	0,97	
				М э.п.	44,92	41,43	57,74	57,67	39,83	
				Log2FC	1,19	-0,76	-0,12	-0,18	-0,39	
			<i>SPTBN4</i>	Р знач.	0,03	0,00	0,03	0,00	0,03	
				М э.п.	4,22	15,16	14,25	14,66	12,41	
Log2FC	-2,22	-2,21	-2,14	-2,16	-2,07					

Гены, связанные со SCAR (ген-кандидат), выделены жирным шрифтом. В таблице показано сравнение экспрессии генов-кандидатов и их паралогов в разном возрасте: если р значение < 0,05, то экспрессия гена-кандидата и паралога статистически различна (выделено

красным);  $M$  э.п. – среднее значение экспрессии паралога;  $\text{Log}_2\text{FC}$  – логарифм кратности изменения, если  $\text{Log}_2\text{FC} < 0$ , то экспрессия паралога ниже по сравнению с геном-кандидатом. Если в определённом возрасте экспрессия всех паралогов ниже гена-кандидата (ячейка таблицы выделена красным цветом), то предсказываемый программой EРbE ген-кандидат является незаменимым паралогом в коре мозжечка.

### **3.2.4.1. Сравнительный анализ данных экспрессии гена *FAAH2* и его паралога в мозжечке, других отделах головного и спинного мозга, а также периферических нервах**

*FAAH2* имеет паралог *FAAH* (или *FAAH1*). Оба фермента *FAAH* и *FAAH2* участвуют в гидролизе первичных амидов жирных кислот, N-ацил-этанолламинов и N-ацил-аминокислот [Cravatt et al., 1996; Saghatelian et al., 2004]. Сходство между ферментами *FAAH* и *FAAH2* составляет 20%, а область, содержащая варианты p.Ala458Ser и p.Lys460Thr, вариабельна; только первый вариант консервативен в обоих ферментах, тогда как найденный вариант p.Lys460Thr неконсервативен. Ферментативное исследование белков показало, что *FAAH* может гидролизовать тот же субстрат (олеамид или анандамид), в отношении которого *FAAH2* может быть активен [Wei et al., 2006; Sirrs et al. 2015; Cravatt et al., 1996; Saghatelian et al., 2004]. Таким образом, отсутствие гена *FAAH2* может быть компенсировано его паралогом *FAAH*. Гипоплазия мозжечка связана с повреждением генетических факторов, действующих в эмбриональный период, однако в этот период экспрессия гена *FAAH2* в мозжечке чрезвычайно низка, в отличие от экспрессии гена *FAAH* (Рисунок 17А). Таким образом, маловероятно, что идентифицированный вариант в гене *FAAH2* вносит существенный вклад в гипоплазию мозжечка, однако полностью исключить модифицирующий эффект мутантного гена нельзя.



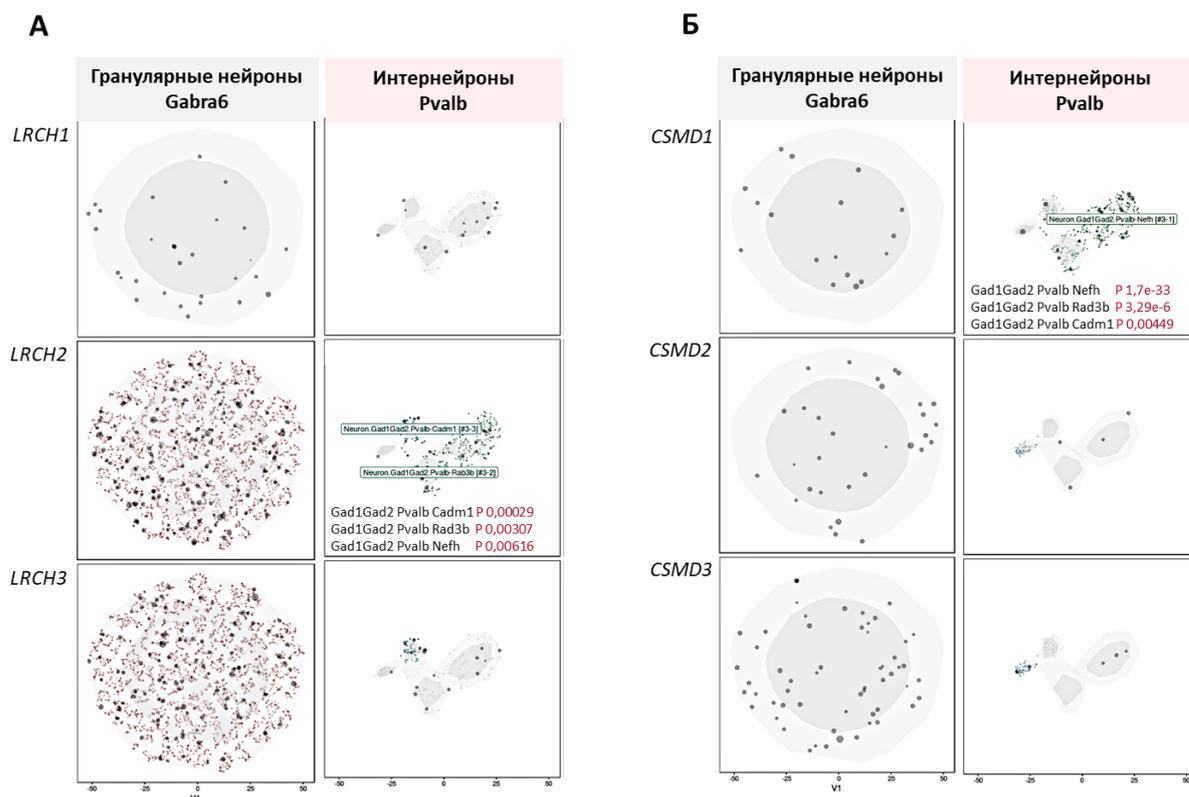
**Рисунок 17.** Экспрессия генов-кандидатов и их паралога в коре мозжечка в пренатальный и постнатальный периоды. Значительно повышенная экспрессия генов *LRCH2* и *CSMD1* по сравнению с их паралогами совпадает с началом заболевания в исследованных семьях (А и В, выделены красным). А – пренатальное развитие, Б – постнатальное развитие в раннем детстве, В – период начиная со школьного возраста, юность и начало зрелости, Г – зрелый возраст. Для сравнительного анализа были получены данные проекта «Нормальное развитие мозга» (BrainSpan) [Miller et al., 2014]. *P*<sub>adj</sub> – максимальное скорректированное значение.

### 3.2.4.2. Сравнительный анализ данных экспрессии гена *LRCH2* и его паралога в мозжечке, других отделах головного и спинного мозга, а также периферических нервах

Ген *LRCH2* имеет три паралога, *LRCH1*, *LRCH3* и *LRCH4*, которые также имеют высокий уровень экспрессии в головном мозге. Структуры белков семейства LRCH очень похожи: все белки имеют 9-10 LRR с N-концевой части и СН-домен с С-концевой части [Kajava et al., 1998]. Более того, недавние исследования показывают, что эти гены могут взаимодействовать с белками DOCK6-8, которые играют роль в реорганизации цитоскелета [Müller et al., 2020]. В связи с этим компенсация гена *LRCH2* вполне возможна за счёт его паралога. При использовании ЕРвЕ в коре мозжечка в пренатальный период наблюдается самый высокий уровень экспрессии гена *LRCH2* по сравнению с его паралогами (значение  $p = 0,038$ , Рисунок 17А).

После рождения экспрессия гена *LRCH2* снижается, а экспрессия его паралога, особенно гена *LRCH1*, увеличивается (Рисунок 17Б-Г). Таким образом, в семье А1 гипоплазия мозжечка в пренатальный период совпадает с наиболее высокой экспрессией гена *LRCH2*. В коре головного мозга в пренатальном периоде, кроме гена *LRCH2*, высокий уровень экспрессии наблюдается и для паралога *LRCH1*, за исключением моторно-сенсорной коры и орбитофронтальной коры (Рисунок 11 Приложения). С возрастом наблюдается снижение экспрессии *LRCH2* в коре головного мозга (Рисунок 12 Приложения). Наибольшие различия между *LRCH2* и его паралогами проявляются в теменной и слуховой коре (Рисунок 12 Приложения). Экспрессия семейства генов *LRCH* у мышей несколько отличается от таковой у людей. На всех стадиях развития мозга самый высокий уровень экспрессии наблюдается для *LRCH1* [Lein et al., 2007]. *LRCH2* имеет более низкий уровень экспрессии в мозге мыши [Lein et al., 2007]. В связи с этим можно объяснить отсутствие видимых аномалий у эмбрионов мышей до E9.5 с нокаутом гена *LRCH2*, полученных с помощью технологии генных ловушек [Cox et al., 2010]. Анализ данных экспрессии отдельных клеток показал, что ген *LRCH2* в высокой степени экспрессируется в нейронах и что низкий уровень экспрессии присутствует в астроцитах и олигодендроцитах человека [Zhang et al., 2016] (Рисунок 16 Приложения). У мышей ген *LRCH2* экспрессируется в клетках-предшественниках олигодендроцитов и затем снижается [Zhang et al., 2014]. По данным DropViz [Saunders et al., 2018], в мозжечке взрослых мышей ген *LRCH2* экспрессируется в основном в зернистых нейронах и интернейронах (Рисунок 18А), что не противоречит данным МРТ у пациентов из семьи А1. При этом экспрессия гена *LRCH2* в интернейронах выше, чем его паралога. При исследовании нервной проводимости у пациентов из семьи А1 были обнаружены признаки демиелинизирующей моторной и сенсорной невропатии. При транскриптомном исследовании генов, связанных с сенсорной наследственной невропатией, среди идентифицированных генов с дифференциальной экспрессией в ганглии задних корешков по сравнению с

седалищным нервом был идентифицирован *LRCH2* [Sapio et al., 2016]. Кроме того, экспрессия гена *LRCH2* была обнаружена в шванновских клетках, формирующих миелиновую оболочку периферических нервов [Kim et al., 2017] (Рисунок 17 Приложения). Полученные данные согласуются с генерализованным демиелинизирующим поражением сенсомоторных волокон у пациентов из семьи А1.



**Рисунок 18.** Экспрессия генов-кандидатов и их паралога в клетках мозжечка взрослых мышей (данные экспрессии одиночных клеток получены из базы данных DropViz). Изображены нейрональные клетки, в которых обнаружена экспрессия генов-кандидатов и их паралога: А – семейство генов LRCH, Б – семейство генов CSMD.

### 3.2.4.3. Сравнительный анализ данных экспрессии гена *CSMD1* и его паралога в мозжечке и других отделах головного мозга

Ген *CSMD1* имеет два паралога, *CSMD2* и *CSMD3*, с высокой степенью сходства белков 61-65%. Все три белка имеют большой внеклеточный домен, содержащий повторы доменов CUB и Sushi, участвующих в связывании

комплемента, и один трансмембранный домен с небольшой внутриклеточной С-концевой областью. Точных данных нет, способны ли белки семейства компенсировать друг друга. Недавние исследования показали, что, подобно *CSMD1*, его паралоги участвуют в росте проекций нейронов [Kraus et al., 2007; Mizukami et al., 2016; Gutierrez et al., 2019]. Различий в уровне экспрессии генов этих семейств в мозжечке во внутриутробном периоде или в раннем детстве не наблюдалось. Однако с помощью EPbE было установлено, что разница в экспрессии генов заметна в период полового созревания и раннего взросления (11-23 года), в этот период самый высокий уровень экспрессии в коре мозжечка присутствует у гена *CSMD1*, а экспрессия его паралогов снижена (Рисунок 17В). Этот период совпадает с появлением клинических симптомов в семьях АII-III, в которых у пациентов выявлен редкий вариант в гене *CSMD1*. Эта разница снова исчезает с возрастом, и в более позднем возрасте все гены экспрессируются примерно на одном уровне. Экспрессия гена *CSMD1* в пренатальном периоде в коре головного мозга также не превышает экспрессию его паралогов (Рисунок 11 Приложения). Затем экспрессия гена *CSMD1* увеличивается с возрастом (от 8 до 40 лет), в то время как экспрессия паралогов снижается или остаётся на том же уровне (значение  $p = 0,033$ ). Кроме того, был проведён дифференциальный анализ экспрессии генов и распределения маркеров активных промоторов (H3K4me3) у лиц разного возраста (0-20 лет) в коре головного мозга с использованием другого набора данных (Рисунок 15 Приложения). Были получены такие же результаты: различий между размерами пиков маркера H3K4me3 с возрастом не обнаружено. В то время как экспрессия генов *CSMD2* и *CSMD3* наиболее высокая в младенчестве, а затем снижается, экспрессия *CSMD1* не меняется и остаётся на определённом уровне. Таким образом, в раннем возрасте паралоги могут компенсировать дефицит гена *CSMD1*. Сравнение экспрессии семейства *CSMD* в пре- и постнатальном периоде у мышей выявило отличия от человека; на всех стадиях развития мозга самый высокий уровень экспрессии наблюдается для гена *CSMD3* [Lein et al., 2007]. Несмотря на это, нокаут гена

*CSMD1* у мышей с поведенческими изменениями также показал некоторые нарушения произвольных движений [Steen et al., 2013]. Ген *CSMD1* у человека экспрессируется в основном в нейронах и в клетках-предшественниках олигодендроцитов и астроцитах [Zhang et al., 2016; Zhang et al., 2014] (Рисунок 16 Приложения). По данным DropViz [Saunders et al., 2018], у мышей экспрессия гена *CSMD1* низкая. Однако в мозжечке взрослых мышей экспрессия *CSMD1* высока по сравнению с экспрессией его паралога в интернейронах, также как в случае гена *LRCH2* (Рисунок 18Б). Таким образом, анализ экспрессии генов показал, что оба гена-кандидата экспрессируются в мозжечке и связаны с корковыми и подкорковыми структурами мозга, участвующими в двигательных функциях.

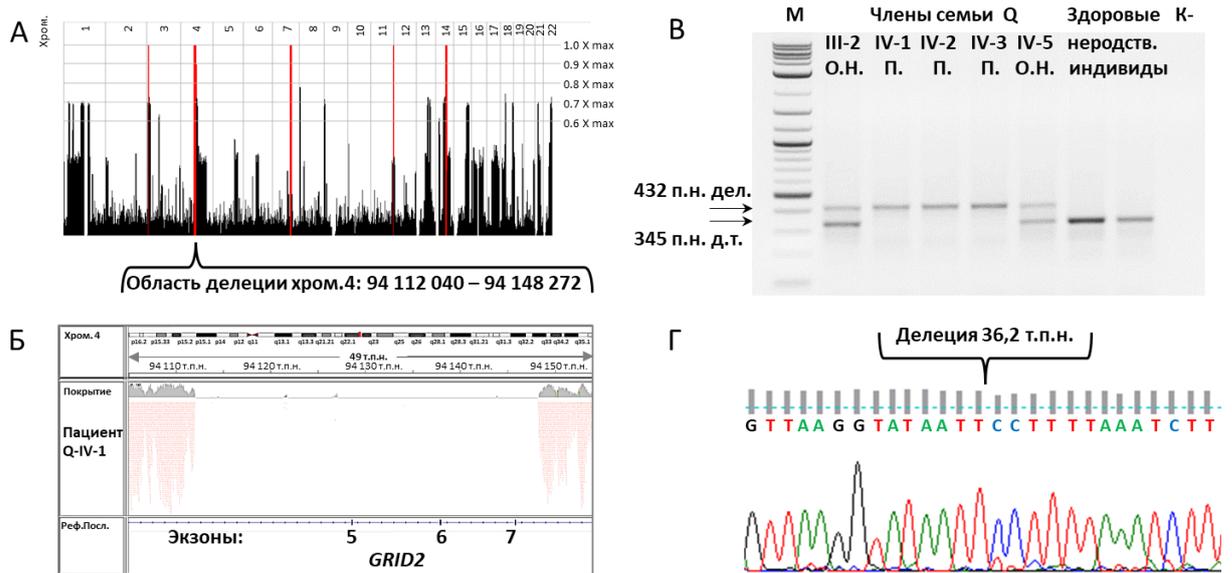
### **3.3. Генетический анализ причин Синдрома CAMRQ в Бразильской семье**

В последнем разделе генетический анализ был проведён у членов близкородственной семьи из Бразилии (Q), в которой у четырёх сибсов поставлен диагноз редкого синдрома CAMRQ (Рисунок 4), отличительной особенностью которого является тяжёлая умственная отсталость с полным отсутствием речи и локомоция с использованием четырёх конечностей. Клиническое описание пациентов из семьи Q было опубликовано ранее [Garcias, Roth, 2007]. Краткое изложение уникального клинического фенотипа и родословная семьи представлены в главе 2, пункт 2.1.2.4.

#### **3.3.1. Биоинформатический анализ данных полногеномного секвенирования ДНК пациента с синдромом CAMRQ**

Чтобы определить генетические локусы, связанные с патогенной мутацией в семье Q (Рисунок 19), было проведено картирование областей гомозиготности у трёх больных (Q-IV-1, Q-IV-2 и Q-IV-3), их здоровой матери (Q-III-2), и здорового сводного брата (QIV-5) с помощью Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0. С помощью программы Homozygosity Mapper

[Seelow et al., 2009] было выявлено пять гомозиготных регионов с максимальной оценкой гомозиготности 3000 для пациентов (Q-IV-1, Q-IV-2 и Q-IV-3) (Рисунок 19А, Таблица 14 Приложения). Затем для одного пациента (Q-IV-1) был проведён анализ полногеномного секвенирования. В общей сложности 3,1 миллиарда чтений (95% всех сгенерированных чтений) были картированы на референсный геном человека, GRCh37, с 90-кратной глубиной покрытия [Li et al., 2009; Li, Durbin, 2010]. Всего с помощью программ GATK и Pindel было названо 5,2 млн вариантов [McKenna et al., 2010; DePristo et al., 2011; Van der Auwera et al., 2013; Ye et al., 2009]. Также у пациента Q-IV-1 были идентифицированы гены с гомозиготными вариантами в области с низким значением гомозиготности (Таблица 14 Приложения). У пациента Q-IV-1 были отобраны все редкие варианты с глобальной MAF < 0,05 [1000 Genomes Project Consortium et al., 2012]. Общее число редких вариантов в кодирующей области генов составило 3780. Однако области гомозиготности не включают гены, которые ранее были идентифицированы при CAMRQ в других семьях (*VLDLR*, *WDR81*, *CA8*, *ATP8A2*, *RELN* и *TUBB2B*). Были проверены все редкие гомозиготные варианты в этих генах. И только один гомозиготный вариант rs140526335 (MAF 0,0005) был обнаружен в гене *VLDLR*. Данный вариант был предсказан с помощью программы CADD в числе патогенных замен в геноме человека, составляющих 1% от генома. А с помощью программ SIFT и PolyPhen2 этот вариант был предсказан как «допустимый» и «доброкачественный», соответственно (Таблица 8А). Однако, наследование варианта rs140526335 у членов семьи не соответствовало статусу заболевания, так как гетерозиготный вариант был обнаружен у пациента IV-2. Поэтому данный вариант был исключён из дальнейшего анализа.



**Рисунок 19.** Идентификация делеции в гене *GRID2* в семье Q. А – локусы гомозиготности у трех пациентов Q-IV-1, Q-IV-2 и Q-IV-3 (отмечены красным). Б – область делеции, охватывающая 5–7 экзоны гена *GRID2* в данных полногеномного секвенирования пациента Q-IV-1, визуализирована с помощью программы IGV. В – электрофореграмма продуктов ПЦР, подтверждающих делецию в гене *GRID2*: М – ДНК маркер; продукт размером 432 п.н. подтверждает наличие делеции в гене *GRID2* и выявлен в гомозиготном состоянии только у пациентов (Q-IV-1, Q-IV-2 и Q-IV-3); продукт размером 345 п.н., подтверждающий отсутствие делеции и в гомозиготном состоянии, выявлен у здоровых неродственных индивидов. Оба продукта ПЦР выявлены у облигатных носителей: у матери пациентов — Q-III-2, сводного брата пациентов — Q-IV-5. Г - Проверка делеции в гене *GRID2* с помощью секвенирования по Сэнгеру продукта, полученного с первой пары праймеров у пациентов (432 п.н.). П. – пациент; О.Н. – облигатный носитель.

**Таблица 8.** Редкие гомозиготные варианты с неизвестным клиническим значением, выявленные в геноме у пациента Q-IV-1.

Ген	Координаты в геноме GRCh37	RS	Нукл. замена	АК замена	g/max MAF		SIFT/ Polyphen2	CAD D	PhyloP	Заболевание, известное для гена
					1000G	gnomAD				
А. Гомозиготные варианты в генах ассоциированных с CAMRQ*										
<i>VLDLR</i>	9:2639898	rs140526335	A>G	N81S	0,0024/ 0,0196 Телугу	0,0018/ 0,00699 Ю.Азиты	Допустим./ доброкач.	26,6	4,41	CAMRQ1 (OMIM: 224050)
Б. Варианты в области максимальной гомозиготности										
<i>COQ2</i>	4:84206004	rs112033303	T>A	R22*	0,01/ 0,056 Иберы	0,018/ 0,031 Ашкен.	-/-	25,8	-2,83	Дефицит коэнзима Q10, 1 тип (OMIM: 607426)
<i>CDS1</i>	4:85525421	rs118099717	G>C	G48A	0,0004/ 0,0097 Хань	0,0012/ 0,0042 Ю.Азиты	допустим./ доброкач.	18,43	2,69	-
<b><i>GRID2</i></b>	<b>4:94112040-94148272</b>	-	<b>Делеция в рамке 36,2 т.п.н.</b>	<b>Делеция 130 АК (V246-K375)</b>	<b>-/-</b>	<b>-/-</b>	<b>-/-</b>	<b>-</b>	<b>max 9,87</b>	<b>SCAR18 (OMIM: 616204)</b>
В. Варианты в малых гомозиготных регионах*										
<i>PUM3</i>	9:2831011	rs1241779268	T>C	S210G	0,0002/ 0,0052 Барбад.	0,000005/ 0,00001 Европ.	допустим./ доброкач	23,5	3,68	-
<i>ARNT2</i>	15:80866557	rs750637347	C>G	S462C	0,0002/ 0,0047 Иберы	0,000018/ 0,00004 Афр.	патогенный / возможно патогенный	23,6	6,59	Синдром Уэбба-Даттани (OMIM: 615926)
<i>ODF3L</i> 2	19:467696	rs756671415	C>T	R101H	0,0004/ 0,0118 Перуан.	0,00005/ 0,0004 Финны	патогенный / наиболее вероятно патогенный	26,9	2,21	-

\*- варианты в малых гомозиготных регионах не соответствуют аутосомно-рецессивному типу наследования в семье Q.

Затем были проанализированы все варианты по следующим критериям: частоте в популяции, экспрессии генов в развивающемся мозге и мозжечке и структурным изменениям в белке. В самой большой области с максимальной гомозиготностью были отобраны три варианта в генах *COQ2*, *CDS1* и *GRID2* (Таблица 8Б). В гене *COQ2* был обнаружен вариант rs112033303, который предсказан программой CADD как входящий в 1% наиболее патогенных замен в геноме человека. Ген *COQ2* кодирует кофермент Q2, 4-

гидроксibenзоатполипренилтрансферазу, и широко экспрессируется в различных тканях [Karushesky et al., 2010]. Мутации в гене *COQ2* приводят к множественной системной атрофии [Quinzii et al., 2006; Jakobs et al., 2013; Multiple-System Atrophy Research Collaboration, 2013; Ogaki et al., 2014] и мозжечковой атаксии [Montero et al., 2007]. Вариант rs112033303 в гене *COQ2* приводит к стоп-кодону на 22-й аминокислоте сигнального пептида самой длинной изоформы белка. Однако несколько транскриптов, которые кодируют полноразмерные изоформы белка с альтернативными стартовыми кодонами, расположены ниже этого варианта (Рисунок 19 Приложения). Минорный вариант rs112033303 присутствует в популяции и наиболее часто встречается у иберийцев с MAF 0,056119. Данному варианту на основе нескольких исследований присвоен статус «нулевой эффект» или «доброкачественный» в базе данных ClinVar [Ogaki et al., 2014; Landrum et al., 2018; Lee et al., 2017]. Аллель дикого типа распространён среди плацентарных млекопитающих, особенно у приматов, но не является высоко консервативным, что позволяет предположить, что минорный аллель не является мажорным фактором заболевания в семье Q.

Другая нуклеотидная замена в гене *CDS1*, G>C (rs118099717), приводит к аминокислотной замене глицина на аланин в эволюционно консервативном сайте. Вариант дикого типа присутствует у большинства плацентарных животных и рептилий, кроме ящериц, у которых присутствует аланин (Рисунок 18 Приложения). Минорный вариант присутствует в человеческой популяции с MAF 0,001, но отсутствует в гомозиготном состоянии у индивидов из открытых баз данных gnomAD и Проект 1000 Геномов [1000 Genomes Project Consortium et al., 2012; Karczewskiet al., 2017]. Для этого варианта его функциональный эффект был предсказан как «допустимый» с помощью SIFT и как «доброкачественный» с помощью PolyPhen, более того, по предсказанию CADD данный вариант по степени патогенности входит в число замен, составляющих 10% от генома. Ген *CDS1* широко экспрессируется в различных тканях в пренатальный период и во взрослом возрасте, особенно

в толстой кишке, придатке семенника, двенадцатиперстной кишке, плаценте, тонком кишечнике, щитовидной железе и коже, а также в высокой степени экспрессируется в мозжечке на 16-й неделе после зачатия [Karushesky et al., 2010; Fagerberg et al., 2014; Miller et al., 2014]. Хотя у пациентов из семьи Q не было зарегистрировано каких-либо грубых нарушений в других тканях, нельзя исключать некоторый модифицирующий эффект гена *CDS1* на фенотип.

Третьим потенциальным вариантом, идентифицированным в области 4q22 хромосомы с максимальной гомозиготностью, была крупная делеция в гене *GRID2* (hg19 chr4:g.94112040-94148272del, NM\_001510.4:c.736-16515\_1125+2346del) (Рисунок 19, Таблица 8). Делеция удаляет с 5 по 7 экзоны самой длинной изоформы и влияет на все остальные изоформы. Ген *GRID2* имеет высокую экспрессию в мозжечке в пре- и постнатальный период, причём экспрессируется в основном в клетках Пуркинье (Рисунок 20, 21 и 22 Приложения). В других отделах мозга экспрессия гена крайне мала или отсутствует. Нарушения в гене *GRID2* были описаны в семейных случаях с врождённой аутосомно-рецессивной мозжечковой атаксией SCAR18 [Maier et al., 2014; Utine et al., 2013; Hills et al., 2013; Van Schil et al., 2015; Coutelier et al., 2015; Veerapandiyan et al., 2017; Taghdiri et al., 2019; Ceylan et al., 2020; Hetzelt et al., 2020] и на мышинной модели [Lalouette et al., 1998]. Сравнительный анализ клинической картины пациентов с дефектами в гене *GRID2* и пациентов из исследуемой семьи показал высокое сходство заболеваний, в связи с чем данный вариант выбран в качестве кандидатного, однако имеет место наличие симптомов, отличающих данный случай от всех ранее описанных (Таблица 15 Приложения).

Полногеномный поиск редких несинонимичных гомозиготных вариантов, непопадающих в области с максимальной гомозиготностью, позволил выявить ещё три высоко консервативных гомозиготных варианта в генах *PUM3*, *ARNT2*, *ODF3L2* у пациента Q-IV-I из семьи Q (Таблица 8B).

Данные варианты были расположены в малых гомозиготных регионах и были отобраны для дальнейшей валидации у остальных членов семьи Q.

### 3.3.2. Проверка кандидатных вариантов в семье Q

Все редкие варианты, выявленные в геномных данных пациента Q-IV-1, были проверены с помощью ПЦР и прямого секвенирования по Сэнгеру (Таблица 9). Все редкие однонуклеотидные замены были проверены с помощью секвенирования по Сэнгеру у пациента Q-IV-1. Затем наличие данных вариантов проверялось у остальных членов семьи: больных – родных брата Q-IV-2 и сестры Q-IV-3, имеющих тот же диагноз; и клинически здоровых – матери пациентов Q-III-2 и их сводного брата Q-IV-5. Только варианты, расположенные в области максимальной гомозиготности, были подтверждены в гомозиготном состоянии у всех анализируемых пациентов и в гетерозиготном состоянии у облигатных носителей, матери пациентов и их клинически здорового сводного брата. Наследование вариантов, расположенных вне области максимальной гомозиготности, не соответствовало статусу заболевания и аутосомно-рецессивному типу наследования. Вариант rs140526335 в гене *VLDLR* был обнаружен в гомозиготном состоянии по минорному аллелю только у двух пациентов (Q-IV-1 и Q-IV-3), в гетерозиготном состоянии у одного пациента (Q-IV-2), матери (Q-III-2) и их здорового сводного брата (Q-IV-5). Вариант rs1241779268 в гене *PUM3* был определён в гомозиготном состоянии по минорному аллелю также только у двух пациентов (Q-IV-1 и IV-2), в гетерозиготном состоянии у одного пациента (Q-IV-3), матери (Q-III-2) и здорового сводного брата (Q-IV-5). Вариант rs750637347 в гене *ARNT2* был подтверждён в гомозиготном состоянии по минорному аллелю у двух пациентов (Q-IV-1 и Q-IV-2), в гетерозиготном состоянии у матери (Q-III-2) и здорового сводного брата (Q-IV-5), и отсутствовал у одного из пациентов (Q-IV-3), у которого была обнаружена гомозигота по дикому аллелю. Вариант rs756671415 в гене *ODF3L2* был обнаружен в гомозиготном состоянии по

минорному аллелю всего у одного пациента (Q-IV-1), в гетерозиготном состоянии ещё у одного пациента (Q-IV-3), матери (Q-III-2) и здорового сводного брата (Q-IV-5), и отсутствовал у третьего пациента (Q-IV-2), который является носителем гомозиготы дикого типа.

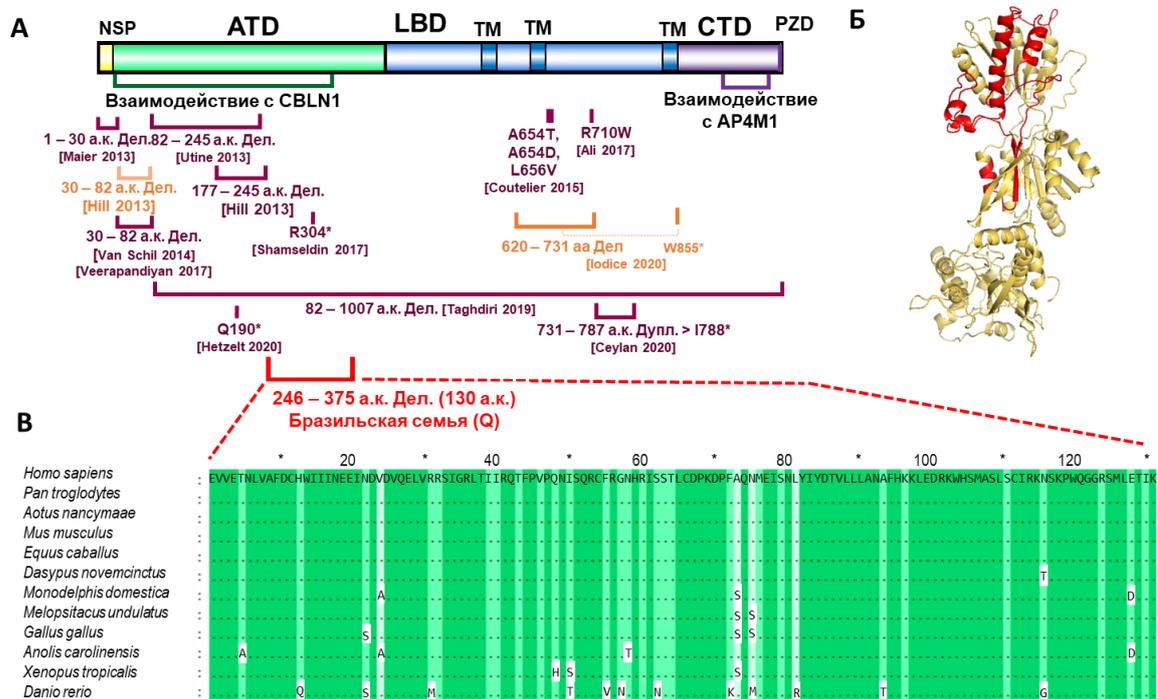
**Таблица 9.** Результаты генотипирования генов, в которых выявлены новые и редкие варианты у пациентов и их клинически здоровых родственников из семьи Q.

№	Пол	Диагноз	Гены и редкие варианты						
			<i>VDLRL</i> , rs14052 6335	<i>COQ2</i> , rs11203 3303	<i>CDS1</i> , rs1180 99717	<i>GRID2</i> , дел. 36,2 т.п.н.	<i>PUM3</i> , <i>rs12417</i> 79268	<i>ARNT2</i> , rs75063 7347	<i>ODF3L2</i> , rs756671415
Q-IV-1	жен.	пациент	GG	AA	CC	Дел./Дел.	CC	GG	ТТ
Q-IV-2	муж.	пациент	AG	AA	CC	Дел./Дел.	CC	GG	СТ
Q-IV-3	жен.	пациент	GG	AA	CC	Дел./Дел.	TC	CC	CC
Q-IV-5	муж.	носитель	AG	AT	CG	Дел./Д.Т.	TC	CG	СТ
Q-III-2	жен.	носитель	AG	AT	CG	Дел./Д.Т.	TC	CG	СТ

В связи с тем, что размер делеции в гене *GRID2* достаточно велик (36,2 т.п.н.), для валидации делеции ПЦР проводили с использованием двух пар праймеров с одним общим прямым и двумя разными обратными олигонуклеотидами. Первая пара праймеров отжигалась только в случае наличия делеции на геномных последовательностях, фланкирующих её с образованием продукта 432 п.н. Вторая пара праймеров отжигалась в случае отсутствия делеции (вариант дикого типа) на 5'-фланкирующей области и на геномной последовательности внутри области делеции с образованием продукта 345 п.н., обнаруживаемым у здоровых индивидов (Рисунок 19В и Г). Гомозиготная делеция была подтверждена у всех трёх анализируемых пациентов Q-IV-1-3, и гетерозиготная делеция была подтверждена у их матери Q-III-2 и здорового сводного брата Q-IV-5.

### 3.3.3. Анализ структурных изменений в глутаматном рецепторе GRID2 в результате делеции у пациентов из семьи Q

Делеция трёх экзонов 5-7 внутри рамки считывания приводит к удалению области в белке размером 130 аминокислот (V246–K375) во внеклеточном аминоконцевом домене (ATD), альтернативно называемом N-концевым доменом внеклеточного белка, связывающего лейцин/изолейцин/валин (LIVBP). Данная область высоко консервативна у позвоночных животных (Рисунок 20В). Утрачиваемый домен ATD глутаматного рецептора дельта 2 необходим для связывания лиганда (Рисунок 20) [Matsuda et al., 2010; Uemura et al., 2010]. В исследованиях показано, что крупные делеции в гене *GRID2* в данной области нарушают формирование третичной структуры белка и его транспорт из эндоплазматического ретикулума на поверхность клетки [Matsuda et al., 2002].



**Рисунок 20.** Схема структуры глутаматного рецептора дельта 2 (GRID2) и области новой делеции, выявленной в семье Q. А — Предшественник дельта-2 глутаматного рецептора состоит из N-концевого сигнального пептида (NSP), внеклеточного аминоконцевого домена (ATD), лиганд-связывающего домена

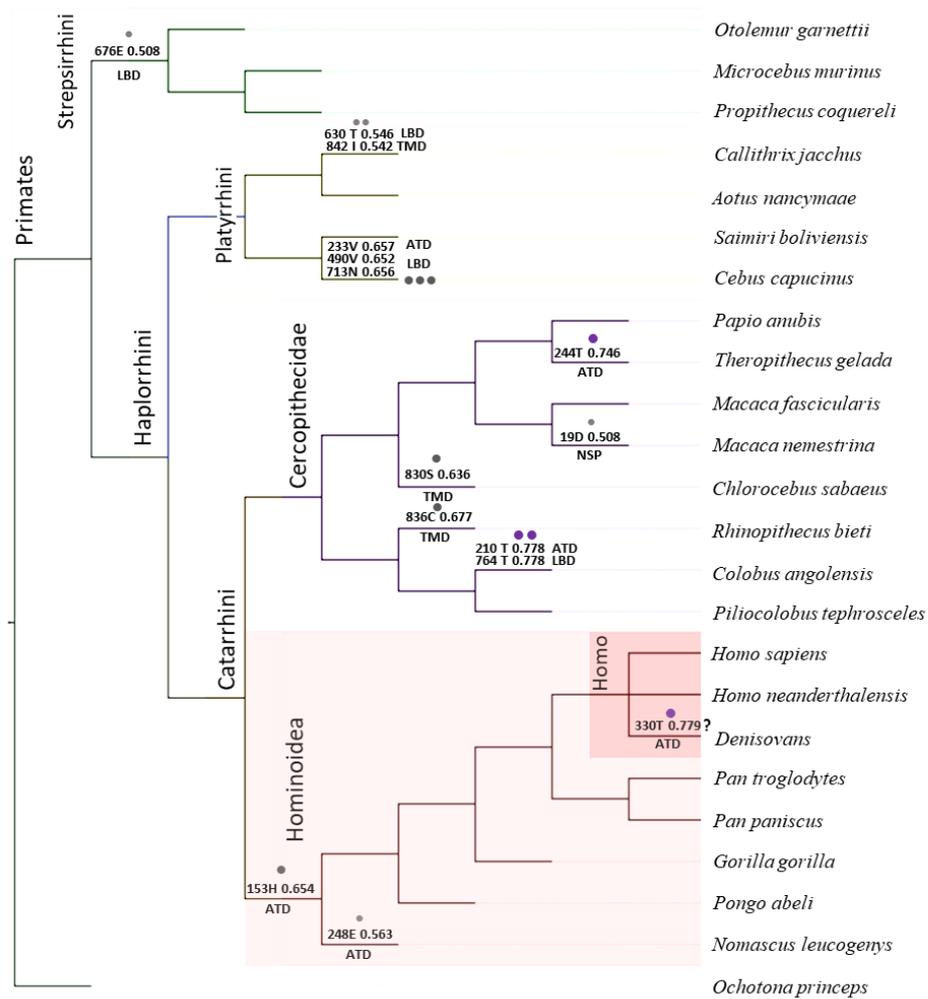
(LBD), 3 трансмембранных доменов (TM) и С-концевого внутриклеточного домена (CTD) с областью PZD [Burada et al., 2020]. Структура белка создана с помощью программы IBS [Liu et al., 2015]. Патогенные варианты выделены цветом: красным цветом — делеция экзонов 5-7, кодирующих часть АТД, обнаруженная у пациентов из семьи Q; тёмно-красным — гомозиготные варианты (Дел. — делеции, Дупл. — дубликации, нонсенс и миссенс), описанные ранее в других исследованиях; светло-красный — гетерозиготные варианты, описанные ранее в других исследованиях; \* — стоп-кодон. Б — предсказание пространственной структуры мономера рецептора GRID2 (NP\_001501.2) с помощью Phyre2. Делетированная область затрагивает часть большого внеклеточного домена альфа-цепи и одну бета-цепь (отмечена красным). В — анализ эволюционной консервативности делетированной области у животных, визуализированный в программе GeneDoc [Nicholas et al., 1997]. Эволюционно консервативные аминокислоты обозначены зелёным цветом.

### 3.3.4. Эволюционный анализ гена *GRID2*

Так как новый дефект в гене *GRID2* приводит к нарушению бипедальной локомоции и нарушению когнитивных функций и речи, был проведён эволюционный анализ данного гена. Анализ белок-кодирующих последовательностей гена *GRID2* у современного человека, древних гоминид и 20 видов приматов был проведён с помощью программы CodeML, входящей в пакет PAML [Yang, 1997; Yang, 2007]. Белок-кодирующая последовательность *GRID2* высоко консервативна среди всех позвоночных и достигает наибольшей консервативности (93–99%) у приматов. Скорость накопления изменений в белок-кодирующей последовательности гена *GRID2* различна у разных таксонов приматов ввиду статистически значимой альтернативной гипотезы теста молекулярных часов, реализованного с помощью CodeML (значение  $p < 0,0025$ ,  $2\Delta\ln L -45,257462$ ,  $df 22$ ). Поэтому на следующем этапе было проведено исследование наличия изменений,

связанных с направленным эволюционным отбором, в реконструированном филогенетическом дереве приматов. Для этого каждая ветвь дерева последовательно была назначена в качестве ветви переднего плана во время анализа CodeML. Значение  $\omega$  по ветвям исследовалось в рамках однопараметрической модели (M0), которая предполагает одинаковое значение  $\omega$  для всех ветвей, и свободно-параметрической модели (M1), которая предполагает независимое отношение  $\omega$  для каждой ветви. Несмотря на то, что гипотеза молекулярных часов, предполагающая единообразие скоростей эволюции в таксонах, была отвергнута, статистически значимых различий между моделями M0 и M1 не было выявлено (Таблица 16 Приложения). Значение  $\omega$  в модели M0 было установлено равным 0,027, что указывает на сильную очищающую тенденцию. Затем белок-кодирующие последовательности гена *GRID2* приматов были исследованы с использованием ветвь-сайт-специфичной модели A. Альтернативная гипотеза в виде модели MA1 была отвергнута, а нулевая гипотеза, представленная моделью MA0, была наиболее подходящей (Таблица 17 Приложения). Также не было выявлено статистически значимых сайтов под действием положительного отбора с помощью эмпирического байесовского метода (BEV). Были определены только сайты с низкой байесовской вероятностью ( $0,5 < BEV < 0,8$ ), из которых шесть сайтов в АТД и восемь сайтов в лиганд-связывающем домене (LBD) (Рисунок 21, Таблица 17 Приложения). В ветви человекообразных обезьян (Hominoidea) в АТД был определён один сайт с низкой байесовской вероятностью (153 Н 0,654), данный сайт является единственным отличием человекообразных обезьян от других приматов. Белок-кодирующая последовательность ближайших живых видов к человеку (*Pan troglodytes* и *Pan paniscus*) отличается 13 заменами, 12 из которых являются синонимичными (Рисунок 21). Всего одна аминокислотная замена в белок-кодирующей последовательности гена *GRID2* отличает *Pan troglodytes* и *Pan paniscus* от *Homo sapiens*, однако эта замена локализована в сигнальном пептиде и не влияет на основные функциональные домены. Никаких замен

между современным человеком (*Homo sapiens sapiens*) и неандертальцами (*Homo sapiens neanderthalensis*) не обнаружено. Белок-кодирующая последовательность гена *GRID2* денисовца (Denisovan) от современного человека (*Homo sapiens sapiens*) отличается одной синонимичной заменой и одной потенциальной гетерозиготной несинонимичной заменой rs373866971, однако данная замена С>Т имеет соотношение покрытия референсного аллеля к минорному 21/3 и может являться технической ошибкой, возникшей в результате гидролитического повреждения древней ДНК. Данная несинонимичная замена имеет низкое значение байесовской вероятности (330 Т 0,779) и локализована в области, делетированной у пациентов из семьи Q. Возможно, этот специфичный для денисовцев вариант rs373866971 отрицательно влияет на функцию белка, поскольку аллель дикого типа высоко консервативен. Данный вариант rs373866971 встречается в современной мировой популяции человека с очень низкой частотой минорного аллеля 0,000039 по данным базы gnomAD, с наибольшей частотой у Южных Азиат (maxMAF 0,0002510) [Karczewski et al., 2020; Karczewski et al., 2021], кроме того, биоинформатически предсказан как «вероятно патогенным» с помощью программы PolyPhen2 и «патогенным» с помощью программы SIFT.



**Рисунок 21.** Филогенетическое дерево приматов гена *GRID2*. Предполагаемые сайты, предсказанные в модели A1 с использованием эмпирического байесовского метода Байеса (БЕВ), указаны в ветвях точками (указано положение аминокислотного сайта со значением вероятности БЕВ и белковым доменом). «?» — наличие гетерозиготного варианта у денисовца неоднозначно и может быть результатом гидролитического дезаминирования древней ДНК.

Так как у современного человека по сравнению с ближайшими приматами большинство замен в белок-кодирующей последовательности гена *GRID2* являются синонимичными, было проведено исследование влияния этих замен на стабильность пространственной мРНК с помощью программы Mfold. Было получено, что значения свободной энергии для полноразмерных белок-кодирующих последовательностей современного человека и денисовца ниже, чем для шимпанзе обыкновенного: -954,5 и -954,4 ккал/моль в отличие от -947

ккал/моль, соответственно, можно предположить более энергетически эффективную структуру у представителей рода *Homo*. Поскольку анализ с помощью программы Mfold точнее работает для коротких фрагментов, были проанализированы фрагменты размером по 25, 51, 75, 151 и 301 нуклеотидов белок-кодирующих последовательностей *GRID2*, содержащие нуклеотидные замены у современного человека, денисовца и шимпанзе обыкновенного (Таблица 18 Приложения) [Zuker, 2003; Edwards et al., 2012]. Большинство вариантов (10 из 15) были нейтральными или не имели статистически значимой разницы в изменении свободной энергии Гиббса. Однако в белок-кодирующей последовательности гена *GRID2* современного человека два варианта G<sup>94436426</sup> и G<sup>94436547</sup> имеют значительно более низкий уровень свободной энергии Гиббса и три варианта A<sup>94159638</sup>, T<sup>94316763</sup> и G<sup>94376878</sup> несколько более высокий уровень свободной энергии Гиббса по сравнению с денисовцем и шимпанзе обыкновенным.

Затем анализ свободной энергии Гиббса был проведён для более крупных таксонов, объединяющих человека с другими приматами. Были отобраны консервативные замены в следующих таксонах: *Hominini* (две замены), *Homininae* (шесть замен) и *Hominioidea* (пять замен) (Таблица 19 Приложения). Для большинства вариантов (11 из 14) статистически значимых изменений свободной энергии Гиббса не обнаружено. Однако три замены привели к статистически значимому снижению свободной энергии Гиббса (Таблица 20 Приложения). Две из них являются синонимичными заменами у *Hominini* и расположены рядом друг с другом в начале белок-кодирующей последовательности гена *GRID2*. Третья является несинонимичной заменой N153H в таксоне *Hominioidea*, расположена также ближе к началу и также приводит к статистически значимому снижению свободной энергии Гиббса (Рисунок 21). Таким образом, на основе проведённого биоинформатического анализа можно предположить, что эволюционный отбор вариантов в ветвях таксона *Hominioidea* для гена *GRID2* направлен на формирование оптимальной пространственной структуры РНК.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гипоплазия с атрофией мозжечка или без неё — редкая патология недоразвития заднего мозга, которая вызывает инвалидность с раннего возраста ввиду психомоторной задержки развития и нарушения координации на протяжении жизни. Для большинства пациентов генетическое тестирование известных таргетных локусов не позволяет найти генетическую причину заболевания. В данной работе проведено полноэкзомное и полногеномное исследование редких случаев врождённых форм мозжечковых атаксий без когнитивных нарушений и редкого синдрома мозжечковой атаксии, умственной отсталости и квадропедии, в результате которого выявлены новые гены и новые мутации, являющиеся причинами мозжечковых патологий. Идентификация генетических причин редких наследственных или врождённых заболеваний является первым ключевым шагом к пониманию патогенеза этих заболеваний и необходима для разработки лечения и предупреждения заболеваний в следующих поколениях.

В первом случае проведено исследование в большой бурятской семье АХ, состоящей из родословной в пять поколений и 106 индивидов, в которой ранее была описана редкая форма X-сцепленной рецессивной непрогрессирующей мозжечковой гипоплазии. [Илариошкин et al., 1996]. В этой семье была найдена новая мутация в гене *ABCB7*, ставшая причиной мозжечковой гипоплазии/атрофии и непрогрессирующей атаксии, расширяющая список дефектов в этом гене, связанных с мозжечковой атаксией. Ранее обнаруженные четыре различные мутации в гене *ABCB7* были связаны с синдромом сидеробластной анемии и атаксии (Таблица 13 Приложения). Симптомы сидеробластной анемии в ранее описанных семьях были вызваны нарушением включения ионов железа в гем во время синтеза гемоглобина, в результате чего происходило патологическое накопление ионов железа и протопорфирина IX в митохондриях и, как следствие, нарушение созревания эритроцитов в красном костном мозге. Отличительной

особенностью случая в семье АХ является то, что у пациентов в полной мере присутствуют симптомы непрогрессирующей атаксии, однако отсутствуют классические симптомы сидеробластной анемии. Особенности такого фенотипа могут быть связаны с одной из двух причин, первая — расположение мутации во внутримитохондриальном цитоплазматическом домене транспортёра ABCB7, вторая связана с модифицирующим эффектом новой делеции в гене транспортёра меди ATP7A. Транспортёр ABCB7 располагается в клетках главным образом на внутренней мембране митохондрий, а также может быть найден в цитоплазме и на цитоплазматической мембране [Zutz et al., 2009]. Транспортёр ABCB7 необходим для включения ионов железа в протопорфирин IX, обеспечивает экспорт глутатион-координируемых железо-серных кластеров из митохондрий и играет важную роль при созревании железо-серных кластерных белков. [Pondarré et al 2006; Pandey et al., 2019; Paul et al., 2017; Dietz et al., 2021; Pearson, Cowan, 2021]. Помимо этого, белок ABCB7 участвует в регуляции клеточной гибели, эксцизионной репарации нуклеотидов и репарации окислительных повреждений ДНК, тиомодификации тРНК и биогенезе рибосом [Hollenstein et al., 2007; Kim et al., 2020]. Во всех ранее описанных случаях синдрома сидеробластной анемии и атаксии мутации были локализованы вблизи или внутри трансмембранных доменов и, по всей вероятности, нарушали формирование трансмембранного канала и закрепление транспортёра ABCB7 на мембране [Nikpour et al., 2012; D'Hooghe et al., 2012; Sato, 2011; Boulwood et al., 2008, Pondarre et al., 2007]. Тогда как найденная мутация в семье АХ расположена во внутримитохондриальном домене транспортёра ABCB7 (Рисунок 7, 8). Таким образом, найденная мутация не приводит к нарушению трансмембранного канала, но, по всей видимости, влияет на функции нуклеотид-связывающего домена.

Неврологические симптомы у пациентов из семьи АХ имеют сходство с другими случаями мутаций в гене *ABCB7*, у пациентов наблюдаются мозжечковая атаксия, дизартрия, дисметрия, дисдиадохокинез, страбизм,

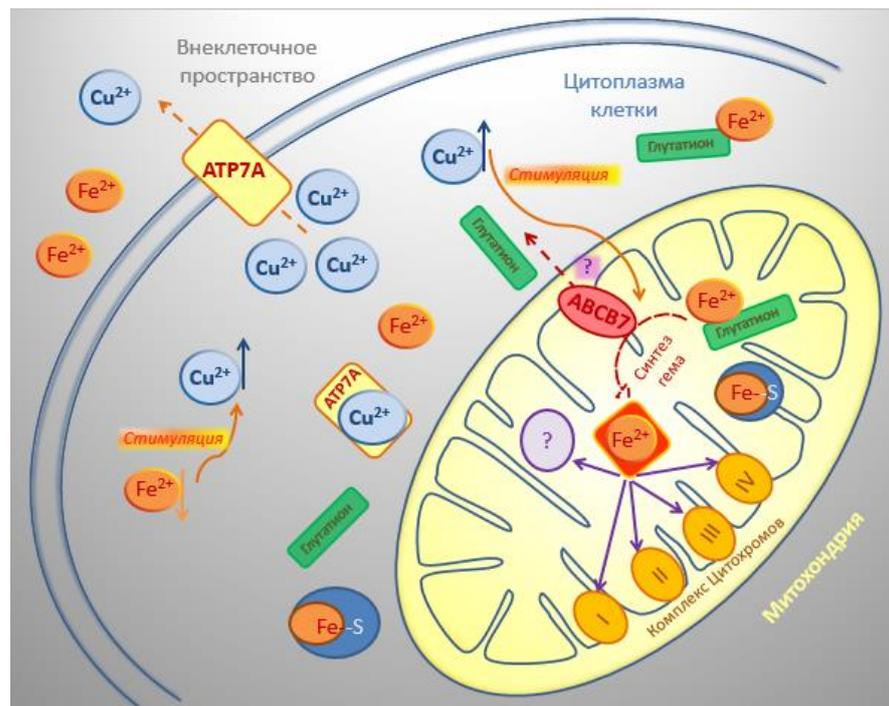
отсутствие мышечной слабости и нарушений чувствительности (Таблица 13 Приложения). У большинства ранее описанных пациентов, как и в семье АХ, когнитивные функции сохранены, что является редким для врождённых спиноцеребеллярных атаксий. Хотя у нескольких пациентов в ранее описанных семьях с мутациями в гене *ABCB7* всё же наблюдается умственная отсталость и такие нейропсихические нарушения, как депрессия и шизофрения. При МРТ в случае семьи АХ было показано, что гипоплазия головного мозга преимущественно локализована в черве и полушариях мозжечка, тогда как не обнаружено аномалий в других областях, включая варолиев мост и продолговатый мозг, описанные в других семьях.

Мутация в гене *ABCB7* у пациентов из семьи АХ сочетается с делецией в гене транспортёра меди *ATP7A*. Интересно, что обнаруженная делеция в эволюционно консервативной N-концевой части *ATP7A* у пациентов из семьи АХ не приводит к заболеваниям, характерным для носителей мутаций в этом гене. Мутации в гене *ATP7A* приводят к нарушению транспорта меди и вызывают её накопление в различных тканях и могут приводить к нескольким заболеваниям: классической и умеренной формам болезни Менкеса [Møller et al., 2013; Bull et al., 1993; Chelly J et al., 1993], X-сцепленной дистально-спинально-мышечной атрофии 3-го типа [Kennerson et al., 2010], синдрому затылочного рога [Byers et al., 1980; Das et al., 1995; Ronce et al., 1997]. Классическая форма синдрома Менкеса является крайне тяжёлым заболеванием, при котором характерны задержка психомоторного развития, тяжёлая умственная отсталость, отставание в росте, гипотермия, дряблость кожи, гиперподвижность суставов, гипопигментация, грубые и хрупкие волосы, продолжительность жизни составляет менее 3 лет. При более редкой, умеренной форме синдрома Менкеса симптомы выражены слабее, больные живут дольше, для них характерны более лёгкие неврологические расстройства. У больных наблюдаются задержка в развитии, мозжечковая атаксия, дизартрия и нарушения соединительной ткани. X-сцепленная дистально-спинально-мышечная атрофия 3-го типа имеет позднее начало

примерно в 20-30-летнем возрасте и связана с нервно-мышечными дегенеративными расстройствами. Синдром затылочного рога отличают видимые нарушения соединительной ткани, затылочный остеопороз и лёгкая интеллектуальная недостаточность. Клинические симптомы у пациентов из семьи АХ имеют наибольшее сходство с умеренной формой болезни Менкеса. Однако у пациентов из семьи АХ не было отмечено нарушений обмена меди, и отсутствовали симптомы нарушения соединительной ткани, структуры волос, пигментации и когнитивных функций.

Интересно, что отсутствие первого из шести медь-связывающих доменов в транспортёре АТР7А у пациентов из семьи АХ не вызвало каких-либо клинических симптомов, известных на момент анализа, характерных для генетического локуса, кодирующего этот транспортёр. Среди всех мутаций, описанных для гена *АТР7А*, крупные делеции встречаются примерно у 15% пациентов с болезнью Менкеса [Tümer et al., 2003]. Поэтому можно предположить, что для эффективной работы транспортёра АТР7А достаточно наличия пяти медь-связывающих доменов. Стоит также отметить, что делеция первого медь-связывающего домена в гене *АТР7А* может иметь модифицирующий эффект нарушения гомеостаза железа, вызванного в результате мутации в гене *АВСВ7* (Рисунок 22). Так, во многих исследованиях показано, что медь принимает участие в регуляции концентрации железа и его включении в протопорфирин IX при синтезе гема гемоглобина в красном костном мозге [Reeves, DeMars, 2006; Pyatskowit, Prohaska, 2008a; Pyatskowit, Prohaska, 2008b; Collins et al., 2010]. Тогда как дефицит железа вызывает повышение экспрессии гена *АТР7А* в тканях мозга и кишечника [Jiang et al., 2011; Monnot et al., 2011]. Так как оба гена *АВСВ7* и *АТР7А* экспрессируются в красном костном мозге, головном мозге и других тканях [Karushesky et al., 2010; Fagerberg et al., 2014], клинический фенотип у пациентов из семьи АХ может представлять собой интересный случай взаимовлияния миссенс мутации и делеции в этих генах, наследуемых как X-сцепленный моногенный признак. Тем не менее основной причиной гипоплазии мозжечка и

клинического фенотипа атаксии у пациентов из семьи АХ является новая мутация в гене *ABCB7*. Недавно в базе данных ClinVar опубликован независимый генетический анализ, в котором у гватемальского пациента с гипоплазией мозжечка выявлен тот же вариант в гене *ABCB7*, что и найденный в бурятской семье АХ [Landrum et al., 2018]. Описанная клиническая картина у гватемальского пациента имеет высокое сходство с описанной в семье АХ, и также не отмечено симптомов сидеробластной анемии.



**Рисунок 22.** Предполагаемое взаимодействие между белками ABCB7 и ATR7A. Белок ABCB7 локализован на внутренней митохондриальной мембране и участвует в транспорте глутатиона и Fe-S-кластеров для дальнейшего синтеза гема. Разрушение белка ABCB7 нарушает синтез гема и вызывает дефицит железа. Белок ATR7A, локализованный на цитоплазматической мембране, транспортирует ионы меди из цитоплазмы клетки. Малые изоформы белка ATR7A в цитоплазме агрегируют с ионами меди и регулируют концентрацию меди в клетках. Потенциально изменённая активность ATR7A из-за делеции медь-связывающего домена может привести к изменению концентрации меди. Изменение концентрации меди влияет на

гомеостаз железа и его накопление в клетках, что может приводить к частичной компенсации дефицита *ABCB7* в эритроцитах.

Описанный в семье АХ случай является крайне редким, только один случай у пациента датского происхождения был опубликован на момент исследования [Zanni et al., 2012]. Однако для синдрома врождённой мозжечковой атаксии наблюдается генетическая гетерогенность. У датского пациента мутация была в гене транспортёра кальция *ATP2B3*. При тестировании семей АI-IV не было выявлено мутаций ни в гене *ABCB7*, ни в *ATP2B3*, ни в генах, вовлечённых в биологические пути и взаимодействующих с ними.

Чтобы идентифицировать кандидатные гены в малых семьях, был разработан подход, основанный на сравнительном анализе паралогов, включающий анализ опубликованных данных функциональных исследований и анализ экспрессии в развивающемся мозжечке и других областях мозга. Анализ экспрессии паралогов генов был проведён с помощью специально написанной программы EРbE. В семье АI были отобраны два редких варианта, расположенных на X-хромосоме на большом расстоянии (57 млн п.н.) друг от друга. Первый вариант, идентифицированный в гене *FAAH2*, расположен очень близко в двух аминокислотах с другим ранее описанным патогенным вариантом у одного пациента европеоидной расы с симптомами атаксии и аутизма [Sirrs et al., 2015]. Пациенты из обеих семей имеют общие симптомы: задержку моторного развития, атаксию, дизартрию, тремор и мышечную гипотонию. Способность к обучению сохраняется в обоих случаях. Главное отличие — отсутствие аутизма, тревоги, депрессии и психогенных судорог. Кроме того, у пациентов из семьи АI выявлены гипоплазия мозжечка и демиелинизирующая полинейропатия. Тогда как в случае, опубликованном канадскими авторами, упоминались только увеличенная мозжечково-мозговая цистерна (лат. *cisterna magna*) и замедленная миелинизация. Различия в клинической картине больных могут быть связаны с разным влиянием замен

p.Ala458Ser и p.Lys460Thr на белок FAAN2, так как второй менее консервативен. Значение гена *FAAN2* для развития спорно. В одном исследовании нонсенс-вариант p.W392\* был обнаружен у пациента с летальным фенотипом, синдромом Цельвегера [Shamseldin et al., 2021]. Но в другом исследовании не было выявлено каких-либо клинических проявлений при усечении белка FAAN2 с С-концевой области, в результате нонсенс-варианта p.E432\* [Lim et al., 2013]. Более того, анализ экспрессии генов-паралогов показал, что ген *FAAN2*, вероятно, играет незначительную роль при развитии мозжечка в эмбриональный период. Таким образом, следует полагать, что *FAAN2* не является основным фактором развития гипоплазии мозжечка в семье АІ.

Второй вариант, новая мутация в семье АІ, идентифицирован в гене *LRCH2*. На сегодняшний день не описано ни одного случая с врождённой патологией, обусловленной дефектом этого гена. Есть только одно упоминание одного варианта rs1333479504 в акцепторной области гена *LRCH2* у пациента с глобальной задержкой развития без детализации диагноза [Martin et al., 2021]. Благодаря подходу, основанному на анализе функций и экспрессии генов-паралогов, удалось оценить значение гена *LRCH2* в эмбриональном развитии мозжечка. Было установлено, что период наибольшей экспрессии гена *LRCH2* и низкой экспрессии его паралогов в эмбриональном мозжечке совпадает с развитием патологии у пациентов из семьи АІ. Кроме того, в пренатальный период наблюдалась высокая экспрессия гена *LRCH2* по сравнению с паралогами в других частях мозга, участвующих в контроле моторных функций, связанных с кортикальными сенсомоторными цепями и фронто-стриарными цепями (Рисунок 12, 13 и 14 Приложения). Анализ экспрессии одиночных клеток у взрослых мышей показал, что ген *LRCH2*, в отличие от его паралогов, экспрессируется в основном в интернейронах, что подтверждает его участие в двигательных цепях в головном мозге [Saunders et al., 2018] (Рисунок 18). Однако явных неврологических изменений в этих областях у больных не было. Возможно,

это связано с сильным компенсаторным эффектом со стороны его паралога, либо с другими молекулярно-биологическими механизмами, также может иметь место частичное сохранение функций белка *LRCH2*. Экспрессия гена *LRCH2* в ганглиях задних корешков и шванновских клетках подтверждает его участие в генерализованных демиелинизирующих поражениях у пациентов из семьи AI [Sapio et al., 2016; Kim et al., 2017]. С другой стороны, одной из основных причин демиелинизирующих полиневропатий являются аутоиммунные заболевания. Хотя данные о функциях гена *LRCH2* практически отсутствуют, известно, что семейство белков *LRCH* участвует в формировании иммунитета и миграции клеток [Rivière et al., 2020].

В двух других неродственных семьях AII и AIII с более поздним началом заболевания (в подростковом возрасте), но с клинической картиной, близкой к таковой в семье AI, выявлен новый генетический фактор — ген *CSMD1*. Проведённый анализ показал, что манифестация заболевания совпадает с периодом снижения экспрессии паралога гена *CSMD1* и повышением его экспрессии по сравнению с ними в мозжечке. Однако в этом возрасте также наблюдались различия в экспрессии гена *CSMD1* и его паралога в коре головного мозга (Рисунок 12 Приложения). Вполне возможно, что высокая экспрессия паралога в пренатальном периоде играет основную роль в формировании развивающегося мозга, а отсутствие гена *CSMD1* в более старшем возрасте приводит к более слабому проявлению заболевания. В подтверждение этой гипотезы у пациента с более ранним началом заболевания протекает более тяжело. Интересно, что анализ функций продуктов генов *CSMD1* и *LRCH2* и их паралога выявил одни и те же биологические процессы, врождённый иммунитет, формирование цитоскелета и миграцию клеток [Gialeli et al., 2018; Kajava, 1998]. Так, белки семейства *CSMD* имеют большое сходство и расположены в конусе роста отростков нейронов, участвуют в росте и ветвлении дендритов и образовании новых синапсов [Kraus et al., 2007; Mizukami et al., 2016; Gutierrez et al., 2019]. Интересно, что в обоих генах *CSMD1* и *LRCH2* обнаружены варианты во внеклеточных доменах,

участвующих во взаимодействии с другими белками и, скорее всего, нарушающие эти связи. Так, нарушение взаимодействия *CSMD1* с основным компонентом комплемента *C3* из-за патогенных вариантов может быть результатом усиленного аутоиммунного ответа и преждевременной гибели и недоразвития нейронов [Escudero-Esparza et al., 2013]. Патогенный вариант в белке *LRCH2* также расположен в области, которая, вероятно, подавляет иммунный ответ [Rivière et al., 2020; Ng et al., 2011]. Поскольку оба гена высоко консервативны на эволюционном и популяционном уровнях и отсутствуют опубликованные данные о гомо- и гемизиготных мутациях, приводящих к нарушению рамки считывания, вполне возможно, что полное их отсутствие может быть несовместимо с жизнью.

Не исключено, что из-за наличия экспрессии в разных областях мозга другие редкие варианты в генах *CSMD1* и *LRCH2* могут приводить к патологиям, связанным с поражением не только двигательных, но и когнитивных функций. Так, в процессе рецензирования и опубликования статьи в журнале вышла статья с другим нарушением в гене *CSMD1* у пациента с симптомами мозжечковой атаксии, у которого также были описаны нейропсихические отклонения [Costanzo et al., 2022], это исследование независимо подтверждает полученные результаты, а также гипотезу, полученную на основе анализа экспрессии паралога, что в случае других мутаций в данном гене возможно проявление более тяжёлого фенотипа. Другим примером может послужить новый вариант, выявленный в этом исследовании у пациента AIV-1 в гене метаботропного глутаматного рецептора *GRM1*. Мутации в этом гене приводят к аутосомно-доминантной спиноцеребеллярной атаксии 44-го типа и аутосомно-рецессивной спиноцеребеллярной атаксии 13-го типа. Для аутосомно-доминантной формы характерны позднее начало и слабая прогрессия заболевания, хотя в одном из описанных случаев наблюдалось раннее начало с более тяжёлым течением и нарушением когнитивных функций [Watson et al., 2017]. В случае аутосомно-рецессивной формы течение заболевания более тяжёлое, характеризующееся

психомоторной задержкой развития, умственной отсталостью, низким ростом, мышечной гипотонией и сильным нарушением моторных функций на протяжении жизни, некоторые пациенты неспособны самостоятельно передвигаться и говорить [Guergueltcheva et al., 2012; Davarniya et al., 2015; Cabet et al., 2019]. Тяжесть заболевания, вероятно, связана с типом мутации в гене, в двух из трёх опубликованных случаев аутосомно-рецессивных заболеваний нарушение в гене приводило к нарушению рамки считывания и усечению рецептора [Guergueltcheva et al., 2012; Cabet et al., 2019]. Новая гомозиготная мутация расположена в высоко консервативной области в одном из трансмембранных доменов рецептора mGluR1 и, в отличие от ранее описанных синдромов, привела к аутосомно-рецессивной форме заболевания, имеющей большое сходство со случаями в семье AX и AI, характеризующимися ранним началом заболевания, задержкой моторного развития, гипоплазией мозжечка, дизартрией и атаксией без клинически значимых когнитивных нарушений.

В семьях AX и AI-IV исследованы генетические причины уникальных случаев гипоплазии мозжечка, приводящие к нарушению развития моторных функций при сохранении интеллекта и когнитивных функций. Интересным является противоположный случай в исследуемой семье Q: дефект найден в гене *GRID2*, экспрессия которого ограничена клетками Пуркинье коры мозжечка, дефицит данного гена, напротив, привёл к крайне редкому синдрому мозжечковой атаксии с тяжёлой формой умственной отсталости, полным отсутствием речи и квадропедии. Данное исследование расширило генетический и эволюционный вклад в понимание патогенеза чрезвычайно редкого фенотипа, описанного в бразильской близкородственной семье Q.

Интересно, что редкое заболевание у пациентов из семьи Q вызвано делецией в гене *GRID2*, тогда как во всех ранее описанных случаях нарушение данного гена приводило к прогрессирующей аутосомно-рецессивной спиноцеребеллярной атаксии 18-го типа, общие клинические признаки

которой включают нарушение координации и общую задержку развития и являются результатом атрофии мозжечка в эмбриональный период [Maier et al., 2014; Utine et al., 2013; Hills et al., 2013; Van Schil et al., 2015; Coutelier et al., 2015; Taghdiri et al., 2019; Ceylan et al., 2020; Hetzelt et al., 2020; Ali et al., 2017, Iodice et al., 2020] (Таблица 15 Приложения). Однако нельзя полностью исключить, что недостаточная нейрореабилитация в первые годы жизни могла способствовать квадропедии в семье Q. В большинстве случаев у пациентов с дефектами гена *GRID2* присутствовала бипедальная локомоция как с опорой, так и без неё, несмотря на задержку моторного развития. Также в некоторых других ранее описанных случаях с мутациями в гене *GRID2* речевые расстройства у пациентов характеризовались дизартрией, при этом речь была неограничена, либо состояла из простых предложений. Стоит отметить, что потенциально другие генетические варианты могут способствовать морфологическим или нейropатологическим особенностям синдрома «инволюции» в семье Q (Таблица 8). Например, был обнаружен редкий вариант в гене *CDS1*, расположенном в той же области максимальной гомозиготности в районе 4q22. Ген *CDS1* участвует в биосинтезе фосфоинозитидов и биогенезе липидных капель, а также экспрессируется в головном мозге и других тканях. Однако биоинформатически предсказано, что найденный генетический вариант в гене *CDS1* функционально незначителен. Также были обнаружены редкие генетические варианты в генах из геномных регионов с относительно низкими значениями гомозиготности (Таблица 8B). Самое интересное, что среди них была обнаружена патогенная миссенс мутация в эволюционно высоко консервативной области гена *ARNT2*. Ген *ARNT2* имеет высокую экспрессию в различных областях мозга и в одном исследовании был связан с аутосомно-рецессивным синдромом Уэбба — Даттани [Webb et al., 2013]. Однако ни одна из мутаций в областях с низкими значениями гомозиготности не соответствовала ожидаемому аутосомно-рецессивному типу наследования (Таблица 9).

У некоторых пациентов из семьи Q нарушение координации сопровождалось судорогами, которых не было отмечено ни в одном другом описанном случае; более того, нет упоминаний о гирсутизме и задержке роста в ранее описанных случаях патологии гена *GRID2* [Maier et al., 2014; Utine et al., 2013; Hills et al., 2013; Van Schil et al., 2015; Coutelier et al., 2015; Ceylan et al., 2020; Hetzelt et al., 2020; Ali et al., 2017, Iodice et al., 2020; Taghdiri et al., 2019]. Нельзя исключить возможность того, что симптомы гирсутизма связаны с другими генетическими факторами. Делеция удаляет 5-7 экзоны гена *GRID2*, которые кодируют половину домена АТД, прилегающего к лиганд-связывающему домену LBD. Такая делеция влияет на все предсказанные изоформы белка *GRID2*, тогда как в большинстве ранее описанных случаев [Maier et al., 2014; Utine et al., 2013; Hills et al., 2013; Van Schil et al., 2015; Coutelier et al., 2015; Ceylan et al., 2020; Hetzelt et al., 2020; Ali et al., 2017, Iodice et al., 2020], кроме одного [Taghdiri et al., 2019], мутации не приводят к нарушению всех предсказанных изоформ. Делеция, выявленная у пациентов из семьи Q, частично перекрывается с делецией, описанной у мышей ho-4J, которые также проявляют атаксию, аномальное двигательное обучение, нарушение баланса и координации [Lalouette et al., 1998].

Антропологический анализ приписывает бипедальную локомоцию австралопитекам [Latimer, Lovejoy, 1990; Fernández et al., 2016]. В данном исследовании был проведён анализ эволюционного вклада гена *GRID2* в формирование моторных функций, локомоцию, речь и интеллект у приматов. Аминокислотная последовательность рецептора *GRID2* у человека не отличается от таковой у шимпанзе; кроме того, в эволюционном древе приматов отсутствуют ветви со статистически значимыми признаками положительного отбора. Дополнительный тест на стабильность мРНК предсказал несколько значимых изменений свободной энергии Гиббса для синонимичных замен, специфичных для *Homo sapiens*, в высококонсервативных положениях. Две замены в центральной части белок-кодирующей последовательности гена *GRID2* приводят к повышению уровня

свободной энергии Гиббса, а ещё две, локализованные во второй части белок-кодирующей последовательности, снижают уровень свободной энергии Гиббса. Более того, дополнительные анализы таксонов *Hominoidea* также показали тенденцию к снижению уровня свободной энергии Гиббса. Изменение пространственной структуры РНК влияет на дальнейший транспорт и трансляцию белка; формирование оптимальной пространственной структуры РНК способствует лучшей продукции, точности и фолдингу синтезируемого белка [Faure et al., 2017; Dhindsa et al., 2020]. Интересно, что ген *GRID2* достигает высокого уровня экспрессии в клетках Пуркинье, начиная с эмбрионального развития и сохраняет её на высоком уровне на протяжении всей жизни человека (Рисунок 20 и 22 Приложения). Кроме того, высокий уровень экспрессии гена *GRID2* в мозжечке также сохраняется среди млекопитающих (Рисунок 21 Приложения). Значительно более низкий уровень экспрессии наблюдается в других отделах мозга, в том числе в лобной коре, где ген *GRID2* экспрессируется в нейронах пятого слоя коры головного мозга, который участвует в формировании двигательных функций (Рисунок 22 Приложения). Показано при развитии у мышей одной из основных функций рецептора *GRID2* в клетках Пуркинье является синаптогенез. Зависимая от D-серина передача сигналов лежит в основе долговременной депрессии в синапсах между параллельными волокнами и клетками Пуркинье, для активации которых необходимо взаимодействие с пресинаптическим  $\beta$ -нейрексином-1 ( $\beta$ -NRXN1). [Matsuda et al., 2010; Uemura et al. 2010; Elegheert et al., 2016]. Домен ATD в рецепторе *GRID2* необходим для взаимодействия с белком посредником *Cbln1* и образования комплекса с  $\beta$ -NRXN1 [Elegheert et al., 2016]. Потеря домена ATD в результате делеции в семье Q, возможно, нарушила это взаимодействие. Таким образом, бразильская семья Q представляет собой случай нарушения бипедальной локомоции, речи и когнитивных функций, связанных с генетическим дефектом, нарушающим формирование клеток Пуркинье в мозжечке.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этом исследовании был проведён генетический анализ в шести семьях с редкими врождёнными патологиями мозжечка с применением современной технологии массового параллельного секвенирования, и выявлены новые генетические факторы, которые могут приводить к редким формам ранней атаксии с гипоплазией мозжечка. Чтобы идентифицировать генетические нарушения при редких заболеваниях в малых семьях или единичных случаях, был разработан подход, в основе которого лежит детальный анализ кандидатных генов, поиск и сравнение генов-паралогов, их функций и наличие избыточности генов, анализ их экспрессии в разных областях мозга в период пренатального и постнатального развития.

С помощью разработанного подхода были выявлены новые генетические однонуклеотидные миссенс мутации в высоко консервативных областях белок-кодирующей последовательности генов *LRCH2* и *CSMD1*, наследственные патологии для которых ранее не были описаны. Анализ этих генов показал общие анатомические и гистологические регионы экспрессии и общие биологические пути и процессы, в которые вовлечены оба гена, происходящие на разных этапах развития головного мозга человека. Так, повышенная экспрессия обоих генов по сравнению с их паралогами наблюдается в интернейронах мозжечка и других областях мозга, отвечающих за моторные функции. Оба гена вносят вклад в развитие нейронов мозжечка и формирование моторных функций, в то же время участвуют в миграции клеток и процессах врождённого иммунитета. Интересно, что в пренатальный период важную роль в развитии играет ген *LRCH2*, тогда как в постнатальный период, начиная с позднего детства до ранней взрослости, важное значение для развития имеет ген *CSMD1*. Таким образом, дальнейшее изучение выявленных генов и генетических вариантов представляет большой интерес для понимания молекулярно-биологических основ формирования двигательных функций головного мозга.

Полногеномный анализ в большой бурятской семье (семья АХ) выявил уникальное сочетание двух генетических факторов, наследуемых в одной группе сцепления: миссенс мутацию в гене *ABCB7* и делецию в гене *ATP7A*. Детальный анализ позволил установить, что основной причиной гипоплазии мозжечка и клинического фенотипа атаксии у пациентов из семьи АХ является новая мутация в гене *ABCB7*, тогда как делеция в гене *ATP7A* не нарушает основные функции гена, однако может модифицировать эффективность транспортёра и влиять на концентрацию ионов железа и меди в клетках и, возможно, компенсировать недостаток железа в клетках. Тем самым можно предположить отсутствие выраженных симптомов сидеробластной анемии у пациентов. В семье АХ найдена ещё одна уникальная генетическая особенность: делеция в гене *ATP7A* приводит к полному натуральному нокауту ретрогена *PGAM4*. Данный ретроген экспрессируется исключительно в тестикулах, и в нескольких исследованиях предполагается его роль в сперматогенезе. Однако, несмотря на полное отсутствие ретрогена *PGAM4*, у пациентов сохранена фертильность ввиду наличия родных сыновей у одного из пациентов, подтверждённых генетическим анализом STR-маркеров. Однако не исключено влияние на сперматозоиды, несущие X-хромосому, так как у пациента не было дочерей, а все трое его детей имеют мужской пол.

В последней, бразильской семье Q проведён генетический анализ редкого синдрома мозжечковой атаксии, умственной отсталости, нарушения речи и квадропедии, и установлена генетическая причина редкой патологии, которой стала крупная делеция в высоко консервативном гене *GRID2*, а также изучено эволюционное значение данного изменения. Результаты исследования свидетельствуют о высокой степени эволюционной консервативности белок-кодирующей последовательности гена *GRID2*. Нарушение этой генетической области приводит к потере бипедальной локомоции и затрагивает эволюционно древние биологические функции мозга, отвечающие за передвижение, когнитивные функции и речь. Важно отметить, что другие генетические события, такие как синонимичные замены,

влияющие на пространственную структуру и стабильность мРНК, могут производить дополнительный или модифицирующий эффект на клинический фенотип.

## ВЫВОДЫ

1. Была выявлена мутация в гене *ABCB7*, которая привела к X-сцепленной рецессивной гипоплазии мозжечка у пациентов из большой бурятской семьи. Данная мутация наследуется в группе сцепления с крупной делецией в гене *ATP7A*, приводящей к удалению второго экзона и ретрогена *PGAM4*. В результате делеции транспортёр ATP7A утрачивает первый из шести медь-связывающих доменов, сохраняя основную функцию. Отсутствие ретрогена *PGAM4*, экспрессируемого исключительно в тестикулах, не нарушает мужскую фертильность.
2. Анализ в четырёх малых семьях выявил генетическую гетерогенность клинически близких редких случаев мозжечковой атаксии. В одной из семей выявлена новая мутация в гене *GRM1*, ставшая причиной врождённой мозжечковой атаксии.
3. Разработан подход анализа данных массового параллельного секвенирования для выявления новых генетических факторов редких заболеваний в спорадических случаях и случаях в малых семьях с неопределённой этиологией, в основе которого лежит сравнительный анализ функций и экспрессии *in silico* кандидатных генов и их паралофов на разных этапах онтогенеза.
4. С помощью разработанного подхода выявлены новые гены *LRCH2* и *CSMD1*, в которых миссенс варианты привели к гипоплазии мозжечка в случаях с редкой аутосомно- и X-сцепленной рецессивной формой спинномозжечковой атаксии.
5. Обнаружена делеция в гене *GRID2*, являющаяся причиной редкого синдрома мозжечковой атаксии, умственной отсталости, нарушения речи

и квадропедии в бразильской семье. Эволюционный анализ гена *GRID2* у приматов выявил нуклеотидные замены, специфичные для линии *Homo*, которые влияют на стабильность мРНК.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность академику РАН, проф., д.б.н. Рогаеву Е. И., под руководством которого выполнена данная диссертационная работа. Автор благодарен к.б.н. Григоренко А. П., Гусеву Ф. Е., к.б.н. Андреевой Т. В., к.б.н. Кузнецовой И. Л., к.б.н. Кунижевой С. С. и всему коллективу лаборатории эволюционной геномики ИОГен РАН. Автор выражает благодарность академику РАН, проф., д.м.н. Иллариошкину С. Н., к.м.н. Ключникову С. А., док., проф., Гарсиасу Г. Л. и док., проф., Мартино-Роф М. Д. Г. за предоставленные ценные биологические образцы пациентов с редкими формами заболеваний.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ершова М.В. Митохондриальная недостаточность при болезни Фридрейха (клинико-генетическое, биохимическое и цитохимическое исследование): Дис. канд. мед. наук. М., 2003. 135 с.
2. Ершова, М.В. [и др.]. Современные представления о мультисистемной атрофии // Актуальные вопросы неврологии. – 2018. № 4. - С. 3-13
3. Иллариошкин, С.Н. Наследственные атаксии и параплегии / Иллариошкин С.Н., Руденская Г.Е., Иванова-Смоленская И.А. с соавт. // М.: МЕДпресс-информ, 2006. – 416 с
4. Иллариошкин С. Н. Наследственные моногенные заболевания нервной системы: молекулярный анализ и клинико-генетические сопоставления : дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.28, 03.00.26 / Иллариошкин Сергей Николаевич. -М., 1997.
5. Кириленко Н.Б. Генетико-эпидемиологическое исследование наследственных болезней нервной системы в городах Волгоград и Волжский // Генетика. – 2004. –Т.40. №9, С.1256–1261.

6. Ключников, С.А. Алгоритм диагностики наследственных атаксий / Ключников С.А., Иллариошкин С.Н. // Нервные болезни. - 2012. - Т. 1 – С. 7-12.
7. Ключников С.А. [и др.]. Клинико-генетический анализ наследственных атаксий: новые формы заболеваний в российских семьях // Бюллетень Национального общества по изучению болезни Паркинсона и расстройств движений. - 2022. №2.
8. Нужный Е.П. [и др.]. Сенситивная атаксия, невропатия, дизартрия и офтальмопарез (синдром SANDO): характеристика серии клинических наблюдений в России. Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2019. –Т.13. №2, С.5–13.
9. Нужный Е.П. [и др.]. Атаксии с нарушением репарации ДНК у пациентов взрослого возраста: описание серии клинических случаев и обзор литературы // Российский неврологический журнал. – 2020. –Т.25. №2, С.28–36.
10. Нужный Е.П. [и др.] Синдром CANVAS – частая форма наследственной атаксии с поздним началом. Мед. генетика. – 2020. –Т.19. №4, С.51-52
11. Нужный, Е.П. [и др.]. Алгоритм диагностики аутосомно-рецессивных атаксий // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2019. - Т.119. № 9, - С. 74-82
12. Нужный, Е.П. [и др.]. Диагностика аутосомно-рецессивных мозжечковых атаксий с использованием технологии массового параллельного секвенирования // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Материалы XI Всероссийского съезда неврологов и IV конгресса Национальной ассоциации по борьбе с инсультом. – 2019. – Т. 119, № 5. – С. 195.
13. Нурдинов Р.Н. [и др.]. EDAS – база данных альтернативно сплайсированных генов человека // Биофизика. – 2006. –Т.51. №4, с.589-592.
14. Харьков, В.Н. [и др.]. Генофонд бурят: клинальная изменчивость и территориальная подразделенность по маркерам Y-хромосомы // Генетика. – 2014. – Т.50. №2, с. 203-213
15. 1000 Genomes Project Consortium [и др.]. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes // Nature. 2012. № 7422 (491). С. 56–65.
16. Adamowicz M. [и др.]. XRCC1 protects transcription from toxic PARP1 activity during DNA base excision repair // Nature Cell Biology. 2021. № 12 (23). С. 1287–1298.
17. Adzhubei I. A. [и др.]. A method and server for predicting damaging missense mutations // Nature Methods. 2010. № 4 (7). С. 248–249.
18. Afonso M. S. [и др.]. Molecular Pathways Underlying Cholesterol Homeostasis // Nutrients. 2018. № 6 (10). С. 760.

19. Agbaga M.-P. [и др.]. Role of Stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008. № 35 (105). С. 12843–12848.
20. Agbaga M.-P. [и др.]. Differential composition of DHA and very-long-chain PUFAs in rod and cone photoreceptors // *Journal of Lipid Research*. 2018. № 9 (59). С. 1586–1596.
21. Ahel I. [и др.]. The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates // *Nature*. 2006. № 7112 (443). С. 713–716.
22. Aishworiya R., Protic D., Hagerman R. Autism spectrum disorder in the fragile X premutation state: possible mechanisms and implications // *Journal of Neurology*. 2022. № 9 (269). С. 4676–4683.
23. Aken B. L. [и др.]. The Ensembl gene annotation system // *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*. 2016. (2016). С. baw093.
24. Alderson N. L. [и др.]. The human FA2H gene encodes a fatty acid 2-hydroxylase // *The Journal of Biological Chemistry*. 2004. № 47 (279). С. 48562–48568.
25. Al-Gazali L., Ali B. R. Mutations of a country: a mutation review of single gene disorders in the United Arab Emirates (UAE) // *Human Mutation*. 2010. № 5 (31). С. 505–520.
26. Ali B. R. [и др.]. A missense founder mutation in VLDLR is associated with Dysequilibrium Syndrome without quadrupedal locomotion // *BMC medical genetics*. 2012. (13). С. 80.
27. Ali Z. [и др.]. Homozygous GRID2 missense mutation predicts a shift in the D-serine binding domain of GluD2 in a case with generalized brain atrophy and unusual clinical features // *BMC medical genetics*. 2017. № 1 (18). С. 144.
28. Al-Owain M. [и др.]. Novel intragenic deletion in OPHN1 in a family causing XLMR with cerebellar hypoplasia and distinctive facial appearance // *Clinical Genetics*. 2011. № 4 (79). С. 363–370.
29. Altenhoff A. M. [и др.]. OMA orthology in 2021: website overhaul, conserved isoforms, ancestral gene order and more // *Nucleic Acids Research*. 2021. № D1 (49). С. D373–D379.
30. Amano K. [и др.]. Mutational analysis of the MECP2 gene in Japanese patients with Rett syndrome // *Journal of Human Genetics*. 2000. № 4 (45). С. 231–236.
31. Amberger J. S. [и др.]. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders // *Nucleic Acids Research*. 2015. № Database issue (43). С. D789-798.

32. Amir R. E. [и др.]. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2 // *Nature Genetics*. 1999. № 2 (23). С. 185–188.
33. Amirifar P. [и др.]. Ataxia-telangiectasia: epidemiology, pathogenesis, clinical phenotype, diagnosis, prognosis and management // *Expert Review of Clinical Immunology*. 2020. № 9 (16). С. 859–871.
34. Andersen J. P. [и др.]. P4-ATPases as Phospholipid Flippases-Structure, Function, and Enigmas // *Frontiers in Physiology*. 2016. (7). С. 275.
35. Anding A. L. [и др.]. Vps13D Encodes a Ubiquitin-Binding Protein that Is Required for the Regulation of Mitochondrial Size and Clearance // *Current biology: CB*. 2018. № 2 (28). С. 287-295.e6.
36. Anheim M. [и др.]. Epidemiological, clinical, paraclinical and molecular study of a cohort of 102 patients affected with autosomal recessive progressive cerebellar ataxia from Alsace, Eastern France: implications for clinical management // *Neurogenetics*. 2010. № 1 (11). С. 1–12.
37. Anheim M., Tranchant C., Koenig M. The autosomal recessive cerebellar ataxias // *The New England Journal of Medicine*. 2012. № 7 (366). С. 636–646.
38. Armbrust K. R. [и др.]. Mutant  $\beta$ -III spectrin causes mGluR1 $\alpha$  mislocalization and functional deficits in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 5 // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2014. № 30 (34). С. 9891–9904.
39. Armstrong N. C., Anderson R. C., McDermott K. W. Reelin: Diverse roles in central nervous system development, health and disease // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2019. (112). С. 72–75.
40. Arnadottir G. A. [и др.]. Compound heterozygous mutations in UBA5 causing early-onset epileptic encephalopathy in two sisters // *BMC medical genetics*. 2017. № 1 (18). С. 103.
41. Arslan E. A. [и др.]. Genetic and phenotypic features of patients with childhood ataxias diagnosed by next-generation sequencing gene panel // *Brain & Development*. 2020. № 1 (42). С. 6–18.
42. Ashizawa T., Öz G., Paulson H. L. Spinocerebellar ataxias: prospects and challenges for therapy development // *Nature Reviews. Neurology*. 2018. № 10 (14). С. 590–605.
43. Ashizawa T., Xia G. Ataxia // *Continuum (Minneapolis, Minn.)*. 2016. № 4 Movement Disorders (22). С. 1208–1226.
44. Baldwin H. A. [и др.]. VPS13D promotes peroxisome biogenesis // *The Journal of Cell Biology*. 2021. № 5 (220). С. e202001188.
45. Balreira A. [и др.]. ANO10 mutations cause ataxia and coenzyme Q<sub>10</sub> deficiency // *Journal of Neurology*. 2014. № 11 (261). С. 2192–2198.

46. Barbosa-Morais N. L. [и др.]. The Evolutionary Landscape of Alternative Splicing in Vertebrate Species // *Science*. 2012. № 6114 (338). С. 1587–1593.
47. Basri R. [и др.]. Spectrum and prevalence of autosomal dominant spinocerebellar ataxia in Hokkaido, the northern island of Japan: a study of 113 Japanese families // *Journal of Human Genetics*. 2007. № 10 (52). С. 848–855.
48. Beaudin M. [и др.]. Recessive cerebellar and afferent ataxias - clinical challenges and future directions // *Nature Reviews. Neurology*. 2022. № 5 (18). С. 257–272.
49. Bernstein N. K. [и др.]. The molecular architecture of the mammalian DNA repair enzyme, polynucleotide kinase // *Molecular Cell*. 2005. № 5 (17). С. 657–670.
50. Bertini E. [и др.]. X-linked congenital ataxia: a clinical and genetic study // *American Journal of Medical Genetics*. 2000. № 1 (92). С. 53–56.
51. Bessa C. [и др.]. CLN2/TPP1 deficiency: the novel mutation IVS7-10A>G causes intron retention and is associated with a mild disease phenotype // *Molecular Genetics and Metabolism*. 2008. № 1 (93). С. 66–73.
52. Bettencourt C. [и др.]. Analysis of segregation patterns in Machado-Joseph disease pedigrees // *Journal of Human Genetics*. 2008. № 10 (53). С. 920–923.
53. Bettencourt C., Lima M. Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives // *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2011. (6). С. 35.
54. Billuart P. [и др.]. Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation // *Nature*. 1998. № 6679 (392). С. 923–926.
55. Birrell G. W. [и др.]. ATM mutations, haplotype analysis, and immunological status of Russian patients with ataxia telangiectasia // *Human Mutation*. 2005. № 6 (25). С. 593.
56. Blankman J. L. [и др.]. ABHD12 controls brain lysophosphatidylserine pathways that are deregulated in a murine model of the neurodegenerative disease PHARC // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013. № 4 (110). С. 1500–1505.
57. Blankman J. L., Simon G. M., Cravatt B. F. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol // *Chemistry & Biology*. 2007. № 12 (14). С. 1347–1356.
58. Boot R. G. [и др.]. Identification of the non-lysosomal glucosylceramidase as beta-glucosidase 2 // *The Journal of Biological Chemistry*. 2007. № 2 (282). С. 1305–1312.
59. Borbolla-Jiménez F. V. [и др.]. New Perspectives of Gene Therapy on Polyglutamine Spinocerebellar Ataxias: From Molecular Targets to Novel Nanovectors // *Pharmaceutics*. 2021. № 7 (13). С. 1018.
60. Boultonwood J. [и др.]. The role of the iron transporter ABCB7 in refractory anemia with ring sideroblasts // *PloS One*. 2008. № 4 (3). С. e1970.

61. Boycott K. M. [и др.]. Homozygous deletion of the very low density lipoprotein receptor gene causes autosomal recessive cerebellar hypoplasia with cerebral gyral simplification // *American Journal of Human Genetics*. 2005. № 3 (77). С. 477–483.
62. Boycott K. M. [и др.]. Mutations in VLDLR as a cause for autosomal recessive cerebellar ataxia with mental retardation (dysequilibrium syndrome) // *Journal of Child Neurology*. 2009. № 10 (24). С. 1310–1315.
63. Bras J. [и др.]. Mutations in PNKP cause recessive ataxia with oculomotor apraxia type 4 // *American Journal of Human Genetics*. 2015. № 3 (96). С. 474–479.
64. Breedveld G. J. [и др.]. A new locus for a childhood onset, slowly progressive autosomal recessive spinocerebellar ataxia maps to chromosome 11p15 // *Journal of Medical Genetics*. 2004. № 11 (41). С. 858–866.
65. Breuss M. W. [и др.]. Uner Tan syndrome caused by a homozygous TUBB2B mutation affecting microtubule stability // *Human Molecular Genetics*. 2017. № 2 (26). С. 258–269.
66. Brunetti S., Lumsden D. E. Rett Syndrome as a movement and motor disorder - A narrative review // *European journal of paediatric neurology: EJPN: official journal of the European Paediatric Neurology Society*. 2020. (28). С. 29–37.
67. Brusco A. [и др.]. Molecular genetics of hereditary spinocerebellar ataxia: mutation analysis of spinocerebellar ataxia genes and CAG/CTG repeat expansion detection in 225 Italian families // *Archives of Neurology*. 2004. № 5 (61). С. 727–733.
68. Bryer A. [и др.]. The hereditary adult-onset ataxias in South Africa // *Journal of the Neurological Sciences*. 2003. № 1 (216). С. 47–54.
69. Buijsen R. A. M. [и др.]. Genetics, Mechanisms, and Therapeutic Progress in Polyglutamine Spinocerebellar Ataxias // *Neurotherapeutics*. 2019. № 2 (16). С. 263–286.
70. Bull P. C. [и др.]. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene // *Nature Genetics*. 1993. № 4 (5). С. 327–337.
71. Burada A. P., Vinnakota R., Kumar J. The architecture of GluD2 ionotropic delta glutamate receptor elucidated by cryo-EM // *Journal of Structural Biology*. 2020. № 2 (211). С. 107546.
72. Burette A., Weinberg R. J. Perisynaptic organization of plasma membrane calcium pumps in cerebellar cortex // *The Journal of Comparative Neurology*. 2007. № 6 (500). С. 1127–1135.
73. Bushell S. R. [и др.]. The structural basis of lipid scrambling and inactivation in the endoplasmic reticulum scramblase TMEM16K // *Nature Communications*. 2019. № 1 (10). С. 3956.

74. Byers P. H. [и др.]. X-linked cutis laxa: defective cross-link formation in collagen due to decreased lysyl oxidase activity // *The New England Journal of Medicine*. 1980. № 2 (303). С. 61–65.
75. Cabet S. [и др.]. A novel truncating variant p.(Arg297\*) in the GRM1 gene causing autosomal-recessive cerebellar ataxia with juvenile-onset // *European Journal of Medical Genetics*. 2019. № 10 (62). С. 103726.
76. Caldecott K. W. [и др.]. An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III // *Molecular and Cellular Biology*. 1994. № 1 (14). С. 68–76.
77. Cali T. [и др.]. A Novel Mutation in Isoform 3 of the Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup> Pump Impairs Cellular Ca<sup>2+</sup> Homeostasis in a Patient with Cerebellar Ataxia and Laminin Subunit 1 $\alpha$  Mutations // *The Journal of Biological Chemistry*. 2015. № 26 (290). С. 16132–16141.
78. Campbell C. [и др.]. ATM mutations on distinct SNP and STR haplotypes in ataxia-telangiectasia patients of differing ethnicities reveal ancestral founder effects // *Human Mutation*. 2003. № 1 (21). С. 80–85.
79. Capalbo A. [и др.]. Optimizing clinical exome design and parallel genotyping for recessive genetic conditions in preconception carrier screening: Translational research genomic data from 14,125 exomes // *PLoS genetics*. 2019. № 10 (15). С. e1008409.
80. Cardoso-Moreira M. [и др.]. Gene expression across mammalian organ development // *Nature*. 2019. № 7766 (571). С. 505–509.
81. Carranza D. [и др.]. Molecular and Functional Characterization of a Cohort of Spanish Patients with Ataxia-Telangiectasia // *Neuromolecular Medicine*. 2017. № 1 (19). С. 161–174.
82. Castellotti B. [и др.]. Ataxia with oculomotor apraxia type 1 (AOA1): novel and recurrent aprataxin mutations, coenzyme Q10 analyses, and clinical findings in Italian patients // *Neurogenetics*. 2011. № 3 (12). С. 193–201.
83. Cavallin M. [и др.]. WDR81 mutations cause extreme microcephaly and impair mitotic progression in human fibroblasts and Drosophila neural stem cells // *Brain: A Journal of Neurology*. 2017. № 10 (140). С. 2597–2609.
84. Ceccaldi R., Sarangi P., D'Andrea A. D. The Fanconi anaemia pathway: new players and new functions // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2016. № 6 (17). С. 337–349.
85. Cerminara N. L. [и др.]. Redefining the cerebellar cortex as an assembly of non-uniform Purkinje cell microcircuits // *Nature Reviews. Neuroscience*. 2015. № 2 (16). С. 79–93.
86. Ceylan A. C. [и др.]. Autosomal recessive spinocerebellar ataxia 18 caused by homozygous exon 14 duplication in GRID2 and review of the literature // *Acta Neurologica Belgica*. 2020.

87. Chelly J. [и др.]. Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein // *Nature Genetics*. 1993. № 1 (3). С. 14–19.
88. Chen K. [и др.]. BreakDancer: an algorithm for high-resolution mapping of genomic structural variation // *Nature Methods*. 2009. № 9 (6). С. 677–681.
89. Chen Z. [и др.]. Multi-copper ferroxidase deficiency leads to iron accumulation and oxidative damage in astrocytes and oligodendrocytes // *Scientific Reports*. 2019. № 1 (9). С. 9437.
90. Chiabrando D., Bertino F., Tolosano E. Hereditary Ataxia: A Focus on Heme Metabolism and Fe-S Cluster Biogenesis // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. № 11 (21).
91. Choi H., Andersen J. P., Molday R. S. Expression and functional characterization of missense mutations in ATP8A2 linked to severe neurological disorders // *Human Mutation*. 2019. № 12 (40). С. 2353–2364.
92. Claussnitzer M. [и др.]. A brief history of human disease genetics // *Nature*. 2020. № 7789 (577). С. 179–189.
93. Clifford S. [и др.]. Autism spectrum phenotype in males and females with fragile X full mutation and premutation // *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 2007. № 4 (37). С. 738–747.
94. Coarelli G., Brice A., Durr A. Recent advances in understanding dominant spinocerebellar ataxias from clinical and genetic points of view // *F1000Research*. 2018. (7). С. F1000 Faculty Rev-1781.
95. Cocozza S. [и др.]. The «crab sign»: an imaging feature of spinocerebellar ataxia type 48 // *Neuroradiology*. 2020. № 9 (62). С. 1095–1103.
96. Colin E. [и др.]. Biallelic Variants in UBA5 Reveal that Disruption of the UFM1 Cascade Can Result in Early-Onset Encephalopathy // *American Journal of Human Genetics*. 2016. № 3 (99). С. 695–703.
97. Collier J. J. [и др.]. Developmental Consequences of Defective ATG7-Mediated Autophagy in Humans // *The New England Journal of Medicine*. 2021. № 25 (384). С. 2406–2417.
98. Collins J. F., Prohaska J. R., Knutson M. D. Metabolic crossroads of iron and copper // *Nutrition Reviews*. 2010. № 3 (68). С. 133–147.
99. Cortese A. [и др.]. Biallelic expansion of an intronic repeat in RFC1 is a common cause of late-onset ataxia // *Nature Genetics*. 2019. № 4 (51). С. 649–658.
100. Costanzo F. [и др.]. Cerebellar Agenesis and Bilateral Polimicrogyria Associated with Rare Variants of CUB and Sushi Multiple Domains 1 Gene (CSMD1): A Longitudinal Neuropsychological and Neuroradiological Case Study // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2022. № 3 (19). С. 1224.

101. Coutelier M. [и др.]. GRID2 mutations span from congenital to mild adult-onset cerebellar ataxia // *Neurology*. 2015. № 17 (84). С. 1751–1759.
102. Coutinho P. [и др.]. Hereditary ataxia and spastic paraplegia in Portugal: a population-based prevalence study // *JAMA neurology*. 2013. № 6 (70). С. 746–755.
103. Cox B. J. [и др.]. Phenotypic annotation of the mouse X chromosome // *Genome Research*. 2010. № 8 (20). С. 1154–1164.
104. Cravatt B. F. [и др.]. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides // *Nature*. 1996. № 6604 (384). С. 83–87.
105. Criscuolo C. [и др.]. Ataxia with oculomotor apraxia type 1 in Southern Italy: late onset and variable phenotype // *Neurology*. 2004. № 11 (63). С. 2173–2175.
106. Cunningham F. [и др.]. Ensembl 2022 // *Nucleic Acids Research*. 2022. № D1 (50). С. D988–D995.
107. Damásio J. [и др.]. Congenital ataxia due to novel variant in ATP8A2 // *Clinical Genetics*. 2021. № 1 (100). С. 79–83.
108. D’Arcangelo G. [и др.]. Reelin is a ligand for lipoprotein receptors // *Neuron*. 1999. № 2 (24). С. 471–479.
109. Das S. [и др.]. Similar splicing mutations of the Menkes/mottled copper-transporting ATPase gene in occipital horn syndrome and the blotchy mouse // *American Journal of Human Genetics*. 1995. № 3 (56). С. 570–576.
110. Date H. [и др.]. Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene // *Nature Genetics*. 2001. № 2 (29). С. 184–188.
111. Davarniya V. [и др.]. The Role of a Novel TRMT1 Gene Mutation and Rare GRM1 Gene Defect in Intellectual Disability in Two Azeri Families // *PloS One*. 2015. № 8 (10). С. e0129631.
112. Davies K. [и др.]. RFC1-Related Disease: Molecular and Clinical Insights // *Neurology. Genetics*. 2022. № 5 (8). С. e200016.
113. Deciphering Developmental Disorders Study Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders // *Nature*. 2017. № 7642 (542). С. 433–438.
114. DePristo M. A. [и др.]. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data // *Nature Genetics*. 2011. № 5 (43). С. 491–498.
115. Derenko M. [и др.]. Origin and post-glacial dispersal of mitochondrial DNA haplogroups C and D in northern Asia // *PloS One*. 2010. № 12 (5). С. e15214.
116. Devys D. [и др.]. The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation // *Nature Genetics*. 1993. № 4 (4). С. 335–340.

117. Dhindsa R. S. [и др.]. Natural Selection Shapes Codon Usage in the Human Genome // *American Journal of Human Genetics*. 2020. № 1 (107). С. 83–95.
118. Dietz J. V., Fox J. L., Khalimonchuk O. Down the Iron Path: Mitochondrial Iron Homeostasis and Beyond // *Cells*. 2021. № 9 (10). С. 2198.
119. D’Hooghe M. [и др.]. X-linked sideroblastic anemia and ataxia: a new family with identification of a fourth ABCB7 gene mutation // *European journal of paediatric neurology: EJPN: official journal of the European Paediatric Neurology Society*. 2012. № 6 (16). С. 730–735.
120. Di Donato N. [и др.]. Analysis of 17 genes detects mutations in 81% of 811 patients with lissencephaly // *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*. 2018a. № 11 (20). С. 1354–1364.
121. Di Donato V. [и др.]. An Attractive Reelin Gradient Establishes Synaptic Lamination in the Vertebrate Visual System // *Neuron*. 2018b. № 5 (97). С. 1049–1062.e6.
122. Di Gregorio E. [и др.]. ELOVL5 mutations cause spinocerebellar ataxia 38 // *American Journal of Human Genetics*. 2014. № 2 (95). С. 209–217.
123. Dong H.-L. [и др.]. Bi-allelic loss of function variants in COX20 gene cause autosomal recessive sensory neuronopathy // *Brain: A Journal of Neurology*. 2021. № 8 (144). С. 2457–2470.
124. Dong Y. [и др.]. Structure and mechanism of the human NHE1-CHP1 complex // *Nature Communications*. 2021. № 1 (12). С. 3474.
125. Doni D. [и др.]. The displacement of frataxin from the mitochondrial cristae correlates with abnormal respiratory supercomplexes formation and bioenergetic defects in cells of Friedreich ataxia patients // *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2021. № 3 (35). С. e21362.
126. Dragasević N. T. [и др.]. Frequency analysis and clinical characterization of different types of spinocerebellar ataxia in Serbian patients // *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*. 2006. № 2 (21). С. 187–191.
127. Duan R. [и др.]. UBA5 Mutations Cause a New Form of Autosomal Recessive Cerebellar Ataxia // *PloS One*. 2016. № 2 (11). С. e0149039.
128. Dy M. E., Sims K. B., Friedman J. TPP1 deficiency: Rare cause of isolated childhood-onset progressive ataxia // *Neurology*. 2015. № 14 (85). С. 1259–1261.
129. Edwards N. C. [и др.]. Characterization of Coding Synonymous and Non-Synonymous Variants in ADAMTS13 Using Ex Vivo and In Silico Approaches // *PLoS ONE*. 2012. № 6 (7). С. e38864.
130. Efimova N. [и др.].  $\beta$ III Spectrin Is Necessary for Formation of the Constricted Neck of Dendritic Spines and Regulation of Synaptic Activity in

Neurons // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2017. № 27 (37). С. 6442–6459.

131. Egorova P. A., Bezprozvanny I. B. Molecular Mechanisms and Therapeutics for Spinocerebellar Ataxia Type 2 // *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2019. № 4 (16). С. 1050–1073.

132. Elegheert J. [и др.]. Structural basis for integration of GluD receptors within synaptic organizer complexes // *Science (New York, N.Y.)*. 2016. № 6296 (353). С. 295–299.

133. El-Khamisy S. F. [и др.]. Defective DNA single-strand break repair in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1 // *Nature*. 2005. № 7029 (434). С. 108–113.

134. Erichsen A. K. [и др.]. Prevalence of hereditary ataxia and spastic paraplegia in southeast Norway: a population-based study // *Brain: A Journal of Neurology*. 2009. № Pt 6 (132). С. 1577–1588.

135. Escudero-Esparza A. [и др.]. The novel complement inhibitor human CUB and Sushi multiple domains 1 (CSMD1) protein promotes factor I-mediated degradation of C4b and C3b and inhibits the membrane attack complex assembly // *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2013. № 12 (27). С. 5083–5093.

136. Fadok V. A. [и др.]. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 1992. № 7 (148). С. 2207–2216.

137. Fagerberg L. [и др.]. Analysis of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide Integration of Transcriptomics and Antibody-based Proteomics // *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*. 2014. № 2 (13). С. 397–406.

138. Falabella M. [и др.]. Gene therapy for primary mitochondrial diseases: experimental advances and clinical challenges // *Nature Reviews. Neurology*. 2022. № 11 (18). С. 689–698.

139. Farzin F. [и др.]. Autism spectrum disorders and attention-deficit/hyperactivity disorder in boys with the fragile X premutation // *Journal of developmental and behavioral pediatrics: JDBP*. 2006. № 2 Suppl (27). С. S137–144.

140. Fauchereau F. [и др.]. The RhoGAP activity of OPHN1, a new F-actin-binding protein, is negatively controlled by its amino-terminal domain // *Molecular and Cellular Neurosciences*. 2003. № 4 (23). С. 574–586.

141. Faure G. [и др.]. Adaptation of mRNA structure to control protein folding // *RNA Biology*. 2017. № 12 (14). С. 1649–1654.

142. Fernández P. J. [и др.]. Form and function of the human and chimpanzee forefoot: implications for early hominin bipedalism // *Scientific Reports*. 2016. (6). С. 30532.

143. Feyma T. [и др.]. Dystonia in ATP2B3-associated X-linked spinocerebellar ataxia // *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*. 2016. № 11 (31). С. 1752–1753.
144. Filla A. [и др.]. Relative frequencies of CAG expansions in spinocerebellar ataxia and dentatorubropallidoluysian atrophy in 116 Italian families // *European Neurology*. 2000. № 1 (44). С. 31–36.
145. Froyen G. [и др.]. Detection of genomic copy number changes in patients with idiopathic mental retardation by high-resolution X-array-CGH: important role for increased gene dosage of XLMR genes // *Human Mutation*. 2007. № 10 (28). С. 1034–1042.
146. Fu C. [и др.]. Multisystem comorbidities in classic Rett syndrome: a scoping review // *BMJ paediatrics open*. 2020. № 1 (4). С. e000731.
147. Fujishima K. [и др.].  $\beta$ III spectrin controls the planarity of Purkinje cell dendrites by modulating perpendicular axon-dendrite interactions // *Development (Cambridge, England)*. 2020. № 24 (147). С. dev194530.
148. Galatolo D. [и др.]. NGS in Hereditary Ataxia: When Rare Becomes Frequent // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. № 16 (22). С. 8490.
149. Garcias G. D. L., Roth M. D. G. M. A Brazilian family with quadrupedal gait, severe mental retardation, coarse facial characteristics, and hirsutism // *The International Journal of Neuroscience*. 2007. № 7 (117). С. 927–933.
150. Gécz J. [и др.]. Characterization of the human glutamate receptor subunit 3 gene (GRIA3), a candidate for bipolar disorder and nonspecific X-linked mental retardation // *Genomics*. 1999. № 3 (62). С. 356–368.
151. Geerdink N. [и др.]. MECP2 mutation in a boy with severe neonatal encephalopathy: clinical, neuropathological and molecular findings // *Neuropediatrics*. 2002. № 1 (33). С. 33–36.
152. Gialeli C., Gungor B., Blom A. M. Novel potential inhibitors of complement system and their roles in complement regulation and beyond // *Molecular Immunology*. 2018. (102). С. 73–83.
153. Gibbons R. J. [и др.]. Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation with alpha-thalassemia (ATR-X syndrome) // *Cell*. 1995. № 6 (80). С. 837–845.
154. Giorgio E. [и др.]. Whole exome sequencing is necessary to clarify ID/DD cases with de novo copy number variants of uncertain significance: Two proof-of-concept examples // *American Journal of Medical Genetics. Part A*. 2016. № 7 (170). С. 1772–1779.
155. Gisatulin M. [и др.]. Clinical spectrum of the pentanucleotide repeat expansion in the RFC1 gene in ataxia syndromes // *Neurology*. 2020. № 21 (95). С. e2912–e2923.

156. Govek E.-E. [и др.]. The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis // *Nature Neuroscience*. 2004. № 4 (7). С. 364–372.
157. Gros-Louis F. [и др.]. Mutations in SYNE1 lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia // *Nature Genetics*. 2007. № 1 (39). С. 80–85.
158. GTEx Consortium The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project // *Nature Genetics*. 2013. № 6 (45). С. 580–585.
159. Guergueltcheva V. [и др.]. Autosomal-recessive congenital cerebellar ataxia is caused by mutations in metabotropic glutamate receptor 1 // *American Journal of Human Genetics*. 2012. № 3 (91). С. 553–564.
160. Guissart C. [и др.]. Mutation of SLC9A1, encoding the major Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, causes ataxia-deafness Lichtenstein-Knorr syndrome // *Human Molecular Genetics*. 2015. № 2 (24). С. 463–470.
161. Guissart C. [и др.]. ATP8A2-related disorders as recessive cerebellar ataxia // *Journal of Neurology*. 2020. № 1 (267). С. 203–213.
162. Gulsuner S. [и др.]. Homozygosity mapping and targeted genomic sequencing reveal the gene responsible for cerebellar hypoplasia and quadrupedal locomotion in a consanguineous kindred // *Genome Research*. 2011. № 12 (21). С. 1995–2003.
163. Guo L. [и др.]. Stereospecificity of fatty acid 2-hydroxylase and differential functions of 2-hydroxy fatty acid enantiomers // *Journal of Lipid Research*. 2012. № 7 (53). С. 1327–1335.
164. Gutierrez M. A., Dwyer B. E., Franco S. J. Csm2 Is a Synaptic Transmembrane Protein that Interacts with PSD-95 and Is Required for Neuronal Maturation // *eNeuro*. 2019. № 2 (6).
165. Habisov S. [и др.]. Structural and Functional Analysis of a Novel Interaction Motif within UFM1-activating Enzyme 5 (UBA5) Required for Binding to Ubiquitin-like Proteins and Ufmylation // *The Journal of Biological Chemistry*. 2016. № 17 (291). С. 9025–9041.
166. Hagberg B. Rett's syndrome: prevalence and impact on progressive severe mental retardation in girls // *Acta Paediatrica Scandinavica*. 1985. № 3 (74). С. 405–408.
167. Hagerman P. J., Hagerman R. J. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2015. (1338). С. 58–70.
168. Hagerman R. J. [и др.]. Fragile X-Associated Neuropsychiatric Disorders (FXAND) // *Frontiers in Psychiatry*. 2018. (9). С. 564.

169. Hakonen A. H. [и др.]. Mitochondrial DNA polymerase W748S mutation: a common cause of autosomal recessive ataxia with ancient European origin // *American Journal of Human Genetics*. 2005. № 3 (77). С. 430–441.
170. Hamanaka K. [и др.]. Amelioration of a neurodevelopmental disorder by carbamazepine in a case having a gain-of-function GRIA3 variant // *Human Genetics*. 2022. № 2 (141). С. 283–293.
171. Hammans S. R. The inherited ataxias and the new genetics // *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 1996. № 4 (61). С. 327–332.
172. Hayashi S. [и др.]. Comprehensive investigation of CASK mutations and other genetic etiologies in 41 patients with intellectual disability and microcephaly with pontine and cerebellar hypoplasia (MICPCH) // *PloS One*. 2017. № 8 (12). С. e0181791.
173. Heidari E. [и др.]. Novel variants in critical domains of ATP8A2 and expansion of clinical spectrum // *Human Mutation*. 2021. № 5 (42). С. 491–497.
174. Hersheson J., Haworth A., Houlden H. The inherited ataxias: genetic heterogeneity, mutation databases, and future directions in research and clinical diagnostics // *Human Mutation*. 2012. № 9 (33). С. 1324–1332.
175. Hetzelt K. L. M. L. [и др.]. A case of severe autosomal recessive spinocerebellar ataxia type 18 with a novel nonsense variant in GRID2 // *European Journal of Medical Genetics*. 2020. № 9 (63). С. 103998.
176. Higuchi Y. [и др.]. Mutations in COA7 cause spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy // *Brain: A Journal of Neurology*. 2018. № 6 (141). С. 1622–1636.
177. Hills L. B. [и др.]. Deletions in GRID2 lead to a recessive syndrome of cerebellar ataxia and tonic upgaze in humans // *Neurology*. 2013. № 16 (81). С. 1378–1386.
178. Hirasawa M. [и др.]. Carbonic anhydrase related protein 8 mutation results in aberrant synaptic morphology and excitatory synaptic function in the cerebellum // *Molecular and Cellular Neurosciences*. 2007. № 1 (35). С. 161–170.
179. Hirota J. [и др.]. Carbonic anhydrase-related protein is a novel binding protein for inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 // *The Biochemical Journal*. 2003. № Pt 2 (372). С. 435–441.
180. Hoch N. C. [и др.]. XRCC1 mutation is associated with PARP1 hyperactivation and cerebellar ataxia // *Nature*. 2017. № 7635 (541). С. 87–91.
181. Hollenstein K., Dawson R. J. P., Locher K. P. Structure and mechanism of ABC transporter proteins // *Current Opinion in Structural Biology*. 2007. № 4 (17). С. 412–418.
182. Hong S. E. [и др.]. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations // *Nature Genetics*. 2000. № 1 (26). С. 93–96.

183. Hoxha E. [и др.]. Purkinje Cell Signaling Deficits in Animal Models of Ataxia // *Frontiers in Synaptic Neuroscience*. 2018. (10). С. 6.
184. Hu Y., Reggiori F. Molecular regulation of autophagosome formation // *Biochemical Society Transactions*. 2022. № 1 (50). С. 55–69.
185. Hull C., Regehr W. G. The Cerebellar Cortex // *Annual Review of Neuroscience*. 2022. (45). С. 151–175.
186. Ikeda Y. [и др.]. Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5 // *Nature Genetics*. 2006. № 2 (38). С. 184–190.
187. Illarioshkin S. N. [и др.]. X-linked nonprogressive congenital cerebellar hypoplasia: clinical description and mapping to chromosome Xq // *Annals of Neurology*. 1996. № 1 (40). С. 75–83.
188. Пyas M. [и др.]. The genetics of intellectual disability: advancing technology and gene editing // *F1000Research*. 2020. (9). С. F1000 Faculty Rev-22.
189. Infante J. [и др.]. Autosomal dominant cerebellar ataxias in Spain: molecular and clinical correlations, prevalence estimation and survival analysis // *Acta Neurologica Scandinavica*. 2005. № 6 (111). С. 391–399.
190. International Human Genome Sequencing Consortium Finishing the euchromatic sequence of the human genome // *Nature*. 2004. № 7011 (431). С. 931–945.
191. Iodice A. [и др.]. Long-term follow-up in infantile-onset SCAR18: A case report // *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. 2020. (77). С. 232–234.
192. Iwama K. [и др.]. A novel SLC9A1 mutation causes cerebellar ataxia // *Journal of Human Genetics*. 2018. № 10 (63). С. 1049–1054.
193. Jackson C. L., Walch L., Verbavatz J.-M. Lipids and Their Trafficking: An Integral Part of Cellular Organization // *Developmental Cell*. 2016. № 2 (39). С. 139–153.
194. Jacquemont S. [и др.]. Fragile X premutation tremor/ataxia syndrome: molecular, clinical, and neuroimaging correlates // *American Journal of Human Genetics*. 2003. № 4 (72). С. 869–878.
195. Jacquemyn J., Cascalho A., Goodchild R. E. The ins and outs of endoplasmic reticulum-controlled lipid biosynthesis // *EMBO reports*. 2017. № 11 (18). С. 1905–1921.
196. Jaganathan K. [и др.]. Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning // *Cell*. 2019. № 3 (176). С. 535-548.e24.
197. Jakobs B. S. [и др.]. A novel mutation in COQ2 leading to fatal infantile multisystem disease // *Journal of the Neurological Sciences*. 2013. № 1–2 (326). С. 24–28.

198. Jardim L. B. [и др.]. A survey of spinocerebellar ataxia in South Brazil - 66 new cases with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease-causing mutations // *Journal of Neurology*. 2001. № 10 (248). С. 870–876.
199. Jiang H. [и др.]. Frequency analysis of autosomal dominant spinocerebellar ataxias in mainland Chinese patients and clinical and molecular characterization of spinocerebellar ataxia type 6 // *Chinese Medical Journal*. 2005. № 10 (118). С. 837–843.
200. Jiang L. [и др.]. Exploration of the copper-related compensatory response in the Belgrade rat model of genetic iron deficiency // *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2011. № 5 (301). С. G877–G886.
201. Jiao B. [и др.]. Homozygosity mapping and next generation sequencing for the genetic diagnosis of hereditary ataxia and spastic paraplegia in consanguineous families // *Parkinsonism & Related Disorders*. 2020. (80). С. 65–72.
202. Jilani A. [и др.]. Molecular cloning of the human gene, PNKP, encoding a polynucleotide kinase 3'-phosphatase and evidence for its role in repair of DNA strand breaks caused by oxidative damage // *The Journal of Biological Chemistry*. 1999. № 34 (274). С. 24176–24186.
203. Jin D. K. [и др.]. Frequency of spinocerebellar ataxia types 1,2,3,6,7 and dentatorubral pallidoluysian atrophy mutations in Korean patients with spinocerebellar ataxia // *Journal of Neurology*. 1999. № 3 (246). С. 207–210.
204. Jin Q. [и др.]. The PGAM4 gene in non-obstructive azoospermia // *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2013. № 4 (59). С. 179–183.
205. Jumper J. [и др.]. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold // *Nature*. 2021. № 7873 (596). С. 583–589.
206. Juvonen V. [и др.]. Dissecting the epidemiology of a trinucleotide repeat disease - example of FRDA in Finland // *Human Genetics*. 2002. № 1 (110). С. 36–40.
207. Juvonen V. [и др.]. The occurrence of dominant spinocerebellar ataxias among 251 Finnish ataxia patients and the role of predisposing large normal alleles in a genetically isolated population // *Acta Neurologica Scandinavica*. 2005. № 3 (111). С. 154–162.
208. Kajava A. V. Structural diversity of leucine-rich repeat proteins // *Journal of Molecular Biology*. 1998. № 3 (277). С. 519–527.
209. Kalmár T. [и др.]. A Novel Homozygous Frameshift WDR81 Mutation associated with Microlissencephaly, Corpus Callosum Agenesis, and Pontocerebellar Hypoplasia // *Journal of Pediatric Genetics*. 2021. № 2 (10). С. 159–163.
210. Kapushesky M. [и др.]. Gene Expression Atlas at the European Bioinformatics Institute // *Nucleic Acids Research*. 2010. № suppl\_1 (38). С. D690–D698.

211. Karczewski K. J. [и др.]. The ExAC browser: displaying reference data information from over 60 000 exomes // *Nucleic Acids Research*. 2017. № D1 (45). C. D840–D845.
212. Karczewski K. J. [и др.]. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans // *Nature*. 2020. № 7809 (581). C. 434–443.
213. Karczewski K. J. [и др.]. Author Correction: The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans // *Nature*. 2021. № 7846 (590). C. E53.
214. Karolchik D. [и др.]. The UCSC Table Browser data retrieval tool // *Nucleic Acids Research*. 2004. № Database issue (32). C. D493–496.
215. Kato K. Sequence of a novel carbonic anhydrase-related polypeptide and its exclusive presence in Purkinje cells // *FEBS letters*. 1990. № 1–2 (271). C. 137–140.
216. Kaya N. [и др.]. Phenotypical spectrum of cerebellar ataxia associated with a novel mutation in the CA8 gene, encoding carbonic anhydrase (CA) VIII // *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*. 2011. № 7 (156B). C. 826–834.
217. Kelley L. A. [и др.]. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis // *Nature Protocols*. 2015. № 6 (10). C. 845–858.
218. Kennerson M. L. [и др.]. Missense mutations in the copper transporter gene ATP7A cause X-linked distal hereditary motor neuropathy // *American Journal of Human Genetics*. 2010. № 3 (86). C. 343–352.
219. Kim J. Y., Kim J.-K., Kim H. ABCB7 simultaneously regulates apoptotic and non-apoptotic cell death by modulating mitochondrial ROS and HIF1 $\alpha$ -driven NF $\kappa$ B signaling // *Oncogene*. 2020. № 9 (39). C. 1969–1982.
220. Kim H.-S. [и др.]. Schwann Cell Precursors from Human Pluripotent Stem Cells as a Potential Therapeutic Target for Myelin Repair // *Stem Cell Reports*. 2017. № 6 (8). C. 1714–1726.
221. Kim M. [и др.]. Mutation in ATG5 reduces autophagy and leads to ataxia with developmental delay // *eLife*. 2016. (5). C. e12245.
222. Kim M. [и др.]. Clarification of undiagnosed ataxia using whole-exome sequencing with clinical implications // *Parkinsonism & Related Disorders*. 2020. (80). C. 58–64.
223. Kircher M. [и др.]. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants // *Nature Genetics*. 2014. № 3 (46). C. 310–315.
224. Kleefstra T. [и др.]. MECP2 analysis in mentally retarded patients: implications for routine DNA diagnostics // *European journal of human genetics: EJHG*. 2004. № 1 (12). C. 24–28.

225. Klockgether T., Dichgans J. The genetic basis of hereditary ataxia // *Progress in Brain Research*. 1997. (114). С. 569–576.
226. Klockgether T., Mariotti C., Paulson H. L. Spinocerebellar ataxia // *Nature Reviews. Disease Primers*. 2019. № 1 (5). С. 24.
227. Kobe B., Kajava A. V. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif // *Current Opinion in Structural Biology*. 2001. № 6 (11). С. 725–732.
228. Kodigepalli K. M. [и др.]. Roles and regulation of phospholipid scramblases // *FEBS letters*. 2015. № 1 (589). С. 3–14.
229. Koehl A. [и др.]. Structural Insights into Metabotropic Glutamate Receptor Activation // *Nature*. 2019. № 7742 (566). С. 79–84.
230. Kolanczyk M. [и др.]. Missense variant in *CCDC22* causes X-linked recessive intellectual disability with features of Ritscher-Schinzel/3C syndrome // *European journal of human genetics: EJHG*. 2015. № 5 (23). С. 720.
231. Kolb L. E. [и др.]. Novel *VLDLR* microdeletion identified in two Turkish siblings with pachygyria and pontocerebellar atrophy // *Neurogenetics*. 2010. № 3 (11). С. 319–325.
232. Komatsu M. [и др.]. Essential role for autophagy protein *Atg7* in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007. № 36 (104). С. 14489–14494.
233. Kraus D. M. [и др.]. *CSMD1* is a novel multiple domain complement-regulatory protein highly expressed in the central nervous system and epithelial tissues // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 2006. № 7 (176). С. 4419–4430.
234. Kraus D. M. [и др.]. *CSMD1* is expressed as a membrane protein on neuronal growth cones that colocalizes with F-actin and alpha-3 integrin // *Molecular Immunology*. 2007. № 1 (44). С. 198.
235. Kvistad P. H., Dahl A., Skre H. Autosomal recessive non-progressive ataxia with an early childhood debut // *Acta Neurologica Scandinavica*. 1985. № 4 (71). С. 295–302.
236. Laccione F. [и др.]. *MECP2* gene nucleotide changes and their pathogenicity in males: proceed with caution // *Journal of Medical Genetics*. 2002. № 8 (39). С. 586–588.
237. Lagier-Tourenne C. [и др.]. *ADCK3*, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q10 deficiency // *American Journal of Human Genetics*. 2008. № 3 (82). С. 661–672.
238. Lalouette A., Guénet J.-L., Vríz S. Hotfoot Mouse Mutations Affect the  $\delta 2$  Glutamate Receptor Gene and Are Allelic to Lurcher // *Genomics*. 1998. № 1 (50). С. 9–13.

239. Lamoril J. [и др.]. Human erythropoietic protoporphyria: two point mutations in the ferrochelatase gene // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1991. № 2 (181). С. 594–599.
240. Lamperti C. [и др.]. Cerebellar ataxia and coenzyme Q10 deficiency // *Neurology*. 2003. № 7 (60). С. 1206–1208.
241. Lander E. S. [и др.]. Initial sequencing and analysis of the human genome // *Nature*. 2001. № 6822 (409). С. 860–921.
242. Landrum M. J. [и др.]. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence // *Nucleic Acids Research*. 2018. № D1 (46). С. D1062–D1067.
243. Lang A. B. [и др.]. ER-mitochondrial junctions can be bypassed by dominant mutations in the endosomal protein Vps13 // *The Journal of Cell Biology*. 2015. № 6 (210). С. 883–890.
244. Latimer B., Lovejoy C. O. Metatarsophalangeal joints of *Australopithecus afarensis* // *American Journal of Physical Anthropology*. 1990. № 1 (83). С. 13–23.
245. Lauzier A. [и др.]. Snazarus and its human ortholog SNX25 modulate autophagic flux // *Journal of Cell Science*. 2022. № 5 (135). С. jcs258733.
246. Lax N. Z. [и др.]. Sensory neuronopathy in patients harbouring recessive polymerase  $\gamma$  mutations // *Brain: A Journal of Neurology*. 2012. № Pt 1 (135). С. 62–71.
247. Lee E. B. [и др.]. Expansion of the classification of FTLTD-TDP: distinct pathology associated with rapidly progressive frontotemporal degeneration // *Acta Neuropathologica*. 2017. № 1 (134). С. 65–78.
248. Lee J. [и др.]. Ataxin-2: A versatile posttranscriptional regulator and its implication in neural function // *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*. 2018. № 6 (9). С. e1488.
249. Lee S. S., Wan M., Francke U. Spectrum of MECP2 mutations in Rett syndrome // *Brain & Development*. 2001. (23 Suppl 1). С. S138-143.
250. Lein E. S. [и др.]. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain // *Nature*. 2007. № 7124 (445). С. 168–176.
251. Lek M. [и др.]. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans // *Nature*. 2016. № 7616 (536). С. 285–291.
252. Li H. [и др.]. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools // *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2009. № 16 (25). С. 2078–2079.
253. Li H., Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform // *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2010. № 5 (26). С. 589–595.
254. Li Y. [и др.]. DNAH2 is a novel candidate gene associated with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella // *Clinical Genetics*. 2019. № 5 (95). С. 590–600.

255. Lim E. T. [и др.]. Rare complete knockouts in humans: population distribution and significant role in autism spectrum disorders // *Neuron*. 2013. № 2 (77). С. 235–242.
256. Lim Z. [и др.]. Expanding the clinical picture of the MECP2 Duplication syndrome // *Clinical Genetics*. 2017. № 4 (91). С. 557–563.
257. Lindsay S. J. [и др.]. HDBR Expression: A Unique Resource for Global and Individual Gene Expression Studies during Early Human Brain Development // *Frontiers in Neuroanatomy*. 2016. (10). С. 86.
258. Lise S. [и др.]. Recessive mutations in SPTBN2 implicate  $\beta$ -III spectrin in both cognitive and motor development // *PLoS genetics*. 2012. № 12 (8). С. e1003074.
259. Liu K. [и др.]. Negative regulation of phosphatidylinositol 3-phosphate levels in early-to-late endosome conversion // *Journal of Cell Biology*. 2016. № 2 (212). С. 181–198.
260. Liu W. [и др.]. IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences // *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2015. № 20 (31). С. 3359–3361.
261. Lopez-Marques R. L. [и др.]. P4-ATPases: lipid flippases in cell membranes // *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*. 2014. № 7 (466). С. 1227–1240.
262. Lopreiato R., Giacomello M., Carafoli E. The plasma membrane calcium pump: new ways to look at an old enzyme // *The Journal of Biological Chemistry*. 2014. № 15 (289). С. 10261–10268.
263. Low K. J. [и др.]. Hemizygous UBA5 missense mutation unmasks recessive disorder in a patient with infantile-onset encephalopathy, acquired microcephaly, small cerebellum, movement disorder and severe neurodevelopmental delay // *European Journal of Medical Genetics*. 2019. № 2 (62). С. 97–102.
264. Lugtenberg D. [и др.]. Structural variation in Xq28: MECP2 duplications in 1% of patients with unexplained XLMR and in 2% of male patients with severe encephalopathy // *European journal of human genetics: EJHG*. 2009. № 4 (17). С. 444–453.
265. Lynch D. R., Farmer G. Mitochondrial and metabolic dysfunction in Friedreich ataxia: update on pathophysiological relevance and clinical interventions // *Neuronal Signaling*. 2021. № 2 (5). С. NS20200093.
266. Maier A. [и др.]. De novo partial deletion in GRID2 presenting with complicated spastic paraplegia // *Muscle & Nerve*. 2014. № 2 (49). С. 289–292.
267. Maio N. [и др.]. Dimeric ferrochelatase bridges ABCB7 and ABCB10 homodimers in an architecturally defined molecular complex required for heme biosynthesis // *Haematologica*. 2019. № 9 (104). С. 1756–1767.

268. Majka J., Burgers P. M. J. The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders // *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 2004. (78). С. 227–260.
269. Mao L.-M. [и др.]. Group I Metabotropic Glutamate Receptors and Interacting Partners: An Update // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. № 2 (23). С. 840.
270. Marano D. [и др.]. Transcriptomic and Epigenomic Landscape in Rett Syndrome // *Biomolecules*. 2021. № 7 (11). С. 967.
271. Mariotti C. [и др.]. Ataxia with isolated vitamin E deficiency: neurological phenotype, clinical follow-up and novel mutations in TTPA gene in Italian families // *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 2004. № 3 (25). С. 130–137.
272. Marques A. R. A. [и др.]. Reducing GBA2 Activity Ameliorates Neuropathology in Niemann-Pick Type C Mice // *PLoS ONE*. 2015. № 8 (10). С. e0135889.
273. Martin H. C. [и др.]. The contribution of X-linked coding variation to severe developmental disorders // *Nature Communications*. 2021. № 1 (12). С. 627.
274. Martín-Hernández E. [и др.]. New ATP8A2 gene mutations associated with a novel syndrome: encephalopathy, intellectual disability, severe hypotonia, chorea and optic atrophy // *Neurogenetics*. 2016. № 4 (17). С. 259–263.
275. Matsuda S., Yuzaki M. Mutation in hotfoot-4J mice results in retention of delta2 glutamate receptors in ER // *The European Journal of Neuroscience*. 2002. № 8 (16). С. 1507–1516.
276. Matsuda K. [и др.]. Cbln1 is a ligand for an orphan glutamate receptor delta2, a bidirectional synapse organizer // *Science (New York, N.Y.)*. 2010. № 5976 (328). С. 363–368.
277. Maxam A. M., Gilbert W. A new method for sequencing DNA. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977. № 2 (74). С. 560–564.
278. McKenna A. [и др.]. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data // *Genome Research*. 2010. № 9 (20). С. 1297–1303.
279. McLaren W. [и др.]. The Ensembl Variant Effect Predictor // *Genome Biology*. 2016. № 1 (17). С. 122.
280. McMillan H. J. [и др.]. Recessive mutations in ATP8A2 cause severe hypotonia, cognitive impairment, hyperkinetic movement disorders and progressive optic atrophy // *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2018. № 1 (13). С. 86.
281. Micalizzi A. [и др.]. Very mild features of dysequilibrium syndrome associated with a novel VLDLR missense mutation // *Neurogenetics*. 2016. № 3 (17). С. 191–195.

282. Mignon-Ravix C. [и др.]. Abnormal function of the UBA5 protein in a case of early developmental and epileptic encephalopathy with suppression-burst // *Human Mutation*. 2018. № 7 (39). С. 934–938.
283. Miller J. A. [и др.]. Transcriptional landscape of the prenatal human brain // *Nature*. 2014. № 7495 (508). С. 199–206.
284. Min J.-N. [и др.]. CHIP deficiency decreases longevity, with accelerated aging phenotypes accompanied by altered protein quality control // *Molecular and Cellular Biology*. 2008. № 12 (28). С. 4018–4025.
285. Mitui M. [и др.]. ATM gene founder haplotypes and associated mutations in Polish families with ataxia-telangiectasia // *Annals of Human Genetics*. 2005. № Pt 6 (69). С. 657–664.
286. Mizukami T., Kohno T., Hattori M. CUB and Sushi multiple domains 3 regulates dendrite development // *Neuroscience Research*. 2016. (110). С. 11–17.
287. Mohamadian M. [и др.]. A novel homozygous variant in an Iranian pedigree with cerebellar ataxia, mental retardation, and dysequilibrium syndrome type 4 // *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2020. № 11 (34). С. e23484.
288. Mohamed Ibrahim N. [и др.]. Frequency of Spinocerebellar Ataxia type 1, 2, 3, 6 and 7 and clinical profile of Spinocerebellar Ataxia type 3 in Malaysia // *Cerebellum & Ataxias*. 2020. (7). С. 11.
289. Moheb L. A. [и др.]. Identification of a nonsense mutation in the very low-density lipoprotein receptor gene (VLDLR) in an Iranian family with dysequilibrium syndrome // *European journal of human genetics: EJHG*. 2008. № 2 (16). С. 270–273.
290. Møller L. B. [и др.]. A silent nucleotide substitution in the ATP7A gene in a child with Menkes disease // *Molecular Genetics and Metabolism*. 2013. № 4 (110). С. 490–492.
291. Monnot A. D. [и др.]. Regulation of brain copper homeostasis by the brain barrier systems: effects of Fe-overload and Fe-deficiency // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2011. № 3 (256). С. 249–257.
292. Montaut S. [и др.]. Biallelic RFC1-expansion in a French multicentric sporadic ataxia cohort // *Journal of Neurology*. 2021. № 9 (268). С. 3337–3343.
293. Montero R. [и др.]. Clinical, biochemical and molecular aspects of cerebellar ataxia and Coenzyme Q10 deficiency // *Cerebellum (London, England)*. 2007. № 2 (6). С. 118–122.
294. Moog U. [и др.]. Phenotypic spectrum associated with CASK loss-of-function mutations // *Journal of Medical Genetics*. 2011. № 11 (48). С. 741–751.
295. Moog U. [и др.]. Phenotypic and molecular insights into CASK-related disorders in males // *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2015. (10). С. 44.

296. Moon H. M., Wynshaw-Boris A. Cytoskeleton in action: lissencephaly, a neuronal migration disorder // *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*. 2013. № 2 (2). С. 229–245.
297. Moon Y.-A., Hammer R. E., Horton J. D. Deletion of ELOVL5 leads to fatty liver through activation of SREBP-1c in mice // *Journal of Lipid Research*. 2009. № 3 (50). С. 412–423.
298. Moreira M. C. [и др.]. The gene mutated in ataxia-ocular apraxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin // *Nature Genetics*. 2001. № 2 (29). С. 189–193.
299. Moreira M.-C. [и др.]. Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2 // *Nature Genetics*. 2004. № 3 (36). С. 225–227.
300. Moser M. [и др.]. Cloning and expression of the murine sws/NTE gene // *Mechanisms of Development*. 2000. № 2 (90). С. 279–282.
301. Müller P. M. [и др.]. Systems analysis of RhoGEF and RhoGAP regulatory proteins reveals spatially organized RAC1 signalling from integrin adhesions // *Nature Cell Biology*. 2020. № 4 (22). С. 498–511.
302. Multiple-System Atrophy Research Collaboration Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy // *The New England Journal of Medicine*. 2013. № 3 (369). С. 233–244.
303. Muona M. [и др.]. Biallelic Variants in UBA5 Link Dysfunctional UFM1 Ubiquitin-like Modifier Pathway to Severe Infantile-Onset Encephalopathy // *American Journal of Human Genetics*. 2016. № 3 (99). С. 683–694.
304. Muotri A. R. [и др.]. L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2 // *Nature*. 2010. № 7322 (468). С. 443–446.
305. Musselman K. E. [и др.]. Prevalence of ataxia in children: a systematic review // *Neurology*. 2014. № 1 (82). С. 80–89.
306. Nahorski M. S. [и др.]. Biallelic UFM1 and UFC1 mutations expand the essential role of ufmylation in brain development // *Brain: A Journal of Neurology*. 2018. № 7 (141). С. 1934–1945.
307. Najm J. [и др.]. Mutations of CASK cause an X-linked brain malformation phenotype with microcephaly and hypoplasia of the brainstem and cerebellum // *Nature Genetics*. 2008. № 9 (40). С. 1065–1067.
308. Najmabadi H. [и др.]. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders // *Nature*. 2011. № 7367 (478). С. 57–63.
309. Nakamura K. [и др.]. The C-terminal region of Reelin is necessary for proper positioning of a subset of Purkinje cells in the postnatal cerebellum // *Neuroscience*. 2016. (336). С. 20–29.
310. Nanetti L. [и др.]. ANO10 mutational screening in recessive ataxia: genetic findings and refinement of the clinical phenotype // *Journal of Neurology*. 2019. № 2 (266). С. 378–385.

311. Ng A. C. Y. [и др.]. Human leucine-rich repeat proteins: a genome-wide bioinformatic categorization and functional analysis in innate immunity // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011. (108 Suppl 1). С. 4631–4638.
312. Nicholas K., Nicholas H., Deerfield D. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. 1997. (4). С. 14.
313. Nikpour M. [и др.]. The transporter ABCB7 is a mediator of the phenotype of acquired refractory anemia with ring sideroblasts // *Leukemia*. 2013. № 4 (27). С. 889–896.
314. Nishiyama J. [и др.]. Aberrant membranes and double-membrane structures accumulate in the axons of Atg5-null Purkinje cells before neuronal death // *Autophagy*. 2007. № 6 (3). С. 591–596.
315. Nurk S. [и др.]. The complete sequence of a human genome // *Science (New York, N.Y.)*. 2022. № 6588 (376). С. 44–53.
316. O'Connor E. [и др.]. Mutations in XRCC1 cause cerebellar ataxia and peripheral neuropathy // *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 2018. № 11 (89). С. 1230–1232.
317. Ogaki K. [и др.]. Analysis of COQ2 gene in multiple system atrophy // *Molecular Neurodegeneration*. 2014. (9). С. 44.
318. Ohno Y. [и др.]. ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010. № 43 (107). С. 18439–18444.
319. Okuda H. [и др.]. A single nucleotide polymorphism within the novel sex-linked testis-specific retrotransposed PGAM4 gene influences human male fertility // *PloS One*. 2012. № 5 (7). С. e35195.
320. Olmos V. [и др.]. The extra-cerebellar effects of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1): looking beyond the cerebellum // *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 2022. № 8 (79). С. 404.
321. Omasits U. [и др.]. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data // *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2014. № 6 (30). С. 884–886.
322. Onat O. E. [и др.]. Missense mutation in the ATPase, aminophospholipid transporter protein ATP8A2 is associated with cerebellar atrophy and quadrupedal locomotion // *European journal of human genetics: EJHG*. 2013. № 3 (21). С. 281–285.
323. Ouahchi K. [и др.]. Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the alpha-tocopherol transfer protein // *Nature Genetics*. 1995. № 2 (9). С. 141–145.
324. Ozcelik T. [и др.]. Mutations in the very low-density lipoprotein receptor VLDLR cause cerebellar hypoplasia and quadrupedal locomotion in humans //

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008. № 11 (105). С. 4232–4236.

325. Pandey A. K. [и др.]. Mitochondria export iron-sulfur and sulfur intermediates to the cytoplasm for iron-sulfur cluster assembly and tRNA thiolation in yeast // *The Journal of Biological Chemistry*. 2019. № 24 (294). С. 9489–9502.

326. Papatheodorou I. [и др.]. Expression Atlas update: from tissues to single cells // *Nucleic Acids Research*. 2020. № D1 (48). С. D77–D83.

327. Parrini E. [и др.]. Genetic Basis of Brain Malformations // *Molecular Syndromology*. 2016. № 4 (7). С. 220–233.

328. Paternoster L. [и др.]. Novel homozygous variant of carbonic anhydrase 8 gene expanding the phenotype of cerebellar ataxia, mental retardation, and disequilibrium syndrome subtype 3 // *American Journal of Medical Genetics. Part A*. 2020. № 11 (182). С. 2685–2693.

329. Paul B. T. [и др.]. Mitochondria and Iron: current questions // *Expert Review of Hematology*. 2017. № 1 (10). С. 65–79.

330. Pearson S. A., Cowan J. A. Evolution of the human mitochondrial ABCB7 [2Fe-2S](GS)<sub>4</sub> cluster exporter and the molecular mechanism of an E433K disease-causing mutation // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2021. (697). С. 108661.

331. Perelman P. [и др.]. A molecular phylogeny of living primates // *PLoS genetics*. 2011. № 3 (7). С. e1001342.

332. Pergande M. [и др.]. The genomic and clinical landscape of fetal akinesia // *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*. 2020. № 3 (22). С. 511–523.

333. Peter B. [и др.]. Structural basis for adPEO-causing mutations in the mitochondrial TWINKLE helicase // *Human Molecular Genetics*. 2019. № 7 (28). С. 1090–1099.

334. Pin J.-P., Bettler B. Organization and functions of mGlu and GABAB receptor complexes // *Nature*. 2016. № 7631 (540). С. 60–68.

335. Piton A., Redin C., Mandel J.-L. XLID-causing mutations and associated genes challenged in light of data from large-scale human exome sequencing // *American Journal of Human Genetics*. 2013. № 2 (93). С. 368–383.

336. Platonov F. A. [и др.]. Genetic fitness and selection intensity in a population affected with high-incidence spinocerebellar ataxia type 1 // *Neurogenetics*. 2016. № 3 (17). С. 179–185.

337. Pollard K. S. [и др.]. Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies // *Genome Research*. 2010. № 1 (20). С. 110–121.

338. Polo J. M. [и др.]. Hereditary ataxias and paraplegias in Cantabria, Spain. An epidemiological and clinical study // *Brain: A Journal of Neurology*. 1991. (114 (Pt 2)). С. 855–866.

339. Ponderre C. [и др.]. Abcb7, the gene responsible for X-linked sideroblastic anemia with ataxia, is essential for hematopoiesis // *Blood*. 2007. № 8 (109). С. 3567–3569.
340. Pondarré C. [и др.]. The mitochondrial ATP-binding cassette transporter Abcb7 is essential in mice and participates in cytosolic iron-sulfur cluster biogenesis // *Human Molecular Genetics*. 2006. № 6 (15). С. 953–964.
341. Poretti A., Boltshauser E., Doherty D. Cerebellar hypoplasia: Differential diagnosis and diagnostic approach // *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*. 2014. № 2 (166). С. 211–226.
342. Protasova M. S. [и др.]. Novel genes bearing mutations in rare cases of early-onset ataxia with cerebellar hypoplasia // *European Journal of Human Genetics*. 2022. № 6 (30). С. 703–711.
343. Pruitt K. D. [и др.]. RefSeq: an update on mammalian reference sequences // *Nucleic Acids Research*. 2014. № D1 (42). С. D756–D763.
344. Pyatskowitz J. W., Prohaska J. R. Copper deficient rats and mice both develop anemia but only rats have lower plasma and brain iron levels // *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*. 2008a. № 3 (147). С. 316–323.
345. Pyatskowitz J. W., Prohaska J. R. Iron injection restores brain iron and hemoglobin deficits in perinatal copper-deficient rats // *The Journal of Nutrition*. 2008b. № 10 (138). С. 1880–1886.
346. Putney L. K., Denker S. P., Barber D. L. The changing face of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, NHE1: structure, regulation, and cellular actions // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2002. (42). С. 527–552.
347. Quinzii C. [и др.]. A mutation in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) causes primary coenzyme Q10 deficiency // *American Journal of Human Genetics*. 2006. № 2 (78). С. 345–349.
348. Quistad G. B. [и др.]. Evidence that mouse brain neuropathy target esterase is a lysophospholipase // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003. № 13 (100). С. 7983–7987.
349. Rafehi H. [и др.]. Bioinformatics-Based Identification of Expanded Repeats: A Non-reference Intronic Pentamer Expansion in RFC1 Causes CANVAS // *American Journal of Human Genetics*. 2019. № 1 (105). С. 151–165.
350. Reeves P. G., DeMars L. C. S. Signs of iron deficiency in copper-deficient rats are not affected by iron supplements administered by diet or by injection // *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2006. № 9 (17). С. 635–642.
351. Reuter M. S. [и др.]. Diagnostic Yield and Novel Candidate Genes by Exome Sequencing in 152 Consanguineous Families With Neurodevelopmental Disorders // *JAMA psychiatry*. 2017. № 3 (74). С. 293–299.

352. Reshetnikov V. V. [и др.]. Translational potential of base-editing tools for gene therapy of monogenic diseases // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022. (10). С. 942440.
353. Richmond C. M. [и др.]. Cerebellar ataxia with normal intellect associated with a homozygous truncating variant in CA8 // *Clinical Genetics*. 2020. № 3 (97). С. 516–520.
354. Rinaldi B. [и др.]. Myoclonic status epilepticus and cerebellar hypoplasia associated with a novel variant in the GRIA3 gene // *Neurogenetics*. 2022. № 1 (23). С. 27–35.
355. Rivière T. [и др.]. Structure and Emerging Functions of LRCH Proteins in Leukocyte Biology // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020. (8). С. 584134.
356. Ronce N. [и др.]. A C2055T transition in exon 8 of the ATP7A gene is associated with exon skipping in an occipital horn syndrome family // *American Journal of Human Genetics*. 1997. № 1 (61). С. 233–238.
357. Rootsi S. [и др.]. A counter-clockwise northern route of the Y-chromosome haplogroup N from Southeast Asia towards Europe // *European journal of human genetics: EJHG*. 2007. № 2 (15). С. 204–211.
358. Rousseau F. [и др.]. Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMRI gene--and implications for the population genetics of the fragile X syndrome // *American Journal of Human Genetics*. 1995. № 5 (57). С. 1006–1018.
359. Ruano L. [и др.]. The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies // *Neuroepidemiology*. 2014. № 3 (42). С. 174–183.
360. Ruiz-Martínez J. [и др.]. Whole-exome sequencing associates novel CSMD1 gene mutations with familial Parkinson disease // *Neurology. Genetics*. 2017. № 5 (3). С. e177.
361. Ruiz-Pesini E. [и др.]. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny // *Nucleic Acids Research*. 2007. № Database issue (35). С. D823-828.
362. Saghatelyan A. [и др.]. Assignment of endogenous substrates to enzymes by global metabolite profiling // *Biochemistry*. 2004. № 45 (43). С. 14332–14339.
363. Sakamoto M. [и др.]. Genetic and clinical landscape of childhood cerebellar hypoplasia and atrophy // *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*. 2022. С. S1098-3600(22)00898-X.
364. Salamov A. A., Nishikawa T., Swindells M. B. Assessing protein coding region integrity in cDNA sequencing projects // *Bioinformatics (Oxford, England)*. 1998. № 5 (14). С. 384–390.

365. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977. № 12 (74). С. 5463–5467.

366. Sapio M. R. [и др.]. Transcriptomic analyses of genes and tissues in inherited sensory neuropathies // *Experimental Neurology*. 2016. № Pt A (283). С. 375–395.

367. Sato K. [и др.]. Loss of ABCB7 gene: pathogenesis of mitochondrial iron accumulation in erythroblasts in refractory anemia with ringed sideroblast with isodicentric (X)(q13) // *International Journal of Hematology*. 2011. № 3 (93). С. 311–318.

368. Saunders A. [и др.]. Molecular Diversity and Specializations among the Cells of the Adult Mouse Brain // *Cell*. 2018. № 4 (174). С. 1015-1030.e16.

369. Schlotawa L. [и др.]. Cerebellar ataxia, mental retardation and dysequilibrium syndrome 1 (CAMRQ1) caused by an unusual constellation of VLDLR mutation // *Journal of Neurology*. 2013. № 6 (260). С. 1678–1680.

370. Schmidt W. M. [и др.]. Disruptive SCYL1 Mutations Underlie a Syndrome Characterized by Recurrent Episodes of Liver Failure, Peripheral Neuropathy, Cerebellar Atrophy, and Ataxia // *American Journal of Human Genetics*. 2015. № 6 (97). С. 855–861.

371. Schneider V. A. [и др.]. Evaluation of GRCh38 and de novo haploid genome assemblies demonstrates the enduring quality of the reference assembly // *Genome Research*. 2017. № 5 (27). С. 849–864.

372. Schöls L. [и др.]. Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes? // *Annals of Neurology*. 1997. № 6 (42). С. 924–932.

373. Schreiber R. [и др.]. Expression and function of epithelial anoctamins // *The Journal of Biological Chemistry*. 2010. № 10 (285). С. 7838–7845.

374. Schreiber R., Ousingsawat J., Kunzelmann K. Targeting of Intracellular TMEM16 Proteins to the Plasma Membrane and Activation by Purinergic Signaling // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. № 11 (21). С. E4065.

375. Schuelke M. Ataxia with Vitamin E Deficiency под ред. M. P. Adam [и др.], Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1993.

376. Schulte C. [и др.]. Ataxia with ophthalmoplegia or sensory neuropathy is frequently caused by POLG mutations // *Neurology*. 2009. № 11 (73). С. 898–900.

377. Schwartz T. S. [и др.]. Expanding the phenotypic spectrum associated with OPHN1 variants // *European Journal of Medical Genetics*. 2019. № 2 (62). С. 137–143.

378. Sebastian T. T. [и др.]. Phospholipid flippases: building asymmetric membranes and transport vesicles // *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2012. № 8 (1821). С. 1068–1077.

379. Seelow D. [и др.]. HomozygosityMapper--an interactive approach to homozygosity mapping // *Nucleic Acids Research*. 2009. № Web Server issue (37). С. W593-599.
380. Segawa K., Kurata S., Nagata S. Human Type IV P-type ATPases That Work as Plasma Membrane Phospholipid Flippases and Their Regulation by Caspase and Calcium // *The Journal of Biological Chemistry*. 2016. № 2 (291). С. 762–772.
381. Seong E. [и др.]. Mutations in VPS13D lead to a new recessive ataxia with spasticity and mitochondrial defects // *Annals of Neurology*. 2018. № 6 (83). С. 1075–1088.
382. Sequeiros J., Martins S., Silveira I. Epidemiology and population genetics of degenerative ataxias // *Handbook of Clinical Neurology*. 2012. (103). С. 227–251.
383. Shamseldin H. E. [и др.]. Lethal variants in humans: lessons learned from a large molecular autopsy cohort // *Genome Medicine*. 2021. № 1 (13). С. 161.
384. Shendure J. [и др.]. DNA sequencing at 40: past, present and future // *Nature*. 2017. № 7676 (550). С. 345–353.
385. Shendure J. [и др.]. Publisher Correction: DNA sequencing at 40: past, present and future // *Nature*. 2019. № 7752 (568). С. E11.
386. Shibata-Hamaguchi A. [и др.]. Prevalence of spinocerebellar degenerations in the Hokuriku district in Japan // *Neuroepidemiology*. 2009. № 3 (32). С. 176–183.
387. Shiloh Y. ATM (ataxia telangiectasia mutated): expanding roles in the DNA damage response and cellular homeostasis // *Biochemical Society Transactions*. 2001. № Pt 6 (29). С. 661–666.
388. Shohet A. [и др.]. Variant in SCYL1 gene causes aberrant splicing in a family with cerebellar ataxia, recurrent episodes of liver failure, and growth retardation // *European journal of human genetics: EJHG*. 2019. № 2 (27). С. 263–268.
389. Shulha H. P. [и др.]. Human-specific histone methylation signatures at transcription start sites in prefrontal neurons // *PLoS biology*. 2012. № 11 (10). С. e1001427.
390. Siepel A. [и др.]. Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes // *Genome Research*. 2005. № 8 (15). С. 1034–1050.
391. Sim N.-L. [и др.]. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins // *Nucleic Acids Research*. 2012. № Web Server issue (40). С. W452-457.
392. Sirrs S. [и др.]. Defects in fatty acid amide hydrolase 2 in a male with neurologic and psychiatric symptoms // *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2015. (10). С. 38.

393. Sjöblom B. [и др.]. Two point mutations convert a catalytically inactive carbonic anhydrase-related protein (CARP) to an active enzyme // *FEBS letters*. 1996. № 2–3 (398). С. 322–325.
394. Sjöstedt E. [и др.]. An atlas of the protein-coding genes in the human, pig, and mouse brain // *Science (New York, N.Y.)*. 2020. № 6482 (367). С. eaay5947.
395. Son E. J. [и др.]. Interferon-gamma suppresses Na<sup>+</sup> -H<sup>+</sup> exchanger in cultured human endolymphatic sac epithelial cells // *Journal of Cellular Biochemistry*. 2009. № 5 (107). С. 965–972.
396. Stamm S. [и др.]. An alternative-exon database and its statistical analysis // *DNA and cell biology*. 2000. № 12 (19). С. 739–756.
397. Starokadomskyy P. [и др.]. CCDC22 deficiency in humans blunts activation of proinflammatory NF-κB signaling // *The Journal of Clinical Investigation*. 2013. № 5 (123). С. 2244–2256.
398. Steen V. M. [и др.]. Neuropsychological deficits in mice depleted of the schizophrenia susceptibility gene CSMD1 // *PloS One*. 2013. № 11 (8). С. e79501.
399. Stenson P. D. [и др.]. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update // *Human Mutation*. 2003. № 6 (21). С. 577–581.
400. Stenson P. D. [и др.]. The Human Gene Mutation Database (HGMD®): optimizing its use in a clinical diagnostic or research setting // *Human Genetics*. 2020. № 10 (139). С. 1197–1207.
401. Stevenson J., Huang E. Y., Olzmann J. A. Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation and Lipid Homeostasis // *Annual Review of Nutrition*. 2016. (36). С. 511–542.
402. Stracker T. H. [и др.]. The ATM signaling network in development and disease // *Frontiers in Genetics*. 2013. (4). С. 37.
403. Storey E. [и др.]. Frequency of spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, 6, and 7 in Australian patients with spinocerebellar ataxia // *American Journal of Medical Genetics*. 2000. № 4 (95). С. 351–357.
404. Su X., Abumrad N. A. Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction // *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2009. № 2 (20). С. 72–77.
405. Sułek-Piatkowska A. [и др.]. The occurrence of spinocerebellar ataxias caused by dynamic mutations in Polish patients // *Neurologia I Neurochirurgia Polska*. 2010. № 3 (44). С. 238–245.
406. Sun Y. [и др.]. Autosomal recessive spinocerebellar ataxia 7 (SCAR7) is caused by variants in TPP1, the gene involved in classic late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis 2 disease (CLN2 disease) // *Human Mutation*. 2013. № 5 (34). С. 706–713.

407. Sunderhaus E. R., Law A. D., Kretzschmar D. ER responses play a key role in Swiss-Cheese/Neuropathy Target Esterase-associated neurodegeneration // *Neurobiology of Disease*. 2019. (130). С. 104520.
408. Suspitsin E. N. [и др.]. Next generation sequencing analysis of consecutive Russian patients with clinical suspicion of inborn errors of immunity // *Clinical Genetics*. 2020. № 3 (98). С. 231–239.
409. Synofzik M. [и др.]. SYNE1 ataxia is a common recessive ataxia with major non-cerebellar features: a large multi-centre study // *Brain: A Journal of Neurology*. 2016. № Pt 5 (139). С. 1378–1393.
410. Szklarczyk R. [и др.]. A mutation in the FAM36A gene, the human ortholog of COX20, impairs cytochrome c oxidase assembly and is associated with ataxia and muscle hypotonia // *Human Molecular Genetics*. 2013. № 4 (22). С. 656–667.
411. Taghdiri M. [и др.]. Further delineation of the phenotype caused by a novel large homozygous deletion of GRID2 gene in an adult patient // *Clinical Case Reports*. 2019. № 6 (7). С. 1149–1153.
412. Takeo Y. H. [и др.]. GluD2- and Cbln1-mediated Competitive Interactions Shape the Dendritic Arbors of Cerebellar Purkinje Cells // *Neuron*. 2021. № 4 (109). С. 629-644.e8.
413. Taketani S. [и др.]. Involvement of ABC7 in the biosynthesis of heme in erythroid cells: interaction of ABC7 with ferrochelatase // *Blood*. 2003. № 8 (101). С. 3274–3280.
414. Tamura K. [и др.]. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // *Molecular Biology and Evolution*. 2013. № 12 (30). С. 2725–2729.
415. Tan U. A new syndrome with quadrupedal gait, primitive speech, and severe mental retardation as a live model for human evolution // *The International Journal of Neuroscience*. 2006. № 3 (116). С. 361–369.
416. Tan Ü. A wrist-walker exhibiting no “uner tan syndrome”: a theory for possible mechanisms of human devolution toward the atavistic walking patterns // *International Journal of Neuroscience*. 2007. № 1 (117). С. 147–156.
417. Tassone F. [и др.]. FMR1 CGG allele size and prevalence ascertained through newborn screening in the United States // *Genome Medicine*. 2012. № 12 (4). С. 100.
418. Tejwani L., Lim J. Pathogenic mechanisms underlying spinocerebellar ataxia type 1 // *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 2020. № 20 (77). С. 4015–4029.
419. Telatar M. [и др.]. Ataxia-telangiectasia: identification and detection of founder-effect mutations in the ATM gene in ethnic populations // *American Journal of Human Genetics*. 1998. № 1 (62). С. 86–97.
420. Telianidis J. [и др.]. Role of the P-Type ATPases, ATP7A and ATP7B in brain copper homeostasis // *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2013. (5). С. 44.

421. Tian Y., Schreiber R., Kunzelmann K. Anoctamins are a family of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels // *Journal of Cell Science*. 2012. № Pt 21 (125). С. 4991–4998.
422. Tienhoven M. van [и др.]. Human neuropathy target esterase catalyzes hydrolysis of membrane lipids // *The Journal of Biological Chemistry*. 2002. № 23 (277). С. 20942–20948.
423. Tillotson R., Bird A. The Molecular Basis of MeCP2 Function in the Brain // *Journal of Molecular Biology*. 2019. С. S0022-2836(19)30595–9.
424. Tissir F., Goffinet A. M. Reelin and brain development // *Nature Reviews. Neuroscience*. 2003. № 6 (4). С. 496–505.
425. Tranebjaerg L. [и др.]. Genome-wide homozygosity mapping localizes a gene for autosomal recessive non-progressive infantile ataxia to 20q11-q13 // *Human Genetics*. 2003. № 3 (113). С. 293–295.
426. Traschütz A. [и др.]. Clinico-Genetic, Imaging and Molecular Delineation of COQ8A-Ataxia: A Multicenter Study of 59 Patients // *Annals of Neurology*. 2020. № 2 (88). С. 251–263.
427. Tümer Z., Birk Møller L., Horn N. Screening of 383 unrelated patients affected with Menkes disease and finding of 57 gross deletions in ATP7A // *Human Mutation*. 2003. № 6 (22). С. 457–464.
428. Türkmen S. [и др.]. Cerebellar hypoplasia and quadrupedal locomotion in humans as a recessive trait mapping to chromosome 17p // *Journal of Medical Genetics*. 2006. № 5 (43). С. 461–464.
429. Türkmen S. [и др.]. CA8 mutations cause a novel syndrome characterized by ataxia and mild mental retardation with predisposition to quadrupedal gait // *PLoS genetics*. 2009. № 5 (5). С. e1000487.
430. Uemura T. [и др.]. Trans-synaptic interaction of GluRdelta2 and Neurexin through Cbln1 mediates synapse formation in the cerebellum // *Cell*. 2010. № 6 (141). С. 1068–1079.
431. Uhlemann E.-M. E. [и др.]. At sixes and sevens: cryptic domain in the metal binding chain of the human copper transporter ATP7A // *Biophysical Journal*. 2021. № 20 (120). С. 4600–4607.
432. Uhlén M. [и др.]. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome // *Science (New York, N.Y.)*. 2015. № 6220 (347). С. 1260419.
433. Untergasser A. [и др.]. Primer3--new capabilities and interfaces // *Nucleic Acids Research*. 2012. № 15 (40). С. e115.
434. Utine G. E. [и др.]. A homozygous deletion in GRID2 causes a human phenotype with cerebellar ataxia and atrophy // *Journal of Child Neurology*. 2013. № 7 (28). С. 926–932.

435. Valence S. [и др.]. RELN and VLDLR mutations underlie two distinguishable clinico-radiological phenotypes // *Clinical Genetics*. 2016. № 6 (90). С. 545–549.
436. Van der Auwera G. A. [и др.]. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline // *Current Protocols in Bioinformatics*. 2013. (43). С. 11.10.1-11.10.33.
437. Van Goethem G. [и др.]. Recessive POLG mutations presenting with sensory and ataxic neuropathy in compound heterozygote patients with progressive external ophthalmoplegia // *Neuromuscular disorders: NMD*. 2003. № 2 (13). С. 133–142.
438. Van Schil K. [и др.]. Early-onset autosomal recessive cerebellar ataxia associated with retinal dystrophy: new human hotfoot phenotype caused by homozygous GRID2 deletion // *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*. 2015. № 4 (17). С. 291–299.
439. Vanier M. T. Niemann-Pick disease type C // *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2010. (5). С. 16.
440. Vankan P. Prevalence gradients of Friedreich's ataxia and R1b haplotype in Europe co-localize, suggesting a common Palaeolithic origin in the Franco-Cantabrian ice age refuge // *Journal of Neurochemistry*. 2013. (126 Suppl 1). С. 11–20.
441. Veerapandiyan A. [и др.]. A Rare Syndrome of GRID2 Deletion in 2 Siblings // *Child Neurology Open*. 2017. (4). С. 2329048X17726168.
442. Velayos-Baeza A. [и др.]. Analysis of the human VPS13 gene family // *Genomics*. 2004. № 3 (84). С. 536–549.
443. Velázquez-Pérez L. [и др.]. [Epidemiology of Cuban hereditary ataxia] // *Revista De Neurologia*. 2001. № 7 (32). С. 606–611.
444. Ven A. T. van der [и др.]. Prevalence and clinical prediction of mitochondrial disorders in a large neuropediatric cohort // *Clinical Genetics*. 2021. № 6 (100). С. 766–770.
445. Verbeek D. S. [и др.]. Haplotype study in Dutch SCA3 and SCA6 families: evidence for common founder mutations // *European journal of human genetics: EJHG*. 2004. № 6 (12). С. 441–446.
446. Vermeer S. [и др.]. Targeted next-generation sequencing of a 12.5 Mb homozygous region reveals ANO10 mutations in patients with autosomal-recessive cerebellar ataxia // *American Journal of Human Genetics*. 2010. № 6 (87). С. 813–819.
447. Vicario M. [и др.]. A novel PMCA3 mutation in an ataxic patient with hypomorphic phosphomannomutase 2 (PMM2) heterozygote mutations: Biochemical characterization of the pump defect // *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*. 2017. № 12 (1863). С. 3303–3312.

448. Vicencio J. M. [и др.]. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates autophagy through its interaction with Beclin 1 // *Cell Death and Differentiation*. 2009. № 7 (16). С. 1006–1017.
449. Vissers L. E. L. M. [и др.]. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities // *American Journal of Human Genetics*. 2003. № 6 (73). С. 1261–1270.
450. Vulpe C. D. [и др.]. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse // *Nature Genetics*. 1999. № 2 (21). С. 195–199.
451. Wali G. M., Wali G. Broadening the Clinical Spectrum of Very Low Density Lipoprotein Receptor Associated Dysequilibrium Syndrome // *Movement Disorders Clinical Practice*. 2021. № 4 (8). С. 619–623.
452. Wang Y. [и др.]. Conditional knockout of the Menkes disease copper transporter demonstrates its critical role in embryogenesis // *PloS One*. 2012. № 8 (7). С. e43039.
453. Warde-Farley D. [и др.]. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function // *Nucleic Acids Research*. 2010. № Web Server issue (38). С. W214-220.
454. Wassmer E. [и др.]. Clinical spectrum associated with cerebellar hypoplasia // *Pediatric Neurology*. 2003. № 5 (28). С. 347–351.
455. Watson L. M. [и др.]. Dominant Mutations in GRM1 Cause Spinocerebellar Ataxia Type 44 // *American Journal of Human Genetics*. 2017. № 3 (101). С. 451–458.
456. Waugh A. [и др.]. RNAML: A standard syntax for exchanging RNA information // *RNA*. 2002. № 6 (8). С. 707–717.
457. Webb E. A. [и др.]. ARNT2 mutation causes hypopituitarism, post-natal microcephaly, visual and renal anomalies // *Brain: A Journal of Neurology*. 2013. № Pt 10 (136). С. 3096–3105.
458. Wei B. Q. [и др.]. A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals // *The Journal of Biological Chemistry*. 2006. № 48 (281). С. 36569–36578.
459. Wheeler A. C. [и др.]. Developmental profiles of infants with an FMR1 premutation // *Journal of Neurodevelopmental Disorders*. 2016. (8). С. 40.
460. Wheeler S. [и др.]. Cytosolic glucosylceramide regulates endolysosomal function in Niemann-Pick type C disease // *Neurobiology of Disease*. 2019. (127). С. 242–252.
461. Woo J. J. [и др.]. The complement system in schizophrenia: where are we now and what's next? // *Molecular Psychiatry*. 2020. № 1 (25). С. 114–130.

462. Wu H. [и др.]. Structure of a class C GPCR metabotropic glutamate receptor 1 bound to an allosteric modulator // *Science (New York, N.Y.)*. 2014. № 6179 (344). С. 58–64.
463. Xiao Q., Lauschke V. M. The prevalence, genetic complexity and population-specific founder effects of human autosomal recessive disorders // *NPJ genomic medicine*. 2021. № 1 (6). С. 41.
464. Xu Y. [и др.]. CDP-DAG synthase 1 and 2 regulate lipid droplet growth through distinct mechanisms // *The Journal of Biological Chemistry*. 2019. № 45 (294). С. 16740–16755.
465. Yang Y. [и др.]. Disruption of Tmem30a results in cerebellar ataxia and degeneration of Purkinje cells // *Cell Death & Disease*. 2018. № 9 (9). С. 899.
466. Yang J., Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions // *Nucleic Acids Research*. 2015. № W1 (43). С. W174–181.
467. Yang Z. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood // *Bioinformatics*. 1997. № 5 (13). С. 555–556.
468. Yang Z. PAML 4: Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood // *Molecular Biology and Evolution*. 2007. № 8 (24). С. 1586–1591.
469. Yang Z., Nielsen R. Mutation-selection models of codon substitution and their use to estimate selective strengths on codon usage // *Molecular Biology and Evolution*. 2008. № 3 (25). С. 568–579.
470. Ye J. [и др.]. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // *BMC bioinformatics*. 2012. (13). С. 134.
471. Ye K. [и др.]. Pindel: a pattern growth approach to detect break points of large deletions and medium sized insertions from paired-end short reads // *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2009. № 21 (25). С. 2865–2871.
472. Yildiz Y. [и др.]. Mutation of beta-glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility // *The Journal of Clinical Investigation*. 2006. № 11 (116). С. 2985–2994.
473. Yoon G., Caldecott K. W. Nonsyndromic cerebellar ataxias associated with disorders of DNA single-strand break repair // *Handbook of Clinical Neurology*. 2018. (155). С. 105–115.
474. Yu F. [и др.]. Methyl-CpG-binding protein 2 represses LINE-1 expression and retrotransposition but not Alu transcription // *Nucleic Acids Research*. 2001. № 21 (29). С. 4493–4501.
475. Zanni G., Bertini E. X-linked ataxias // *Handbook of Clinical Neurology*. 2018. (155). С. 175–189.
476. Zanni G. [и др.]. Mutation of plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase isoform 3 in a family with X-linked congenital cerebellar ataxia impairs Ca<sup>2+</sup> homeostasis //

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012. № 36 (109). С. 14514–14519.

477. Zhai Y. [и др.]. Incorporation of exome-based CNV analysis makes trio-WES a more powerful tool for clinical diagnosis in neurodevelopmental disorders: A retrospective study // *Human Mutation*. 2021. № 8 (42). С. 990–1004.

478. Zhang J. [и др.]. Structural insights into the activation initiation of full-length mGlu1 // *Protein & Cell*. 2021. № 8 (12). С. 662–667.

479. Zhang M. [и др.]. Chaperoned ubiquitylation--crystal structures of the CHIP U box E3 ubiquitin ligase and a CHIP-Ubc13-Uev1a complex // *Molecular Cell*. 2005. № 4 (20). С. 525–538.

480. Zhang X. [и др.]. Syne-1 and Syne-2 play crucial roles in myonuclear anchorage and motor neuron innervation // *Development (Cambridge, England)*. 2007. № 5 (134). С. 901–908.

481. Zhang Y. [и др.]. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2014. № 36 (34). С. 11929–11947.

482. Zhang Y. [и др.]. Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse // *Neuron*. 2016. № 1 (89). С. 37–53.

483. Zhao J. [и др.]. Lipid Dyshomeostasis and Inherited Cerebellar Ataxia // *Molecular Neurobiology*. 2022. № 6 (59). С. 3800–3828.

484. Zhao Y. [и др.]. Prevalence and ethnic differences of autosomal-dominant cerebellar ataxia in Singapore // *Clinical Genetics*. 2002. № 6 (62). С. 478–481.

485. Zheng J. [и др.]. Multi-Copper Ferroxidase-Deficient Mice Have Increased Brain Iron Concentrations and Learning and Memory Deficits // *The Journal of Nutrition*. 2018. № 4 (148). С. 643–649.

486. Zhu X. [и др.]. Mutations in a P-type ATPase gene cause axonal degeneration // *PLoS genetics*. 2012. № 8 (8). С. e1002853.

487. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // *Nucleic Acids Research*. 2003. № 13 (31). С. 3406–3415.

488. Zuker M., Jacobson A. B. Using reliability information to annotate RNA secondary structures // *RNA*. 1998. № 6 (4). С. 669–679.

489. Zutz A. [и др.]. Mitochondrial ABC proteins in health and disease // *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2009. № 6 (1787). С. 681–690.

490. ISOGG 2019 Y-DNA Haplogroup Tree [Электронный ресурс]. URL: <https://isogg.org/tree/> (дата обращения: 16.09.2022).

**Список работ, опубликованных по теме диссертации**  
**Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень**  
**рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК**  
**МинОбрНауки РФ для опубликования**

**основных результатов диссертационных работ:**

1. **Protasova M.S.**, Gusev F.E., Andreeva T.V., Klyushnikov S.A., Illarioshkin S.N., Rogaev E.I. Novel genes bearing mutations in rare cases of early-onset ataxia with cerebellar hypoplasia. // Eur J Hum Genet. 2022. № 30. С. 703–711.
2. Grigorenko A.P., **Protasova M.S.**, Lisenkova A.A., Reshetov D.A., Andreeva T.V., Garcias G.L., Martino Roth M.D.G., Papassotiropoulos A., Rogaev E.I. Neurodevelopmental Syndrome with Intellectual Disability, Speech Impairment, and Quadropedia Is Associated with Glutamate Receptor Delta 2 Gene Defect. // Cells. 2022. Т. 11. № 3. С. 400.
3. **Protasova M.**, Grigorenko A., Tyazhelova T., Andreeva T., Reshetov D., Gusev F., Laptenko A., Kuznetsova I., Goltsov A., Klyushnikov S., Illarioshkin S., Rogaev E. Whole Genome Sequencing Identifies a novel ABCB7 gene mutation for X linked congenital cerebellar ataxia in a large family of Mongolian ancestry. // Eur J Hum Genet. 2016. Т. 4. С.550-555.

**Тезисы докладов в материалах конференций:**

1. Grigorenko A.P., **Protasova M.S.**, Andreeva T.V., Reshetov D.A., Lisenkova A.A., Manakhov A.D., Rogaev E.I. Identification of the genetic cause for quadrupedal locomotion in human subjects by high-throughput sequencing. // 2nd International scientific conference “Science of the Future”. 2016, С. 279-280, *Устный доклад*
2. **Protasova M.S.**, Grigorenko A.P., Tyazhelova T.V., Andreeva T.V., Reshetov D.A., Gusev F.E., Kuznetsova I.L., Goltsov A.Y., Klyushnikov S.A., Illarioshkin S.N., Rogaev E.I. The identification of the genetic cause of

the cerebellar disorder. // *Frontiers in Biomedicine*. 2015. №1. С.19. *Устный доклад*

3. **Протасова М.С.**, Григоренко А.П., Тяжелова Т.В., Гусев Ф.Е., Андреева Т.В., Решетов Д.А., Кузнецова И.Л., Ключников С.А., Иллариошкин С.Н., Рогаев Е.И. Идентификация генетической причины X-сцепленной прогрессирующей наследственной мозжечковой атаксии с использованием полногеномного секвенирования. // VII съезд Российского общества медицинских генетиков. Журнал "Медицинская Генетика" 2015. №3. С. 84. *Стендовый доклад*.
4. **Protasova M.S.**, Grigorenko A.P., Tyajelova T.V., Gusev F.E., Andreeva T.V., Reshetov D.A., Kuznetsova I.L., Klyushnikov S.N., Illarioshkin S.N., Rogaev E.I. Complete Genome Re-Sequencing Identifies the Genetic Cause For X-linked Congenital Cerebral Ataxia. // *Science of the Future*, 2014. *Стендовый доклад*

**Доклады на конференциях и симпозиумах (без публикации тезисов):**

1. **Протасова М.С.**, Григоренко А.П., Тяжелова Т.В., Гусев Ф.Е., Андреева Т.В., Кузнецова И.Л., Ключников С.А., Иллариошкин С.Н., Рогаев Е.И. Полногеномный анализ редких врождённых патологий мозжечка. Конференция “Гены, Мозг, Поведение” Москва, 9 декабря 2019.
2. **Protasova MS**, Grigorenko AP, Tyajelova TV, Gusev FE, Andreeva TV, Reshetov DA, Kuznetsova IL, Klyushnikov SN, Illarioshkin SN, Rogaev EI, Complete Genome Re-Sequencing Identifies the Genetic Cause For X-linked Congenital Cerebellar Ataxia. “Aging and Memory – 2015”, November 14, 2015 Moscow, Russia

## ПРИЛОЖЕНИЯ

**Таблица 1 Приложения.** Основные клинические симптомы, выявленные у пациентов с X-сцепленной рецессивной мозжечковой атаксией из семьи АХ [Шляриошкин et al., 1996].

Пациент	АХ-III-6	АХ-III-17	АХ-III-18	АХ-III-30	АХ-IV-26	АХ-IV-40
Возраст на момент исследования	54 года	40 лет	38 лет	39 лет	11 лет	16 лет
Сидение без опоры (возраст)	>10 мес.	н.д.	н.д.	15 мес.	14 мес.	6 мес.
Ходжение без опоры (возраст)	4 года	7 лет	7 лет	4 года	4 года	11 мес.
Первое сказанное слово (возраст)	н.д.	3 года	4 года	4 года	4 года	15 мес.
Атаксия	+	+	+	+	+	+
Дизартрия	+	+	+	+	+	+
Нистагм	-	+	+	-	+	+
Офтальмоплегия	+	+	+	+	+	-
Дисфония	-	-	+	+	-	-
Снижение когнитивных способностей	-	-	-	-	-	-
Мышечный тонус	-	-	-	снижен	-	снижен
Другие симптомы	-	-	-	миоклония; депрессия	-	-

**Таблица 2 Приложения.** Основные клинические симптомы, выявленные у пациентов с мозжечковой атаксией из семей АI-III [Protasova et al., 2022].

Географический регион	Москва		Северный Кавказ		
	АI		АII	АIII	
Пациент	АI-1	АI-2	АII-1*	АIII-1	АIII-2
Возраст на момент исследования	33	23	14	22	20
Возраст начала заболевания	6 мес.	4–6 мес.	12 лет	17 лет	8 лет
Этапы развития в детстве	Начал ходить в 1 год 7 мес.	Начал ходить в 1 год 2 мес., говорить в 2 года	нормальное развитие	нормальное развитие	нормальное развитие
Движения глазных яблок	В полном объеме	Нарушены плавные следящие движения в стороны	В полном объеме	В полном объеме	В полном объеме
Нистагм	-	-	Горизонтальный	Ротаторный	Ротаторный
Дизартрия	+	+	-	+	+
Нарушение координации в конечностях	+	+	+	+	+
Дисдиадохокинез	+	+	+	+	+
Проба Ромберга	+	+	+	+	+
Походка	Шаткая, без опоры	Шаткая, без опоры	Шаткая, без опоры	Шаткая, без опоры	Шаткая, без опоры
Тремор	Интенционный	Интенционный и осцилляторный	Интенционный	-	-
Мышечная гипотония	+	+	-	-	-
Сенсорные нарушения	-	-	-	-	-
Когнитивные нарушения	-	-	-	-	-
МРТ мозга	Мозжечковая гипоплазия	Мозжечковая гипоплазия	Мозжечковая гипоплазия	Мозжечковая гипоплазия	Мозжечковая гипоплазия
Исследование нервной проводимости	Демиелинизирующая полиневропатия	Демиелинизирующая полиневропатия	Отклонений не выявлено	Отклонений не выявлено	Отклонений не выявлено

\*Пациент АII-2, младший брат пациента АII-1, имеет аналогичное заболевание.

**Таблица 3 Приложения.** Основные клинические симптомы, выявленные у пациентов с синдромом CAMRQ [Garcias, Roth, 2007].

Пациент	Q-IV-1	Q-IV-2	Q-IV-3	Q-IV-4
Возраст на момент обследования	35	34	33	32
Пол	Жен.	Муж.	Жен.	Муж.
Задержка развития	+	+	+	+
Походка	Квадропедия	Квадропедия	Квадропедия	Квадропедия
Речь	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Нистагм	+	+	+	+
Страбизм	+	+	+	+
Умственная отсталость	+	+	+	+
Судороги	-	-	+	-
Рост	1,47 м	1,50 м	1,42 м	1,59 м
Грубые черты лица	+	+	+	+
Короткие конечности	+	+	+	+
Гирсутизм	+	+	+	+

**Таблица 4 Приложения.** Олигонуклеотидные последовательности для валидации кандидатного варианта и анализа мутаций во всех экзонах гена *ABCB7*, а также анализа ранее опубликованного варианта в гене *ATP2B3* с помощью ПЦР и секвенирования по Сэнгеру.

Экзон, Ген	Название	Последовательность	Размер продукта (п.н.)	T <sub>m</sub> , °C
1, <i>ABCB7</i>	ABCB7-Ex1-F	TATTCCTCGGTTGTGTAAGGA	513	55
	ABCB7-Ex1-R	CACTTACTGCTGCTCCCAGT		
2, <i>ABCB7</i>	ABCB7-Ex2-F	AAGTGTCCACTCTGAAACTTCC	190	54
	ABCB7-Ex2-R	GGGAAATACTCCAAGGGTTT		
3, <i>ABCB7</i>	ABCB7-Ex3-F	TCAAGCCAAATTGTGAAACA	206	55
	ABCB7-Ex3-R	TGCAAGGACAATCATCAAGA		
4, <i>ABCB7</i>	ABCB7-Ex4-F	TGAAAGATATTAGCCTTAGATTCAGA	340	54
	ABCB7-Ex4-R	CAGGCCCAGGATTCATAAC		
5, <i>ABCB7</i>	ABCB7-Ex5-F	TTTTGTGTATAATGGGTAATTGATG	287	54
	ABCB7-Ex5-R	CAAACATCCAAAACGCTAAG		
6, <i>ABCB7</i>	ABCB7-Ex6-F	TTTCTGAGCCCTTGTCAATTC	441	55
	ABCB7-Ex6-R	ATGGGCATGCAACAGTACAA		
7-8, <i>ABCB7</i>	ABCB7-Ex7-8-F	ACCGAGATTTGCTGTTGTGT	392	60
	ABCB7-Ex7-8-R	CAGTGTGAAAGGCAGAGGA		
9, <i>ABCB7</i>	ABCB7-Ex9-F	CATACATGAAGTCTGATGAAAAGT	346	55
	ABCB7-Ex9-R	TAAGCATGCACATTCCTTTC		
10, <i>ABCB7</i>	ABCB7-Ex10-F	TTAAGAATATTTTGTCCGTCGT	361	57
	ABCB7-Ex10-R	TTGGTTTGCTAATGTGGTGA		
11-12, <i>ABCB7</i>	ABCB7-Ex11-12-F	CTAGGCAGTGCCTAAAGTGG	540	54
	ABCB7-Ex11-12-R	CAACCCAATAAATCCTCCAA		
13, <i>ABCB7</i>	ABCB7-Ex13-F	CCCTTTATGCCTTTGTCTCTT	396	57
	ABCB7-Ex13-R	TGTGACTCAACGAGCACTACA		
14, <i>ABCB7</i>	ABCB7-Ex14-F	ATGCATGCACTATGCTTCCT	222	54
	ABCB7-Ex14-R	TGCAGCCATTTACTGAAAC		
15, <i>ABCB7</i>	ABCB7-Ex15-F	CATTTGCCTAATGTGTAATCTT	278	56
	ABCB7-Ex15-R	CAGGATTCAGTCTCAACCAA		
16, <i>ABCB7</i>	ABCB7-Ex16-F	TGTGTATGAGGAATTGGGAGA	540	60
	ABCB7-Ex16-R	GGGATAAATACAGATGCCACA		
20, <i>ATP2B3</i>	ATP2B3-Ex20-F	GGGAGCTACACACCGAAGTC	375	60
	ATP2B3-Ex20-R	GTGGACGAGGGGTCTTGAA		

**Таблица 5 Приложения.** Олигонуклеотидные последовательности для валидации и анализа делеции в гене *ATP7A*, найденной в семье АХ, с помощью ПЦР и секвенирования по Сэнгеру.

Область, Ген	Название	Последовательность	Размер продукта (п.н.)	Tm, °C
2 экзон, <i>ATP7A</i>	ATP7A-Ex2-F	AAGCAGGAAGAATGCTTACCATA	398	58
	ATP7A-Ex2-R	TCAGTGTGTCTGCTTCTATCTCA		
3 экзон, <i>ATP7A</i>	ATP7A-Ex3-F	ACTCTTCTTGAATGTGGTGTGA	693	58
	ATP7A-Ex3-R	GCAAGCACTCTAGTCTCATGGAT		
Область внутри делеции, <i>ATP7A</i>	ATP7A-del_IN_F	GCCTGGGATGGAAGGTTAAAT	392	58
	ATP7A-del_IN_R	TCTGTGCTGTGCATTGTGAA		
Правая граница делеции, <i>ATP7A</i>	ATP7A-del_at_R_F	TGCCAAAAGCTTGAGGATTC	746	58
	ATP7A-del_at_R_R	CCAGTGGACAAAGCTTTCATT		
Левая граница делеции, <i>ATP7A</i>	ATP7A-del_at_L_F	TTGAGTCTGTTTTTAACCATTTATGC	1460	60
	ATP7A-del_at_L_R	TGACCACCCCAACTAATGCT		
Делеция целиком, <i>ATP7A</i>	ATP7A-del_at_L_F	TTGAGTCTGTTTTTAACCATTTATGC	1327	58
	ATP7A-del_at_R_R	CCAGTGGACAAAGCTTTCATT		
<i>PGAM4</i>	PG4_for_out	GGGAAAAAGAATTTTCAGCGTA	1921	60
	PG4_rev_out	GGGTGGTCTAATTGTTCAAAGC		
<i>PGAM4</i>	PG4_for_in	CCTGCTGGTCTTGTCCCTCT	для сиквенсной реакции	
	PG4_rev_in	CCCATCTGCAGCTACAACCTC		

**Таблица 6 Приложения.** Олигонуклеотидные последовательности для валидации кандидатных вариантов, найденных в семьях AI-IV, с помощью ПЦР и секвенирования по Сэнгеру.

Название	Последовательность	Размер продукта (п.н.)	T <sub>m</sub> , °C
<i>FAAH2_for</i>	GGACTGGCTTTGTTGGAAGA	264	58
<i>FAAH2_rev</i>	TGCTTTCCTTGGAACATACATC		
<i>LRCH2_for</i>	TGGCTCTTGATTTAGGTGCTT	325	57
<i>LRCH2_rev</i>	TGCCAGATGGTAAGATGTTCA		
<i>ZNF674_for</i>	AGTTCTGTGATGCACAATGAGA	545	58
<i>ZNF674_rev</i>	CCTCTGATGAGAAGCCCAGT		
<i>ATRX_for</i>	ATTCTGCTTCCAATAGATGCTT	374	55
<i>ATRX_rev</i>	TTTGATAATTTCTATATGATGGGTTTC		
<i>CCDC22_for</i>	GTCAGGAGTGGAGGCTGGT	300	58
<i>CCDC22_rev</i>	AGAATCTCCAGGGTGAAGTGG		
<i>HEPH_for</i>	CAGGCCTCCTGTCCTATTTG	199	58
<i>HEPH_rev</i>	GAGGCCAGCATCTCAACATT		
<i>FECH_for</i>	TCTTGCACTGGGCTTAGGAC	183	58
<i>FECH_rev</i>	CTGGACCATTTTCCACTTGA		
<i>CSMD1_for</i>	TGGAGAACAGAATGCCATCA	199	58
<i>CSMD1_rev</i>	GGATTGTGTGCTTTGGGTTT		
<i>GRM1_for</i>	GCGTTCACCATGTACACCAC	214	59
<i>GRM1_rev</i>	ATGCGGACAACATCAGAGG		

**Таблица 7 Приложения.** Олигонуклеотидные последовательности для валидации делеции в гене *GRID2* и других редких вариантов, найденных в семье Q, с помощью ПЦР и секвенирования по Сэнгеру.

Название	Последовательность	Размер продукта (п.н.)	Tm, °C
<i>VLDLR_For</i>	AGTGCCCATGACTCAGCTT	224	59
<i>VLDLR_Rev</i>	TGAACCATCTTCGCAGTCAG		
<i>COQ2_For</i>	GACGAGCTCGGATTGACG	194	57
<i>COQ2_Rev</i>	GCCTTTTGCCAATAGAAATCC		
<i>CDS1_For</i>	GAATGTATTGGCCAGCCTGT	158	58
<i>CDS1_Rev</i>	AGGGGTTCTATCTGAGGATGG		
<i>GRID2_flanked_region_For</i>	GACCTACGCTATTTCTAGCTTT	Делеция: 432; Дикий тип: 345	59
<i>GRID2_deletion_region_Rev</i>	GCAATTATGCCAGATCATTCTC		
<i>GRID2_flanked_region_Rev</i>	TGTAGTCCCAGCTACTCAGGA		
<i>PUM3_For</i>	TGTTTAGGTTTGTCTTCTCCAGA	491	57
<i>PUM3_Rev</i>	ATGCCAACAAATCAGAAGGTG		
<i>ARNT2_For</i>	CCTCTGAGGTATGGGAAAAGTC	300	58
<i>ARNT2_Rev</i>	TGTAGGTCTGCTCTTTCCATTG		
<i>ODF3L2_For</i>	CTGGTGGGAGTGTCTCGG	362	59
<i>ODF3L2_Rev</i>	CTCCTCCGTGTCCTTGG		

**Таблица 8 Приложения.** Олигонуклеотидные последовательности для анализа экспрессии кандидатных генов в семье АХ.

Название	Последовательность	Размер продукта (п.н.)	Tm, °C
<i>ABCB7_transc_for</i>	AGAGCCATTTTGAAGGACCC	300	58
<i>ABCB7_transc_rev</i>	CCATTTGGGGTTATCATGGTTCT		
<i>ATP7A_transc_full_1ex_for</i>	TCTGCGTAGCTCCAGAGGTT	586	59
<i>ATP7A_transc_full_3ex_rev</i>	CTTCAGCACGACTTCACCAG		
<i>ATP7A_transc_short_18ex_rev</i>	CAGCAGTCCGACCTTTTCTC	576	59
<i>ATP7A_transc_nc_rev</i>	GGCAAGCTCTTCCAATTGAG	228	59
<i>HPRT_transc_for</i>	GACCAGTCAACAGGGGACAT	164	59
<i>HPRT_transc_rev</i>	CTTGCGACCTTGACCATCTT		

**Таблица 9 Приложения.** Варианты, выявленные в митохондриальном геноме бурятского индивида АХ-III-17, по сравнению с пересмотренной Кембриджской эталонной последовательностью (NC\_012920.1). На основе установленных вариантов митохондриальный геном был отнесен к гаплогруппе С4b. Последовательность сборки полного митохондриального генома доступна в NCBI GenBank под номером доступа KR153486.

Позиция	Референсный аллель	Выявленный аллель
MT:73	A	G
MT:152	T	C
MT:247	GA	G
MT:263	A	G
MT:310	T	TC
MT:489	T	C
MT:750	A	G
MT:1438	A	G
MT:2226	T	TA
MT:2706	A	G
MT:3106	CNT	CT
MT:3552	T	A
MT:3816	A	G
MT:4715	A	G
MT:4769	A	G
MT:6026	G	A
MT:7028	C	T
MT:7196	C	A
MT:8584	G	A
MT:8701	A	G
MT:8860	A	G

Позиция	Референсный аллель	Выявленный аллель
MT:9540	T	C
MT:9545	A	G
MT:10398	A	G
MT:10400	C	T
MT:10873	T	C
MT:11719	G	A
MT:11914	G	A
MT:11969	G	A
MT:12705	C	T
MT:13263	A	G
MT:14318	T	C
MT:14766	C	T
MT:14783	T	C
MT:15043	G	A
MT:15204	T	C
MT:15301	G	A
MT:15326	A	G
MT:15487	A	T
MT:16223	C	T
MT:16298	T	C
MT:16327	C	T
MT:16519	T	C

**Таблица 10 Приложения.** Варианты на Y-хромосоме, выявленные у бурятского индивида АХ-III-17, представлены в соответствии с координатами референсного генома человека GRCh37. Цветом и полужирным шрифтом выделены замены характерные для конкретной гаплогруппы. На основе данных вариантов для Y-хромосомы определена гаплогруппа N1C1a1a\*.

Гаплогруппа	Маркер	Позиция	Нуклеотидная замена	Выявленный аллель
<b>A0-T</b>	<b>L1085</b>	<b>Y:2790726</b>	<b>T-&gt;C</b>	<b>C</b>
A0	L991	Y:14497059	C->A	C
A1	P305	Y:2710154	G->A	G
A1a	M31	Y:21739754	G->C	G
<b>A1b</b>	<b>P108</b>	<b>Y:15426248</b>	<b>C-&gt;T</b>	<b>T</b>
<b>BT</b>	<b>M91</b>	<b>Y:21907538</b>	<b>del-&gt;T</b>	<b>T</b>
<b>CT</b>	<b>M168</b>	<b>Y:14813991</b>	<b>C-&gt;T</b>	<b>T</b>
<b>CF</b>	<b>P143</b>	<b>Y:14197867</b>	<b>G-&gt;A</b>	<b>A</b>
<b>F</b>	<b>M89</b>	<b>Y:21917313</b>	<b>C-&gt;T</b>	<b>T</b>
<b>GHIJK</b>	<b>F1329</b>	<b>Y:8589031</b>	<b>C-&gt;T</b>	<b>T</b>
<b>IJK</b>	<b>L15</b>	<b>Y:6753519</b>	<b>A-&gt;G</b>	<b>G</b>
<b>K</b>	<b>M9</b>	<b>Y:21730257</b>	<b>C-&gt;G</b>	<b>G</b>
LT	L298	Y:8467290	T->C	T
L	M20	Y:21733454	A->G	A
T	M184	Y:14898163	G->A	G
<b>NO</b>	<b>M214</b>	<b>Y:15471925</b>	<b>T-&gt;C</b>	<b>C</b>
<b>N</b>	<b>M231</b>	<b>Y:15469724</b>	<b>G-&gt;A</b>	<b>A</b>
<b>N</b>	<b>M232</b>	<b>Y:15437152</b>	<b>C-&gt;T</b>	<b>T</b>
<b>N1</b>	<b>LLY22g.1_1</b>	<b>Y:23714649</b>	<b>C-&gt;A</b>	<b>A</b>
<b>N1</b>	<b>LLY22g.1_2</b>	<b>Y:24022786</b>	<b>C-&gt;A</b>	<b>A</b>
<b>N1C</b>	<b>L729.1</b>	<b>Y:19431608</b>	<b>A-&gt;C</b>	<b>C</b>
<b>N1C1</b>	<b>M46</b>	<b>Y:14922583</b>	<b>T-&gt;C</b>	<b>C</b>
<b>N1C1</b>	<b>L395</b>	<b>Y:19048725</b>	<b>G-&gt;A</b>	<b>A</b>
<b>N1C1a</b>	<b>M178</b>	<b>Y:21741755</b>	<b>C-&gt;T</b>	<b>T</b>
<b>N1C1a1</b>	<b>L708</b>	<b>Y:7629512</b>	<b>C-&gt;A</b>	<b>A</b>
<b>N1C1a1a</b>	<b>L392</b>	<b>Y:6753265</b>	<b>A-&gt;C</b>	<b>C</b>
N1C1a1a1	CTS2929	Y:14570424	T->C	T
N1C1a1a2	Z1936	Y:21463326	C->T	C

**Таблица 11 Приложения.** Расчет консенсусных значений канонических и криптоических сайтов сплайсинга для дикого и мутантного вариантов С>Т в геномной позиции X:74273420 в 16-ом экзоне гена *ABCB7*.

База данных\ Вес сайта	Канонический сайт сплайсинга акцептора		Криптоического сайт сплайсинга акцептора	
	Д.Т.	мут.	Д.Т.	мут.
Конститутивный	6,29	5,28	-	-3,77

**Таблица 12 Приложения.** Анализ изменения сайта сплайсинга для различных транскриптов гена *ABCB7* при нуклеотидной замене С>Т в геномной позиции X:74273420, с помощью программы SpliceAI [Jaganathan K et al., 2019].

Название транскрипта	Δ тип (Δ счёт*/позиция в пре-мРНК)			
	Потеря Акцептора	Потеря Донора	Образование Акцептора	Образование Донора
ENST00000645829.3_1	0,1 / 0 п.н.	0	0,01 / -6 п.н.	0
ENST00000253577.9_1 / NM_004299.6	0,25 / 0 п.н.	0	0	0
ENST00000339447.8_1 / NM_001271697.3	0,09 / 0 п.н.	0	0,01 / -6 п.н.	0
ENST00000373394.8_1 / NM_001271696.3	0,25 / 0 п.н.	0	0	0
ENST00000529949.5_1 / NM_001271698.3	0,3 / 0 п.н.	0	0	0
ENST00000620875.5_1 / NM_001271699.3	0,16 / 0 п.н.	0	0	0
ENST00000644766.1_1	0,09 / 0 п.н.	0	0,01 / -6 п.н.	0
ENST00000669573.1_1	0,12 / 0 п.н.	0	0,01 / -6 п.н.	0
ENST00000490858.1_1	0,3 / 0 п.н.	0	0	0
ENST00000663420.1_1	0,31 / 0 п.н.	0	0	0
ENST00000666534.1_1	0,21 / 0 п.н.	0	0,01 / -6 п.н.	0

\*Δ счёт - дельта счёт принимает значение от 0 до 1 и отображает вероятность, что данная замена приводит к изменению сайта сплайсинга на расстоянии +/- 50 п.н. Значения дельта счёта менее 0,5 подразумевают отсутствие статистически значимых изменений сайта сплайсинга.

**Таблица 13 Приложения.** Сравнение клинической картины пациентов с различными мутациями в гене *ABCB7*. ТМ – трансмембранный домен.

Опубликованный случай	Случай в семье АХ	Allikmets 1999; Pagon 1985	Bekri 2000	Maguire 2001; Hellier 2001	D'Hooghe 2012
dbSNP	rs797044558	rs72554632	rs80356714	rs80356713	-
Нукл. замена	X:74273420 C>T	X:74291351 T>G	X:74290268 G>A	X:74290334 G>C	X:74295428 A>T
Аминокисл. замена	G682S	V400M	E433K	V411L	E208D
Домен в белке	АТМ1	5 ТМ	рядом с 6 ТМ	6 ТМ	рядом со 2 ТМ
Число пациентов/облиг. носителей	5/4	4/9	2/-	4/1	1/1
Микроцитарные гипоморфные клетки	-	+	+	+/-	+
Тельца Паппенгейма	-	+	н.д.	+/-	+
Объем клеток	=	н.д.	↓	=/↓	=
Клеточный гемоглобин	=	↓	↓	=/↓	↓
Протопорфирин	н.д.	X10↑	X10↑	X2-3↑	X10↑
Сидение без опоры	>6-15 мес.	н.д.	4 года	н.д.	7 мес.
Хождение без опоры	11 мес. - 7 лет	<= 8 лет	>6 лет	3-11 лет	>4,5 лет
Первое сказан. слово	15 мес. - 4 лет	н.д.	5 лет	н.д.	н.д.
Атаксия	+	+/-	н.д.	+	+
Дисметрия	+	+/-	н.д.	+	+
Дисдиадохокинез	+	+/-	+	-/+	н.д.
Дизартрия	+	+/-	+	+	+
Страбизм	+/-	+/-	н.д.	+	+
Нистагм	+/-	-	+	+	-
Сухожильные рефлексы	↑/↓	↑	-/↓	↑	=
Рефлекс Бабинского	отсутствует	экстензор, флексор	флексор	флексор	отсутствует
Когнитивные нарушения	-	-	+	-/+	-
Мышечная слабость	-	-	н.д.	-	-
Потеря чувствительности	-	-	-	-	-
Гипоплазия мозжечка	+	+	+	+	-
Другие симптомы у одного или нескольких пациентов	дисфагия, дисфония, миоклонические судороги, депрессия	дрожь, аномальный тест Ромберга,	пониженный вес при рождении, умственная отсталость	диплопия, гипометрические саккады, шизофрения	-

**Таблица 14 Приложения.** Области гомозиготности у пациентов из семьи Q, полученные с помощью программы HomozygosityMapper.

Счёт	Хромосома	Начало (п.н.)	Конец (п.н.)	Первый ОНП	Последний ОНП	Длина области, (п.н.)
3000	4	78 505 578	94 129 968	rs355687	rs994011	15 624 390
3000	7	103 397 404	113 529 740	rs694894	rs8180864	10 132 336
3000	14	56 348 506	66 419 099	rs28496257	rs12880549	10 070 593
3000	3	10 627 561	13 516 646	rs12490065	rs2597506	2 889 085
2452	14	66 448 348	69 163 110	rs1147455	rs8013046	2 714 762
3000	11	132 719 646	134 944 770	rs4575282	rs11224232	2 225 124
2687	4	94 142 499	96 324 373	rs1875705	rs12510417	2 181 874

**Таблица 15 Приложения.** Сравнение клинических характеристик пациентов с различными мутациями в гене *GRID2*.

Статья	Мутация в <i>GRID2</i>	Локомоция	Речь	Когнитивные функции	Глазодвигат. признаки и зрение	Неврологич. симптомы и мышечный тонус	Другие симптомы
Maier et al., 2014	Делеция экзона 1 (de novo)	Бипедальная, ограничена 10 м	Дизартрия, дисфагия	Внимание и антероградные нарушения памяти; скорость обработки информации значительно снижена	-	Спастическая парапарезия, повышенный сухожильный рефлекс, ладонно-подбородочного рефлекс, дисметрия	-
Van Schil et al., 2015	Делеция экзона 2 (гомозигота)	-	Дизартрия	-	Глазодвигательная апраксия, трудности фиксации взгляда, нистагм, резкое снижение реакции палочек и колбочек	Аномальные движения головы назад; гипотония; нормальные глубокие рефлексы, небольшое сгибание голеностопного сустава и инверсионные контрактуры	Воронкообразная деформация грудной клетки; гипермобильности суставов
Veerapan-diyam et al., 2017	Делеция экзона 2 (гомозигота)	Бипедальная, способность ходить без опоры с 7 лет	Задержка речи и ограниченный словарь	Задержка развития, степень когнитивных нарушений не уточняется	Прерывистый тонический взгляд вверх, вертикальный и горизонтальный нистагм, Глазодвигательная апраксия	Задержка моторного развития, гипотония, гиперрефлексия, атаксия конечностей и туловища	Груднопоясничный кифоз и сколиоз

## Продолжение Таблицы 15 Приложения

Статья	Мутация в GRID2	Локомоция	Речь	Когнитивные функции	Глазодвигат. признаки и зрение	Неврологич. симптомы и мышечный тонус	Другие симптомы
Utine et al., 2013	Делеция экзона 3 и 4 (гомозигота)	Бипедальная с опорой (в 8 и 11 лет)	Дизартрия	Задержка глобального развития	Нистагм, глазодвигательная апраксия, нарушение фиксации взгляда, неспособность называть цвета	Аномальные движения головы назад, туловищная атаксия, дисметрия, дисдиадохикинез, повышенный сухожильный рефлекс и двусторонний рефлекс Бабинского	Воронкообразная деформация грудной клетки, суставная слабость, выступающая пяточная кость, двустороннее увеличение подкожной жировой клетчатки в области стоп, лопухость
Hill et al., 2013	Делеция экзона 4 (гетерозигота) и экзона 2 (гомозигота)	Бипедальная с опорой, зависимый от инвалидного кресла	Одиночные слова и короткие предложения	Задержка речевого и когнитивного развитие	Нистагм, пристальный взгляд, тонический взгляд вверх	Туловищная и аппендикулярная атаксия, гипотония	Гипермобильность суставов
Coutelier et al., 2015	Миссенс мутация (с.1966C>G/р.Leu656Val) (гетерозигота/гомозигота)	Бипедальная с признаками нестабильности (43% гетерозигот); неспособность самостоятельно ходить в 7 и 5 лет (гомозиготы)	Ограниченная, дизартрия (71% гетерозигот и гомозигот)	Когнитивные нарушения (43% гетерозигот и гомозиготы); трудности с вниманием; дефицит зрительной памяти; низкий IQ	Аномальное сакадическое преследование (71% гетерозигот и гомозиготы); нистагм (29% гетерозигот)	Медленно прогрессирующая мозжечковая атаксия; гипотония с оживленным вращательным рефлексом и пирамидными знаками (гомозиготы)	Бессимптомное течение (29% гетерозигот), снижение слуха (43% гетерозигот)
	2 миссенс мутации (с.1960G>A/р.Ala654Thr, с.1961C>A/р.Ala654Asp)	Бипедальная, Способность ходить с опорой с 3 и 7 лет	Способность говорить полными предложениями; дизартрия	Нет нарушений	Аномальное сакадическое преследование, косоглазие, нистагм	Задержка моторного развития, повышенный тонус периферических мышц, атаксическая походка, дисметрия, дисдиадохикинез	-
Ali et al., 2017	Миссенс мутация (с.2128C > T, р.Arg710Trp, гомозигота)	Бипедальная, Способность ходить без опоры с 7-8 лет	Дизартрия ограниченный словарь (≈100 слов), часто без логики	Умеренная умственная отсталость	Нормальное зрение	Задержка моторного развития, повышенный тонус периферических мышц, атаксическая походка, дисметрия, дисдиадохикинез	-
Ceylan et al., 2020	Дупликация экзона 14 и возможное формирование преждевременного стоп кодона (р.Ile788*), (гомозигота)	Способность ходить с опорой с 5 лет	н.д.	Легкая умственная отсталость	Слабость глазных мышц, нистагм и глазодвигательная апраксия	Туловищная атаксия, титубация головы, дисметрия, дисдиадохикинез, походка на широкой опоре, повышенный периферический мышечный тонус и дистальная гиперрастяжимость	Грудной кифосколиоз

## Продолжение Таблицы 15 Приложения

Статья	Мутация в GRID2	Локомоция	Речь	Когнитивные функции	Глазодвигат. признаки и зрение	Неврологические симптомы и мышечный тонус	Другие симптомы
Iodice et al., 2020	Делеция экзонов 12-13, нонсенс мутация (с.2564G > A p.Ile788*) (компаундные варианты)	Способность ходить с опорой с 18 мес.	Небольшая задержка речи, дизартрия	н.д.	Нистагм, с возрастом: окулярный флаттер, глазодвигательная апраксия и двусторонняя экзофория	Атаксия, тремор действия, туловищные колебания, гипотония, легкая дистальная гипотрофия нижних конечностей без пирамидных признаков	-
Taghdiri et al., 2019	Делеция экзонов 3-16 (гомозигота)	Способность ходить с опорой с 6 лет	Задержка речи, гнусавость, заикание	Задержка развития с лёгкой степенью умственной отсталости	Горизонтальный нистагм	Туловищная и аппендикулярная атаксия, снижение силы конечностей, слегка спастический тонус мышц, повышение глубоких сухожильных рефлексов нижних конечностей, пирамидальные признаки, нарушение пальце-носового теста	Двусторонние плоскостопие и вальгусная деформация большого пальца стопы
Hetzelt et al., 2020	Нонсенс мутация (с.568C > T, p.Gln190* гомозигота)	н.д.	Отсутствует, только слоги	Выраженная задержка психомоторного развития, очень мало взаимодействия	Нистагм, тонический взгляд вверх, глазодвигательная апраксия, неполная потеря зрения	Тяжелая, прогрессирующая туловищная и аппендикулярная атаксия, генерализованная мышечная гипотония, нет управления головой, не способен повернуться или сесть	Дистрофия; лицевых дисморфизмов не отмечено
Семья Q	Делеция экзонов 5-7 (гомозигота)	Квадропедия	Отсутствует	Тяжелая умственная отсталость	Страбизм	Туловищная атаксия, судороги	Гирсутизм, грубые черты лица, короткие и маленькие конечности, низкий рост

**Таблица 16 Приложения.** Эволюционный анализ белок кодирующих последовательностей гена *GRID2* приматов с использованием одно-, свободно- и двухпараметрических ветвь-специфичных моделей.

Модель		NP	InL	$\omega^{M0}$			$2\Delta\ln L$	р-знач.	
M0		50	-7471,5742	0,02747					
M1		94	-7445,4004				52,35	0,182	
Модель	Число ветвей	NP	InL	$\omega^{M1}$	$\omega^{M2}$ (backgr)	$\omega^{M2}$ (foregr)	$2\Delta\ln L$	р-знач.	р-знач, корр,
M2	45	51	Min: -7471,57; Max: -7466,60	Min: 0,0001; Max: 0,5641	Min: 0,02573; Max: 0,0315	Min: 0,0001; Max: 115,97	Min: -52,35; Max: -42,40	>0,15	>0,23

**Таблица 17 Приложения.** Эволюционный анализ белок-кодирующих последовательностей гена *GRID2* приматов с использованием ветвь-сайт-специфичной модели А.

#	Ветвь	MA0		MA1		$2\Delta\ln L$	р-знач.	р-знач, корр,	ВЕР
		NP	InL	NP	InL				
1	<i>Homo sapiens</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	6E-06	0,4990228	0,5	
2	<i>Homo sapiens neanderthalensis</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	4E-06	0,4992021	0,5	
3	<i>Homo sapiens ssp 'Denisova'</i>	52	-7445,3979	53	-7445,3979	4E-06	0,4992021	0,5	330 T 0,779
4	<i>Homo</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	2E-06	0,4994358	0,5	
5	<i>Pan troglodytes</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	4E-06	0,4992021	0,5	
6	<i>Pan paniscus</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	4E-06	0,4992021	0,5	
7	<i>Pan</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	4E-06	0,4992021	0,5	
8	<i>Hominini</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	2E-06	0,4994358	0,5	
9	<i>Gorilla gorilla</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	0	0,5	0,5	
10	<i>Homininae</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	2E-06	0,4994358	0,5	
11	<i>Pongo abelii</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	0	0,5	0,5	
12	<i>Hominidae</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	2,6E-05	0,4979658	0,5	
13	<i>Nomascus leucogenys</i>	52	-7447,2991	53	-7447,0931	0,411976	0,2604841	0,5	248 E 0,563
14	<i>Hominoidea</i>	52	-7446,6573	53	-7446,6573	6E-06	0,4990228	0,5	153 H 0,654
15	<i>Papio anubis</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	0	0,5	0,5	
16	<i>Theropithecus gelada</i>	52	-7445,8937	53	-7445,8937	0	0,5	0,5	244 T 0,746
17	<i>Papio&amp;Theropithecus</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	0	0,5	0,5	
18	<i>Macaca fascicularis</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	4E-06	0,4992021	0,5	

## Продолжение Таблицы 17 Приложения.

#	Ветвь	MA0		MA1		2ΔlnL	p-знач,	p-знач, корр,	BEB
		NP	lnL	NP	lnL				
19	<i>Macaca nemestrina</i>	52	-7446,5422	53	-7446,2213	0,641836	0,2115234	0,5	19 D 0,508
20	<i>Macaca</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	2E-06	0,4994358	0,5	
21	<i>Papionini</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2992	0,00013	0,4954515	0,5	
22	<i>Chlorocebus sabaesus</i>	52	-7446,7419	53	-7446,7419	0	0,5	0,5	830 S 0,636
23	<i>Cercopithecinae</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	0	0,5	0,5	
24	<i>Rhinopithecus bieti</i>	52	-7446,5335	53	-7446,5335	0	0,5	0,5	836 C 0,677
25	<i>Colobus angolensis</i>	52	-7444,0159	53	-7443,8565	0,318818	0,2861594	0,5	210 T 0,778 764 T 0,778
26	<i>Ptilocolobus tephrosceles</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	0	0,5	0,5	
27	<i>African Colobinae</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	8,4E-05	0,4963437	0,5	
28	<i>Colobinae</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	4E-06	0,4992021	0,5	
29	<i>Cercopithecidae</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	4E-06	0,4992021	0,5	
30	<i>Catarrhini</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	2E-06	0,4994358	0,5	
31	<i>Callithrix jacchus</i>	52	-7446,509	53	-7446,509	0	0,5	0,5	630 T 0,546 842 I 0,542
32	<i>Aotus nancymaae</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	0	0,5	0,5	
33	<i>Callithrix&amp;Aotus</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	6E-06	0,4990228	0,5	
34	<i>Saimiri boliviensis</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	0	0,5	0,5	
35	<i>Cebus capucinus</i>	52	-7444,042	53	-7444,042	2E-06	0,4994358	0,5	233 V 0,657 490 V 0,652 713 N 0,656
36	<i>Saimiri&amp;Cebus</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	2E-06	0,4994358	0,5	
37	<i>Platyrrhini</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	4E-06	0,4992021	0,5	
38	<i>Simiiformes</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	4E-06	0,4992021	0,5	
39	<i>Microcebus murinus</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2992	0,000168	0,4948293	0,5	
40	<i>Propithecus coquereli</i>	52	-7447,2991	53	-7447,2991	0	0,5	0,5	
41	<i>Lemuriformes</i>	52	-7447,2991	53	-7447,299	9,2E-05	0,4961735	0,5	
43	<i>Otolemur garnettii</i>	52	-7447,2992	53	-7447,2991	0,00015	0,4951141	0,5	
44	<i>Strepsirrhini</i>	52	-7447,2683	53	-7447,2991	0,061648	0,401955	0,5	676 E 0,508
45	<i>Primates</i>	52	-7446,2892	53	-7446,2892	4E-06	0,4992021	0,5	

**Таблица 18 Приложения. Значения свободной энергии Гиббса фрагментов мРНК гена *GRID2* и их изменение при нуклеотидных заменах.**

Позиция в геноме на хромосоме 4	93226840	94031933	94031993	94137900	94145790	94159584	94159638	94316763	94344032	94344060	94376878	94411797	94436426	94436547	94690593
rs								rs1385405	rs72668716						
Нуклеотидная позиция в белок-код. посл.	32	564	624	801	989	1188	1242	1251	1458	1488	1611	1866	2058	2178	2592
Предковый аллель	Hs	Pt	Pt	Hs	-	Hs	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Hs
dG (kcal/mol)															
<b>301 н.т.</b>															
<i>Homo sapiens</i>	-84,5	-68	-75,4	-79,9	-87,9	-89,6	-92	-91	-79,4	-79,9	-87,6	-76,2	-77,7	-86,3	-84
<i>Denisovan</i>	-84,5	-68	-75,4	-79,9	-87,5	-89,9	-92,3	-91,3	-79,4	-79,9	-87,6	-76,2	-77,7	-86,3	-84
<i>Pan troglodytes</i>	-82,9	-67,9	-74,8	-79,5	-87,9	-90,3	-94,3	-93,3	-79,2	-79,1	-87,9	-78,3	-72	-80,8	-87,6
<b>151 н.т.</b>															
<i>Homo sapiens</i>	-35,8	-29,6	-29,7	-30,5	-37,4	-32,6	-30,5	-31,3	-37,9	-33	-35,5	-36,1	-43,8	-39	-39,4
<i>Denisovan</i>	-35,8	-29,6	-29,7	-30,5	-36,6	-35,1	-31,5	-32,5	-37,9	-33	-35,5	-36,1	-43,8	-39	-39,4
<i>Pan troglodytes</i>	-36	-28,6	-31	-31,7	-37,4	-34,6	-31,8	-33,6	-35,2	-28,9	-36,2	-36,6	-38,7	-38,5	-40,3
<b>75 н.т.</b>															
<i>Homo sapiens</i>	-17,6	-16,6	-11	-5,9	-11	-11,2	-16,7	-15	-11,4	-12,6	-15,5	-17	-21,3	-11,7	-18,8
<i>Denisovan</i>	-17,6	-16,6	-11	-5,9	-11	-11,2	-17	-15,3	-11,4	-12,6	-15,5	-17	-21,3	-11,7	-18,8
<i>Pan troglodytes</i>	-17	-15,9	-9,4	-7	-11	-11,1	-18,3	-16,6	-10,6	-9,7	-16,2	-18,8	-15,8	-11,1	-17,9
<b>51 н.т.</b>															
<i>Homo sapiens</i>	-9,5	-7,3	-3,7	-2,8	-2	-4,4	-9,5	-10	-7,6	-7,6	-8,6	-9,6	-12	-7,9	-6,5
<i>Denisovan</i>	-9,5	-7,3	-3,7	-2,8	-2,7	-4,4	-9,5	-10,3	-7,6	-7,6	-8,6	-9,6	-12	-7,9	-6,5
<i>Pan troglodytes</i>	-7,3	-8,1	-3,7	-2,9	-2	-4,3	-11,1	-11,6	-7,9	-5,1	-9,3	-9,6	-10,2	-6,7	-7,3
<b>25 н.т.</b>															
<i>Homo sapiens</i>	-1,1	-2,3	1,7	-0,6	-1	0,1	-1,3	0,3	-0,7	-1,2	-1,9	-9,6	-1,5	-4,9	-2,6
<i>Denisovan</i>	-1,1	-2,3	1,7	-0,6	-1	0,1	-1,3	-3,4	-0,7	-1,2	-1,9	-9,6	-1,5	-4,9	-2,6
<i>Pan troglodytes</i>	1,1	-3,7	1,7	-1,5	-1	0	-1,7	-3,4	-0,9	-1,6	-1,9	-9,6	-0,9	-4,2	-2,7
ddG (Homo-Pan)															
<i>301 н.т.</i>	-1,6	-0,1	-0,6	-0,4	0,0	0,7	2,3	2,3	-0,2	-0,8	0,3	2,1	-5,7	-5,5	3,6
<i>151 н.т.</i>	0,2	-1,0	1,3	1,2	0,0	2,0	1,3	2,3	-2,7	-4,1	0,7	0,5	-5,1	-0,5	0,9
<i>75 н.т.</i>	-0,6	-0,7	-1,6	1,1	0,0	-0,1	1,6	1,6	-0,8	-2,9	0,7	1,8	-5,5	-0,6	-0,9
<i>51 н.т.</i>	-2,2	0,8	0,0	0,1	0,0	-0,1	1,6	1,6	0,3	-2,5	0,7	0,0	-1,8	-1,2	0,8
<i>25 н.т.</i>	-2,2	1,4	0,0	0,9	0,0	0,1	0,4	3,7	0,2	0,4	0,0	0,0	-0,6	-0,7	0,1
<i>p знач.</i>	0,180	0,655	0,564	0,180		0,655	0,025	0,025	0,653	0,180	0,046	0,08	0,025	0,025	0,178
ddG (Homo-Den)															
<i>301 н.т.</i>	0	0	0	0	-0,4	0,3	0,3	0,3	0	0	0	0	0	0	0
<i>151 н.т.</i>	0	0	0	0	-0,8	2,5	1	1,2	0	0	0	0	0	0	0
<i>75 н.т.</i>	0	0	0	0	0	0	0,3	0,3	0	0	0	0	0	0	0
<i>51 н.т.</i>	0	0	0	0	0,7	0	0	0,3	0	0	0	0	0	0	0
<i>25 н.т.</i>	0	0	0	0	0	0	0	3,7	0	0	0	0	0	0	0
<i>p знач.</i>					0,564	0,157	0,083	0,025							

**Таблица 19 Приложения.** Значения свободной энергии Гиббса для фрагментов мРНК гена *GRID2* у разных видов приматов, рассчитанные методом Mfold. Цветом выделены анализируемые таксоны: красным – Hominini, оранжевым – Hominae, фиолетовым – Hominoidea.

Нуклеотидная позиция в белок-кодир. посл.-ти	18	129	138 и 141	228	457	528	711	879	1335	1593	1860	2217	2445
Ветвь	Hominae	Hominae	Hominini	Hominoidea	Hominoidea	Hominae	Hominoidea	Hominini	Hominae	Hominoidea	Hominae	Hominoidea	Hominae
<b>301 н.т.</b>	dG (kcal/mol)												
<i>H.sapiens</i>	-84,50	-84,50	-88,10	-88,10	-76,50	-71,50	-66,70	-77,00	-82,20	-84,00	-79,20	-80,80	-80,30
<i>P.troglodytes</i>	-82,90	-82,90	-88,10	-88,10	-76,10	-71,40	-70,50	-76,20	-84,40	-81,00	-81,30	-80,80	-80,30
<i>P.panicus</i>	-82,90	-82,90	-86,50	-86,50	-76,10	-72,40	-70,50	-76,20	-85,80	-84,20	-81,30	-80,80	-80,30
<i>G.gorilla</i>	-82,40	-82,40	-86,20	-86,20	-76,10	-72,40	-68,00	-76,90	na	na	-85,40	-80,80	-80,30
<i>P.abelii</i>	-83,00	-83,00	-88,10	-88,10	-81,20	-70,30	-68,70	-74,40	-87,40	-82,10	-78,40	-83,00	-75,20
<i>N.leucogenys</i>	-80,30	-80,30	-87,90	-87,90	-76,60	-70,30	-67,70	-74,30	-90,10	-82,10	-83,10	-80,80	-80,30
<i>P.anubis</i>	-82,40	-82,40	-88,00	-88,00	-78,70	-68,70	-68,30	-76,00	-86,30	-84,80	-84,90	-82,50	-79,40
<i>M.fascicularis</i>	-81,70	-81,70	-88,00	-88,00	-75,00	-68,40	-66,80	-76,30	-86,20	-83,50	-85,50	-79,60	-78,60
<i>C.angolensis</i>	-84,50	-84,50	-88,00	-88,00	-75,40	-69,80	-71,70	-76,20	-86,20	-83,20	-85,60	-82,20	-80,30
<b>151 н.т.</b>													
<i>H.sapiens</i>	-35,80	-32,90	-39,00	-39,00	-33,40	-30,80	-29,90	-36,50	-39,00	-33,50	-36,10	-38,50	-32,60
<i>P.troglodytes</i>	-36,00	-32,90	-39,00	-39,00	-33,40	-30,10	-29,90	-36,50	-39,00	-32,90	-36,10	-38,50	-32,60
<i>P.panicus</i>	-36,00	-32,90	-39,00	-39,00	-33,40	-30,10	-29,90	-36,50	-39,00	-32,90	-36,10	-38,50	-32,60
<i>G.gorilla</i>	-34,30	-32,60	-39,00	-39,00	-33,40	-30,10	-29,90	-38,00	na	na	-36,10	-38,50	-32,60
<i>P.abelii</i>	-35,20	-32,60	-39,00	-39,00	-33,40	-29,40	-30,40	-38,00	-41,40	-32,90	-40,10	-38,50	-32,00
<i>N.leucogenys</i>	-34,80	-30,40	-39,50	-39,50	-33,40	-29,40	-28,70	-36,30	-44,00	-32,90	-39,10	-38,50	-32,00
<i>P.anubis</i>	-37,00	-31,70	-40,30	-40,30	-33,20	-33,30	-31,30	-37,60	-40,20	-37,20	-37,60	-35,20	-32,60
<i>M.fascicularis</i>	-35,80	-34,00	-40,30	-40,30	-34,00	-33,60	-31,30	-38,00	-40,20	-36,30	-41,20	-30,70	-32,00
<i>C.angolensis</i>	-36,10	-34,00	-40,30	-40,30	-33,20	-33,20	-31,30	-38,00	-40,20	-37,40	-38,80	-38,40	-35,50
<b>75 н.т.</b>													
<i>H.sapiens</i>	-17,60	-11,90	-11,80	-12,90	-11,30	-14,90	-13,70	-16,40	-16,80	-10,80	-19,40	-14,90	-14,10
<i>P.troglodytes</i>	-17,00	-11,90	-11,80	-12,90	-11,30	-14,90	-13,70	-16,40	-16,80	-11,50	-21,20	-14,90	-14,10
<i>P.panicus</i>	-17,00	-11,90	-11,80	-12,90	-11,30	-14,90	-13,70	-16,40	-16,80	-11,50	-21,20	-14,90	-14,10
<i>G.gorilla</i>	-17,60	-10,40	-11,10	-12,90	-11,30	-14,90	-13,70	-15,20	na	-11,50	-19,30	-14,90	-14,10
<i>P.abelii</i>	-14,90	-9,80	-13,00	-12,90	-10,90	-13,80	-13,70	-15,20	-19,70	-11,50	-24,10	-14,90	-14,10
<i>N.leucogenys</i>	-16,70	-9,80	-13,00	-12,90	-10,90	-13,80	-13,70	-15,20	-22,30	-11,50	-24,50	-14,90	-14,10
<i>P.anubis</i>	-16,90	-11,90	-13,00	-12,60	-9,90	-12,40	-16,00	-15,20	-18,50	-16,10	-24,80	-15,00	-14,10
<i>M.fascicularis</i>	-16,10	-9,80	-13,00	-12,60	-9,90	-12,40	-16,00	-15,20	-18,50	-16,10	-24,20	-15,00	-14,10
<i>C.angolensis</i>	-16,70	-9,80	-13,00	-12,60	-9,90	-12,40	-16,00	-15,20	-18,50	-16,10	-24,20	-15,00	-13,00

## Продолжение Таблицы 19 Приложения

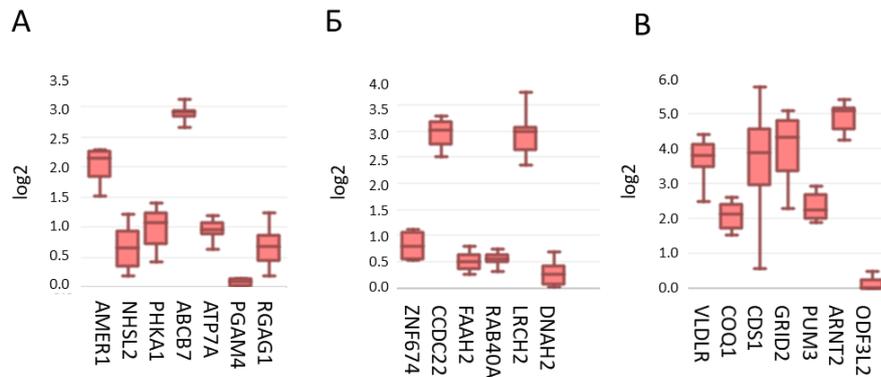
Нуклеотидная позиция в белок-кодир. посл.-ти	18	129	138 и 141	228	457	528	711	879	1335	1593	1860	2217	2445
Ветвь	<i>Homininae</i>	<i>Homininae</i>	<i>Hominini</i>	<i>Hominioidea</i>	<i>Hominioidea</i>	<i>Homininae</i>	<i>Hominioidea</i>	<i>Hominini</i>	<i>Homininae</i>	<i>Hominioidea</i>	<i>Homininae</i>	<i>Hominioidea</i>	<i>Homininae</i>
<b>51 н.т.</b>													
<i>H.sapiens</i>	-6,60	-9,10	-9,20	-10,00	-7,00	-8,80	-6,00	-10,80	-11,20	-9,20	-13,10	-6,70	-10,50
<i>P.troglodytes</i>	-5,70	-9,10	-9,20	-10,00	-7,00	-8,80	-6,00	-10,80	-11,20	-9,20	-13,10	-6,70	-10,50
<i>P.panicus</i>	-5,70	-9,10	-9,20	-10,00	-7,00	-8,80	-6,00	-10,80	-11,20	-9,20	-13,10	-6,70	-10,50
<i>G.gorilla</i>	-6,60	-7,60	-7,70	-10,00	-7,00	-8,80	-6,00	-10,70	na	-9,20	-13,10	-6,70	-10,50
<i>P.abelii</i>	-5,70	-7,00	-8,30	-10,00	-6,60	-9,50	-6,00	-10,70	-14,40	-9,20	-15,60	-6,70	-9,80
<i>N.leucogenys</i>	-5,70	-7,00	-8,30	-10,00	-6,60	-9,50	-6,00	-10,70	-17,00	-9,20	-16,00	-6,70	-9,80
<i>P.anubis</i>	-6,80	-7,00	-8,30	-9,70	-5,00	-7,90	-5,30	-10,70	-13,20	-9,50	-15,60	-6,50	-9,80
<i>M.fascicularis</i>	-6,80	-7,00	-8,30	-9,70	-4,80	-7,90	-5,30	-10,70	-13,20	-9,50	-15,70	-6,50	-9,80
<i>C.angolensis</i>	-6,80	-7,00	-8,30	-9,70	-5,00	-7,90	-5,30	-10,70	-13,20	-9,50	-15,70	-6,50	-9,80
<b>25 н.т.</b>													
<i>H.sapiens</i>	-0,60	-0,30	-3,00	-2,40	0,20	-2,10	-0,30	-2,80	-3,30	-5,90	-6,70	-3,00	0,60
<i>P.troglodytes</i>	-0,60	-0,30	-3,00	-2,40	0,20	-2,10	-0,30	-2,80	-3,30	-5,90	-6,70	-3,00	0,60
<i>P.panicus</i>	-0,60	-0,30	-3,00	-2,40	0,20	-2,10	-0,30	-2,80	-3,30	-5,90	-6,70	-3,00	0,60
<i>G.gorilla</i>	-0,60	-0,30	-2,50	-2,40	0,20	-2,10	-0,30	-0,60	-3,30	-5,90	-6,70	-3,00	0,60
<i>P.abelii</i>	-0,60	-3,50	-2,60	-2,40	-1,90	-0,30	-0,30	-0,60	-3,00	-5,90	-5,80	-3,00	0,60
<i>N.leucogenys</i>	-0,60	-3,50	-2,60	-2,40	-1,90	-0,30	-0,30	-0,60	-3,00	-5,90	-5,90	-3,00	0,60
<i>P.anubis</i>	-0,60	-3,50	-2,60	2,40	-1,90	-0,30	0,40	-0,60	-3,00	-4,10	-5,80	-3,10	0,60
<i>M.fascicularis</i>	-0,60	-3,50	-2,60	2,40	-1,90	-0,30	0,40	-0,60	-3,00	-4,10	-1,10	-3,10	0,60
<i>C.angolensis</i>	-0,60	-3,50	-2,60	2,40	-1,90	-0,30	0,40	-0,60	-3,00	-4,10	-1,10	-3,10	0,60

**Таблица 20 Приложения.** Значения свободной энергии Гиббса для фрагментов мРНК гена *GRID2* и их изменение в зависимости от вариантов нуклеотидов у разных таксонов приматов, рассчитанные методом Mfold. Виды из таксона взяты с минимальным количеством специфических вариантов, которых нет у других видов из этого таксона.

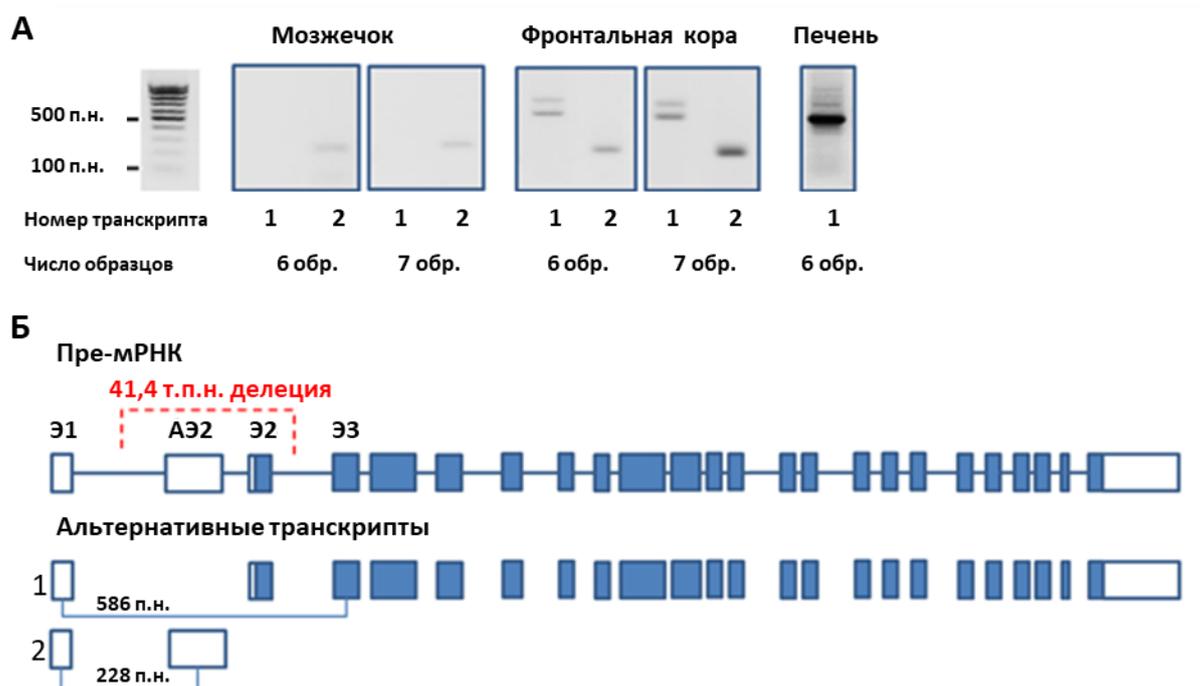
Нуклеотидная позиция в белок-кодир. посл.-ти	18	129	138 и 141	228	457	528	711	879	1335	1593	1860	2217	2445
Таксон (Вид) с мутантным аллелем	Hominae (Gorilla)	Hominae (Gorilla)	Homini (H.sap)	Hominoidea (Pongo)	Hominoidea (Nomascus)	Hominae (Gorilla)	Hominoidea (Gorilla)	Homini (H.sap)	Hominae (P.trog)	Hominoidea (P.trog)	Hominae (P.trog)	Hominoidea (Nomascus)	Hominae (Gorilla)
<i>dG (kcal/mol)</i>													
301 н.т.	-82,40	-82,40	-84,50	-88,10	-76,60	-72,40	-68,00	-77,00	-84,40	-81,00	-81,30	-80,80	-80,30
151 н.т.	-34,30	-32,60	-32,90	-39,00	-33,40	-30,10	-29,90	-36,50	-39,00	-32,90	-36,10	-38,50	-32,60
75 н.т.	-17,60	-10,40	-11,80	-12,90	-10,90	-14,90	-13,70	-16,40	-16,80	-11,50	-21,20	-14,90	-14,10
51 н.т.	-6,60	-7,60	-9,20	-10,00	-6,60	-8,80	-6,00	-10,80	-11,20	-9,20	-13,10	-6,70	-10,50
25 н.т.	-0,60	-0,30	-3,00	-2,40	-1,90	-2,10	-0,30	-2,80	-3,30	-5,90	-6,70	-3,00	0,60
Таксон (Вид) с предковым аллелем	Hominoidea (Nomascus)	Hominoidea (Nomascus)	Hominae (Gorilla)	Cercopithecidae (Colobus)	Cercopithecidae (Colobus)	Hominoidea (Nomascus)	Cercopithecidae (Colobus)	Hominae (Gorilla)	Hominoidea (Pongo)	Cercopithecidae (Maccaca fas)	Hominoidea (Pongo)	Cercopithecidae (Colobus)	Hominoidea (Nomascus)
<i>dG (kcal/mol)</i>													
301 н.т.	-80,30	-80,30	-82,40	-88,00	-75,40	-70,30	-71,70	-76,90	-87,40	-83,50	-78,40	-82,20	-80,30
151 н.т.	-34,80	-30,40	-32,60	-40,30	-33,20	-29,40	-31,30	-38,00	-41,40	-36,30	-40,10	-38,40	-32,00
75 н.т.	-16,70	-9,80	-11,10	-9,70	-5,00	-13,80	-16,00	-15,20	-19,70	-16,10	-24,10	-6,50	-14,10
51 н.т.	-5,70	-7,00	-7,70	-9,70	-5,00	-9,50	-5,30	-10,70	-14,40	-9,50	-15,60	-6,50	-9,80
25 н.т.	-0,60	-3,50	-2,50	2,40	-1,90	-0,30	0,40	-0,60	-3,00	-4,10	-5,80	-3,10	0,60
<i>ddG (kcal/mol)</i>													
Сравнение видов	Gorilla/ Nomascus	Gorilla/ Nomascus	H.sap/ Gorilla	Pongo/ Colobus	Nomascus/ Colobus	Gorilla/ Nomascus	Gorilla/ Colobus	H.sap/ Gorilla	P.trog/ Pongo	P.trog/ Maccaca fas	P.trog/ Pongo	Nomascus/ Colobus	Gorilla/ Nomascus
301 н.т.	-2,10	-2,10	-2,10	-0,10	-1,20	-2,10	3,70	0,70	3,00	1,10	-2,90	1,40	0,00
151 н.т.	0,50	-2,20	-0,30	1,30	-0,20	-0,70	-1,20	1,50	2,40	3,40	4,00	-0,10	-0,60
75 н.т.	-0,90	-0,60	-0,70	-0,30	-1,00	-1,10	2,30	-1,20	2,90	4,60	2,90	0,10	0,00
51 н.т.	-0,90	-0,60	-1,50	-0,30	-1,60	0,70	-0,70	-0,10	3,20	0,30	2,50	-0,20	-0,70
25 н.т.	0,00	3,20	-0,50	-4,80	0,00	-1,80	-0,70	-2,20	-0,30	-1,80	-0,90	0,10	0,00
<i>p знач.</i>	0,317	0,180	<b>0,025</b>	0,655	<b>0,046</b>	0,180	0,655	0,180	0,180	0,180	0,655	0,655	0,157

Виды	Белок AMER1						NHSL2					PHKA1					RGAG1											
	AK позиция						AK позиция					AK позиция					AK позиция											
	342 343 344 345 346 347 348						193 194 195 196 197 198 199					740 741 742 743 744 745 746					1118 1119 1120 1121 1122 1123 1124											
	D S M V S G G						Q L S K D E T					Y N E Q S A T					K P T L H M T											
пациента																												
<i>Homo sapiens</i>	D	S	M	V	S	G	G	Q	L	S	K	D	E	T	Y	N	E	Q	S	A	T	K	P	T	L	H	M	T
<i>Pan troglodytes</i>	D	S	M	A	S	G	G	Q	L	S	E	D	E	T	Y	K	E	G	S	A	T	K	P	T	S	H	M	T
<i>Gorilla gorilla</i>	D	S	M	A	S	G	G	Q	L	S	E	D	E	T	Y	N	E	G	S	A	T	K	P	T	P	H	M	T
<i>Macaca mulatta</i>	D	S	M	A	S	G	G	Q	L	S	E	D	E	T	Y	N	E	G	S	A	T	K	P	T	P	H	M	T
<i>Callithrix jacchus</i>	D	S	M	A	S	G	G	Q	L	S	E	D	E	T	Y	N	E	G	S	A	T	K	P	R	P	Y	M	T
<i>Mus musculus</i>	D	S	M	A	S	G	G	Q	L	S	E	D	E	T	Y	E	E	G	G	A	T	K	S	T	P	H	M	T
<i>Sus domesticus</i>	D	S	M	A	S	G	G	Q	L	S	E	D	E	T	Y	E	E	R	S	A	T	R	A	I	P	R	M	T
<i>Camelus bactrianus</i>	D	S	M	A	S	G	G	Q	L	S	E	D	E	T	Y	D	E	G	S	A	T	K	S	T	P	H	M	T
<i>Tursiops truncatus</i>	D	S	M	A	S	G	G	Q	L	S	E	D	E	T	Y	D	E	G	S	A	T	K	F	T	P	H	V	T
<i>Equus caballus</i>	D	S	M	A	S	G	G	Q	L	S	E	D	E	T	Y	D	E	G	S	A	T	K	S	T	P	H	V	T
<i>Felis catus</i>	D	S	M	A	S	G	G	Q	L	S	E	D	E	T	Y	D	E	G	S	A	T	K	S	T	P	H	M	A
<i>Erinaceus europaeus</i>	D	S	M	A	S	G	G	Q	L	S	K	D	D	T	Y	D	E	G	S	S	T	K	S	I	P	Q	A	T
<i>Loxodonta africana</i>	D	S	M	A	S	G	G	Q	L	S	E	D	E	T	Y	D	E	R	S	A	T	T	S	T	P	C	A	T
<i>Trichechus manatus</i>	D	S	M	A	S	G	G	Q	L	S	K	D	E	T	Y	D	E	R	S	A	T	K	S	T	P	R	A	T
<i>Dasypus novemcinctus</i>	D	S	M	A	S	G	G	Q	L	S	E	D	K	T	Y	D	E	R	V	A	T	K	S	T	S	H	M	T
<i>Monodelphis domestica</i>	E	S	I	I	S	A	E	R	G	N	G	D	K	T	S	S	E	R	P	V	T							
<i>Gallus domesticus</i>	E	S	T	I	S	V	E	R	A	D	E	E	S		E	S	E	P	G	P	T							
<i>Meleagris gallopavo</i>	E	S	T	I	S	V	E	R	A	D	E	E	S		E	S	E	P	G	P	T							
<i>Alligator mississippiensis</i>	E	S	T	I	S	V	E	Q	E	N	E	D	E	T	H	G	Q	P	G	A	T							
<i>Chelonia mydas</i>	E	S	T	I	S	M	E	R	V	N	E	D	E	A	D	G	Q	P	G	A	T							
<i>Xenopus tropicalis</i>	D	N	A	I	S	L	E	R	V	S	E	D	E	T	Y	G	Q	P	G	V	T							
<i>Danio rerio</i>	E	S	S	V	S	A	D	Q	V	C	E	D	E	T	H	G	K				T							
Группа подобия	s						S					e d e					T											

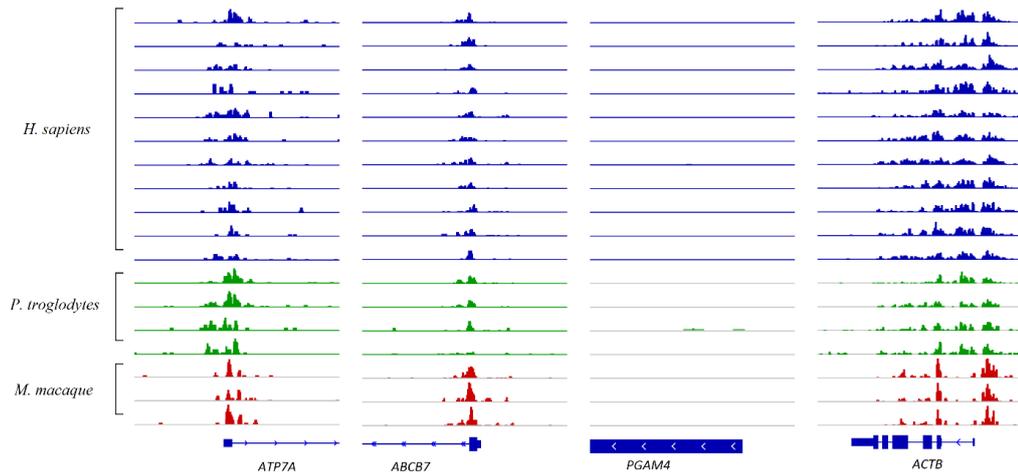
**Рисунок 1 Приложения.** Эволюционный анализ редких аминокислотных замен, найденных у пациента АХ-III-17 из семьи АХ.



**Рисунок 2 Приложения.** Сравнение экспрессии генов в период эмбрионального развития в мозжечке, в которых найдены редкие варианты, изменяющие аминокислотную последовательность, у пациентов: А – из семьи АХ, Б – из семьи АI, В – из семьи Q.



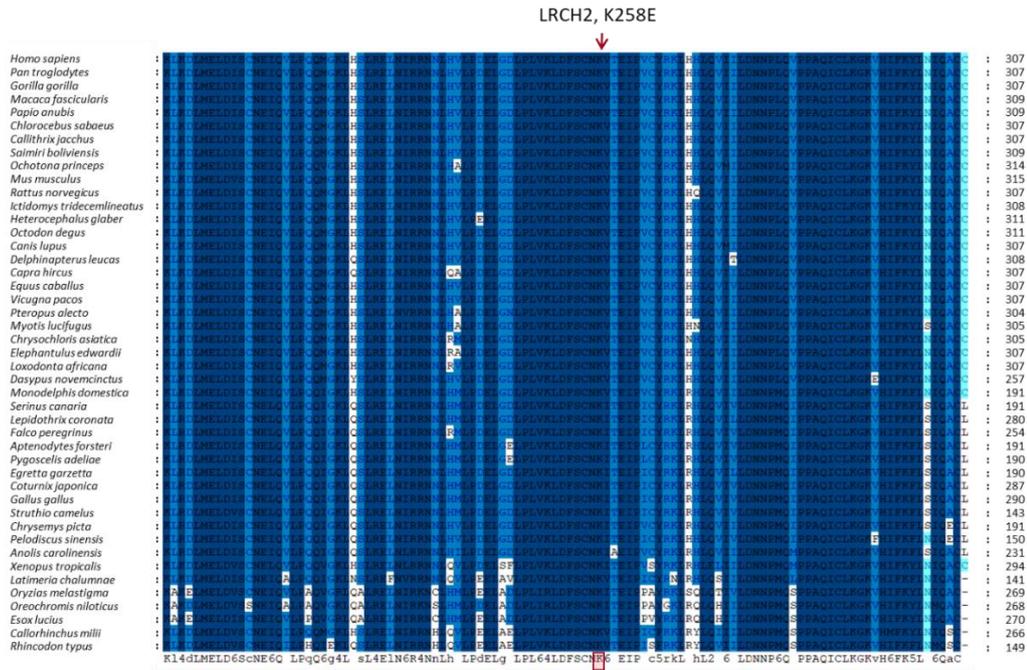
**Рисунок 3 Приложения.** Сравнение экспрессии гена *ATP7A* в мозжечке и фронтальной коре головного мозга. А – Электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР мажорного транскрипта (1) и альтернативного (2). Б – Схема структуры различных транскриптов мРНК *ATP7A*: 1 – канонической (мажорный) последовательности транскрипта, кодирующей длинные изоформы белка (ENST00000341514, ENST00000343533). Для подтверждения экспрессии мажорного транскрипта в отделах мозга и печени были использованы праймеры, находящиеся в 1 и 3 экзоне (Э1 и Э3). 2 – некодирующий процессированный транскрипт (ENST00000602791) был описан для сплайсированных коротких изоформ, которые используют альтернативный экзон (АЭ1) в 5'-нетранслируемой области *ATP7A*. Для подтверждения экспрессии альтернативного транскрипта в отделах мозга и печени были использованы праймеры, находящиеся в 1 и 2 альтернативном экзоне (Э1 и АЭ2).



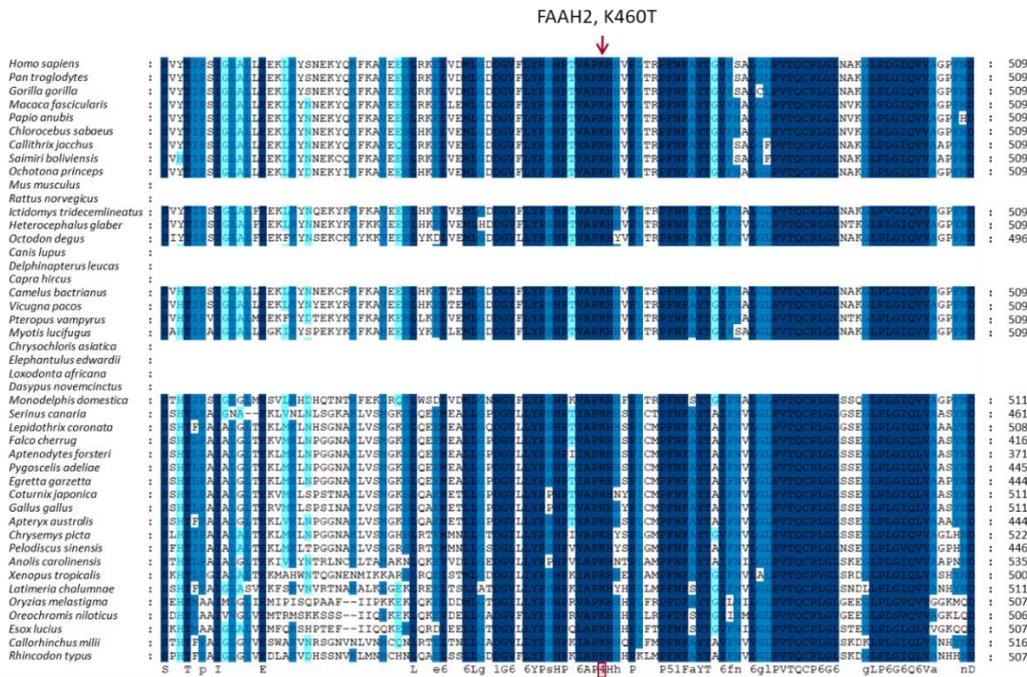
**Рисунок 4 Приложения.** Идентификация пиков гистонов H3K4me3, являющихся маркерами открытого хроматина для промоторов генов. Наличие данных пиков указывает на возможное активное состояние промоторов генов *ATP7A* и *ABCB7*, но не гена *PGAM4*, в нейронах головного мозга приматов. Пики H3K4me3 были получены из данных ChIP-seq для нейронов коры головного мозга [Shulha et al., 2012]. В качестве контроля взят ген *ACTB*.

Виды	Белок ZNF674					Белок CCDC22				Белок RAB40A					Белок DNAH2					Белок DNAH2															
	АК позиция					АК позиция				АК позиция					АК позиция					АК позиция															
	484	485	486	487	488	489	490	140	141	142	143	144	145	146	39	40	41	42	43	44	45	513	514	515	516	517	518	519	1210	1211	1212	1213	1214	1215	1216
пациента	L	I	K	R	Q	R	I	L	P	W	I	P	P	H	A	E	S	L	Y	S	H	V	D	L	H	M	L	F	F	K	I	E	Q	P	P
<i>Homo sapiens</i>	L	I	K	H	Q	R	I	L	P	W	V	P	P	H	A	E	S	P	Y	S	H	V	D	L	Y	M	L	F	F	K	I	E	Q	P	P
<i>Pan troglodytes</i>	L	I	K	H	Q	R	I	L	P	W	V	P	P	L	A	E	S	P	Y	S	H	V	D	L	Y	M	L	F	F	K	I	E	Q	P	P
<i>Gorilla gorilla</i>	L	I	K	H	Q	R	I	L	P	W	V	P	P	L	A	E	S	P	Y	S	H	V	D	L	Y	M	L	F	F	K	I	E	Q	P	P
<i>Macaca mulatta</i>	L	I	K	H	Q	R	I	L	P	W	V	P	P	L	A	E	S	P	Y	S	H	V	D	L	Y	M	L	F	F	K	I	E	Q	P	P
<i>Callithrix jacchus</i>	L	I	K	H	Q	R	I	L	P	W	V	P	P	L	V	E	S	P	Y	S	Y	V	D	L	Y	M	L	F	F	K	I	E	Q	P	P
<i>Mus musculus</i>	L	I	K	H	Q	R	I	L	P	W	V	P	P	L	L	P	W	V	P	P	L	V	D	L	Y	M	L	F	F	K	I	E	Q	P	V
<i>Sciurus vulgaris</i>	L	I	K	Q	Q	R	I	L	P	W	V	P	P	L	V	E	S	P	Y	S	Y	V	D	L	Y	M	L	F	F	K	I	E	Q	P	A
<i>Sus domesticus</i>	L	I	K	H	Q	R	I	L	P	W	V	P	P	L	V	P	W	V	P	P	L	V	D	L	Y	M	L	F	F	K	I	E	Q	P	A
<i>Tursiops truncatus</i>	L	T	K	H	Q	R	I	L	P	W	V	P	P	L	V	P	W	V	P	P	L	V	D	L	Y	M	L	F	F	K	I	E	Q	P	A
<i>Equus caballus</i>	L	I	K	H	Q	R	I	V	P	W	V	P	P	L	V	P	W	V	P	P	L	V	D	L	Y	M	L	F	F	K	I	E	Q	P	V
<i>Felis catus</i>	L	I	K	H	E	R	I	L	P	W	V	P	P	L	V	P	W	V	P	P	L	V	D	L	Y	M	L	F	F	K	I	E	Q	P	V
<i>Erinaceus europaeus</i>	V	P	W	V	P	P	L	V	P	W	V	P	P	L	V	P	W	V	P	P	L	V	D	L	Y	M	L	F	F	K	I	E	Q	P	V
<i>Loxodonta africana</i>	L	S	W	V	P	P	L	L	S	W	V	P	P	L	L	S	W	V	P	P	L	V	D	L	Y	M	L	F	F	K	I	E	Q	P	A
<i>Trichechus manatus</i>	L	P	W	V	P	P	L	L	P	W	V	P	P	L	L	P	W	V	P	P	L	V	D	L	Y	M	L	F	F	K	I	E	Q	P	A
<i>Elephantulus edwardii</i>	L	P	W	V	P	P	L	L	P	W	V	P	P	L	L	P	W	V	P	P	L	V	D	L	Y	M	L	F	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dasyurus novemcinctus</i>	L	P	W	V	P	P	L	L	P	W	V	P	P	L	L	P	W	V	P	P	L	V	D	L	Y	M	L	F	F	K	I	E	Q	P	V
<i>Monodelphis domestica</i>	F	T	K	H	Q	S	I	E	P	W	V	P	P	A	A	A	D	T	Y	S	Y	V	D	L	Y	M	L	F	F	K	I	E	Q	P	P
<i>Gallus gallus</i>	L	Q	L	H	Q	R	F	L	Q	L	H	Q	R	F	A	E	S	P	Y	G	Y	A	E	S	P	Y	G	Y	A	E	S	P	Y	G	Y
<i>Meleagris gallopavo</i>	L	V	T	H	M	R	T	L	V	T	H	M	R	T	A	E	S	P	Y	G	Y	V	D	I	Y	M	L	F	F	K	I	E	Q	P	P
<i>Alligator mississippiensis</i>	L	M	K	H	Q	R	I	T	P	W	V	P	P	A	T	E	S	P	Y	G	Y	V	D	I	Y	M	L	F	F	K	I	E	Q	P	P
<i>Chelonia mydas</i>	L	I	T	H	Q	K	I	T	P	W	V	P	P	A	T	E	S	P	Y	-	-	V	D	V	Y	M	L	F	F	K	I	E	Q	P	A
<i>Anolis carolinensis</i>	F	T	Y	H	Q	R	S	I	P	W	V	P	P	S	A	E	S	P	Y	G	Y	V	D	I	Y	M	L	F	F	K	I	D	Q	P	P
<i>Xenopus tropicalis</i>	L	V	S	H	K	R	K	L	P	W	L	P	S	S	T	E	S	P	Y	G	-	V	Q	V	Y	Q	L	F	F	K	I	E	Q	P	S
<i>Danio rerio</i>	F	K	R	H	M	K	I	V	P	W	L	P	P	T	A	E	S	P	Y	-	Y	V	D	V	Y	N	L	F	F	K	I	E	Q	P	A
Группа подобия								p	w	p	p										v	d	y	m	f			f	k	i	e	q	p		

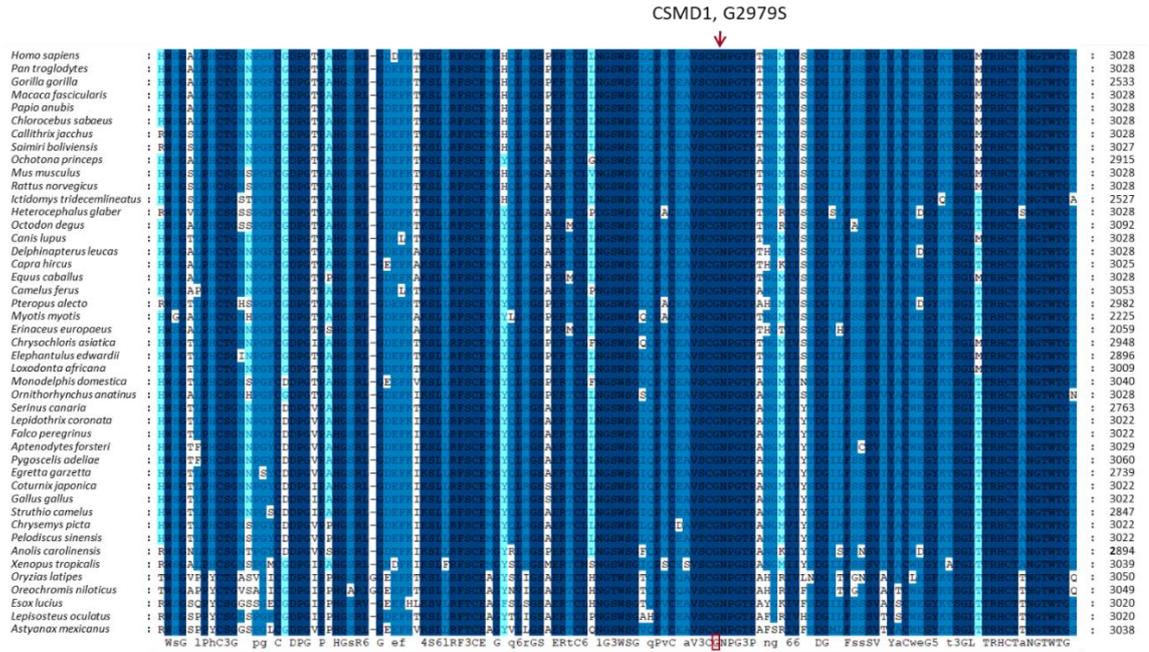
**Рисунок 5 Приложения.** Эволюционный анализ редких аминокислотных замен, найденных у пациентов из семьи А1, исключённых из дальнейшего анализа ввиду несоответствия критериям отбора, но возможно имеющих минорный эффект на фенотип заболевания.



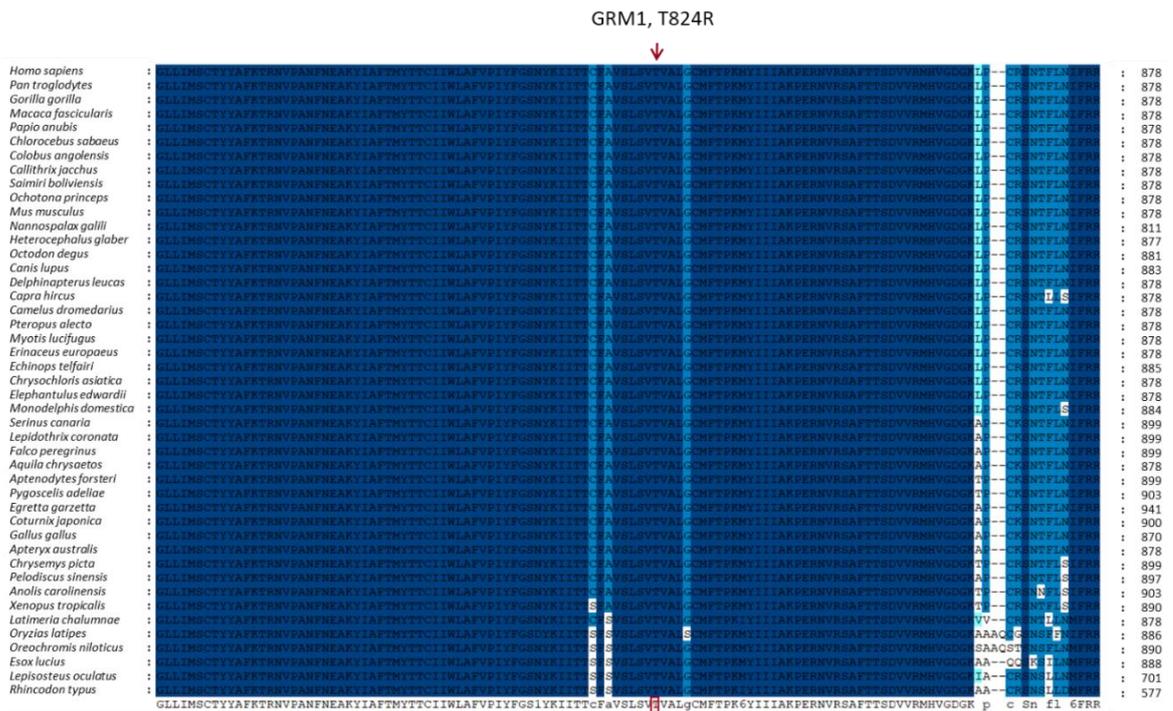
**Рисунок 6 Приложения.** Эволюционный анализ новой аминокислотной замены p.Lys258Glu (K258E) в белке LRCH2, найденной у пациентов из семьи А1.



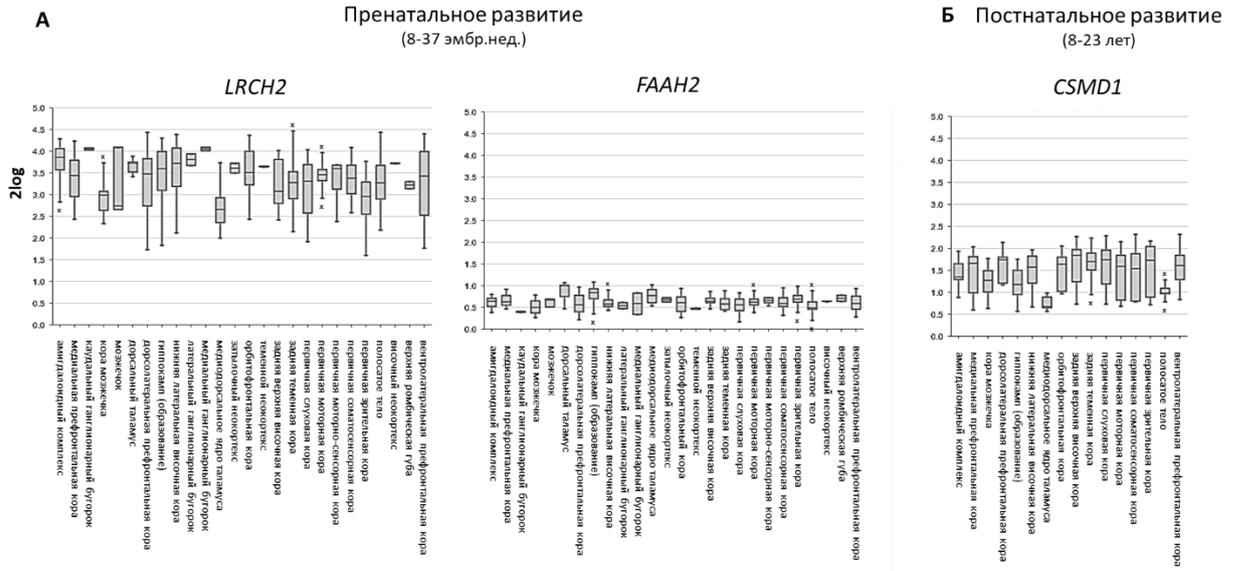
**Рисунок 7 Приложения.** Эволюционный анализ редкой аминокислотной замены p.Lys460Thr (K460T) в белке FAAH2, найденной у пациентов из семьи А1.



**Рисунок 8 Приложения.** Эволюционный анализ редкой аминокислотной замены p.Gly2979Ser (G2979S) в белке CSMD1, найденной у пациентов из семей АII -АIII.

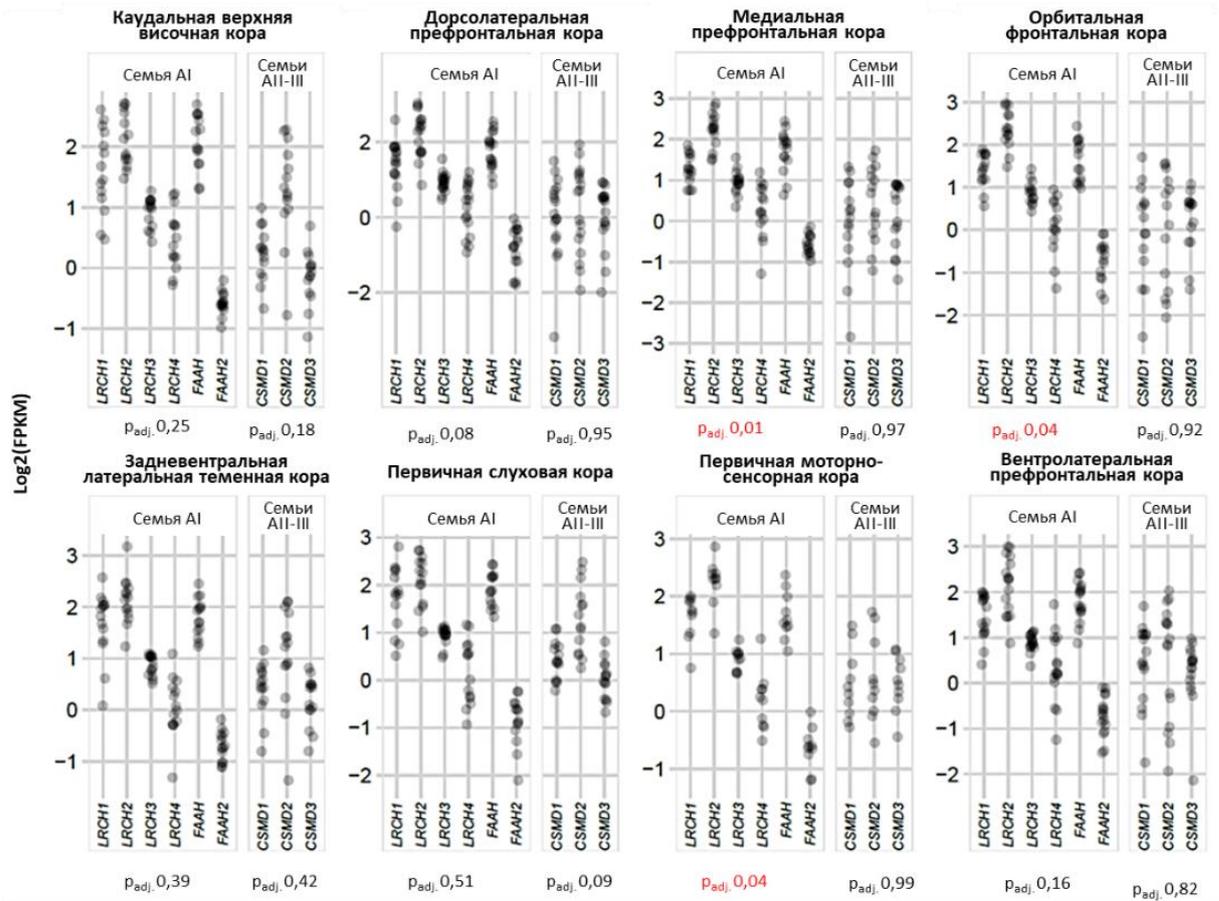


**Рисунок 9 Приложения.** Эволюционный анализ новой аминокислотной замены p.Thr824Arg (T824R) в белке GRM1, обнаруженной у пациента АIV-1.



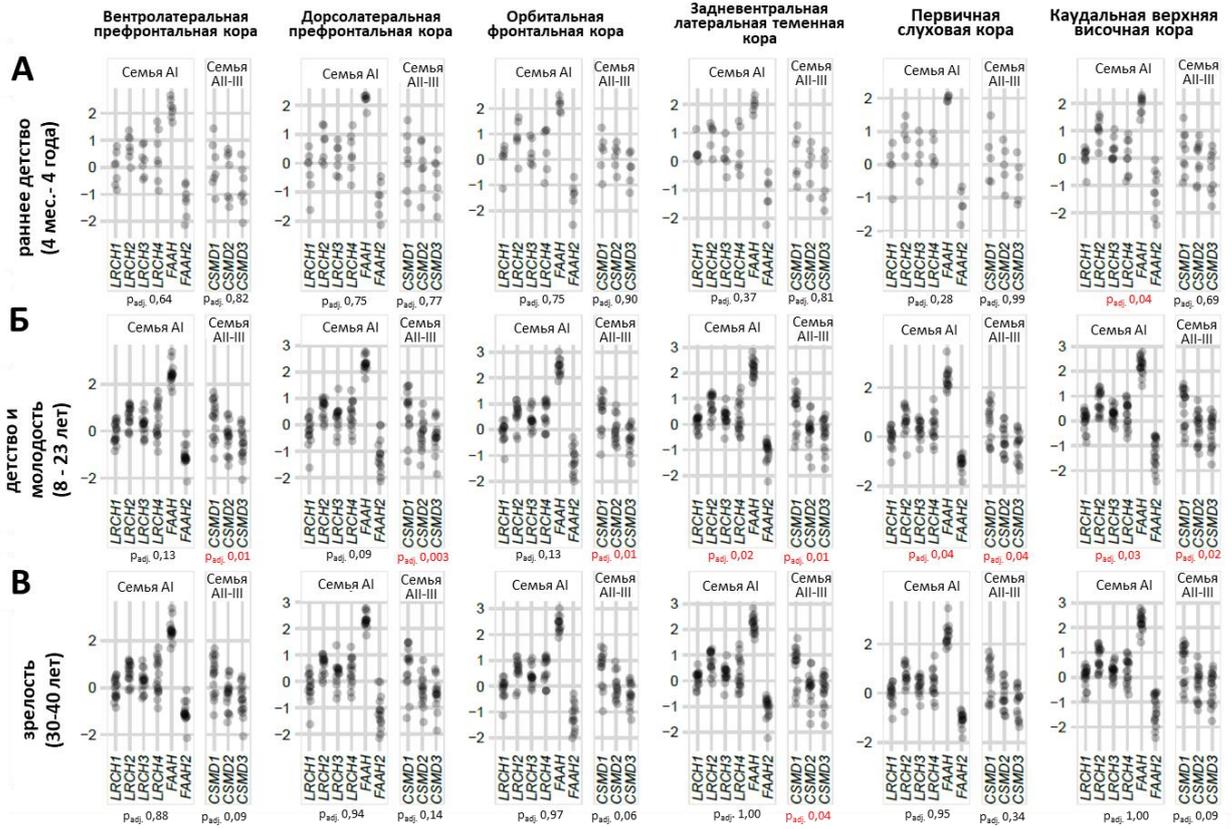
**Рисунок 10 Приложения.** Экспрессия генов-кандидатов во время пренатального и постнатального развития в различных областях мозга (BrainSpan [Miller et al., 2014]), визуализированная с помощью онлайн базы данных R2: Платформа анализа и визуализации геномики (<http://r2.amc.nl>)

## Пренатальное развитие



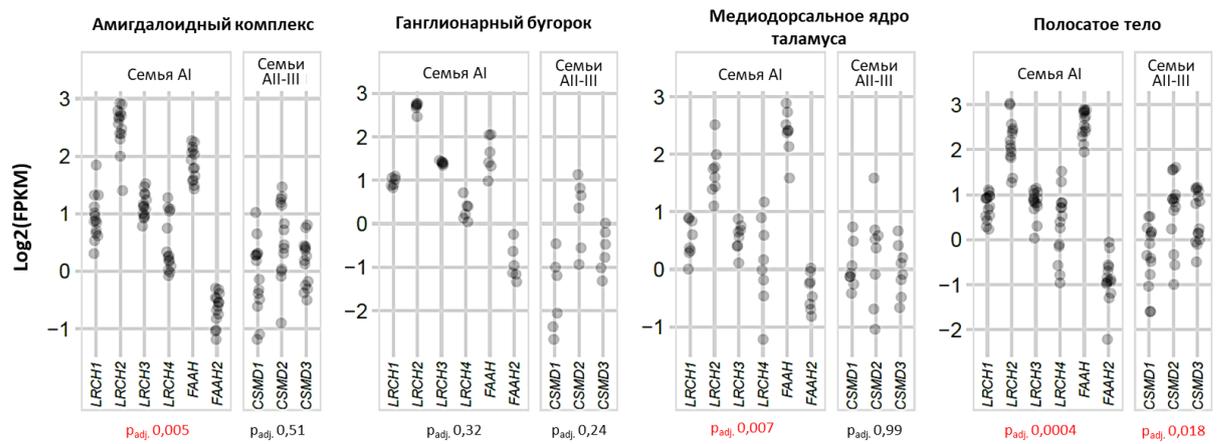
**Рисунок 11 Приложения.** Экспрессия генов-кандидатов и их паралоогов в коре головного мозга в пренатальный период (BrainSpan [Miller et al., 2014]).  $P_{\text{adj}}$  - максимальное скорректированное р значение для генов *LRCH2* и *CSMD1* и их паралоогов. Значение  $P_{\text{adj}} < 0,05$  выделено красным.

## Постнатальное развитие



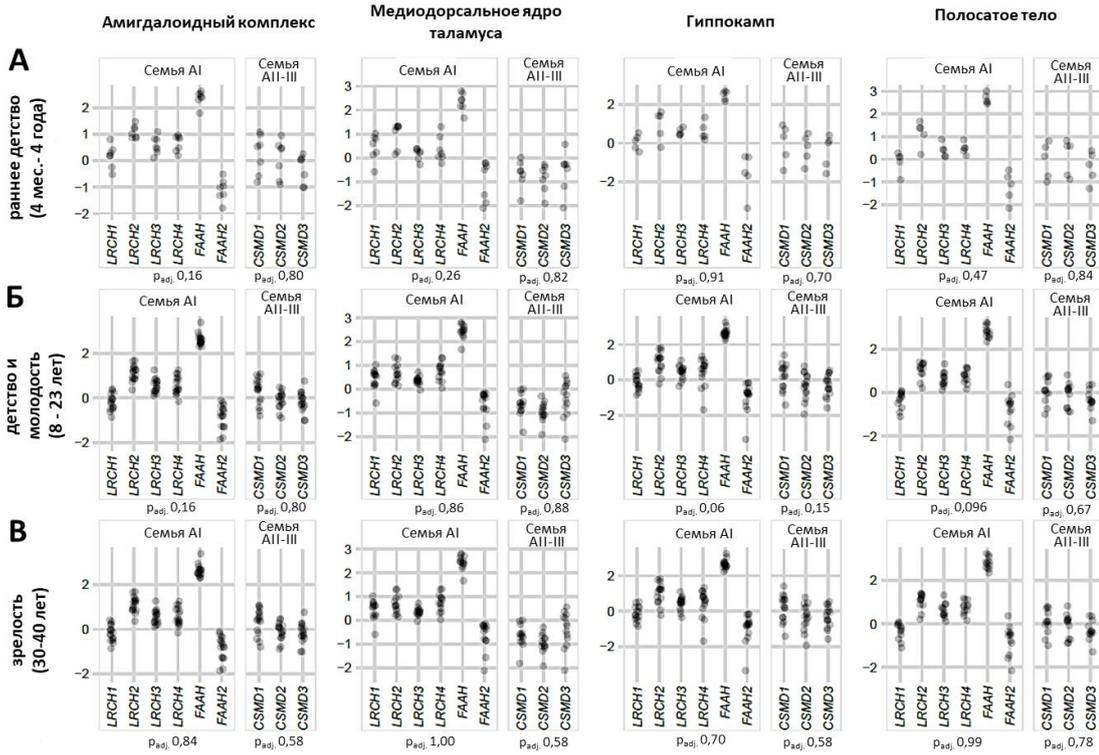
**Рисунок 12** Приложение. Экспрессия генов-кандидатов и их паралогов в коре головного мозга в постнатальный период (BrainSpan).  $P_{adj}$  - максимальное скорректированное  $p$  значение для генов *LRCH2* и *CSMD1* и их паралогов. Значение  $P_{adj} < 0,05$  выделено красным.

### Пренатальное развитие

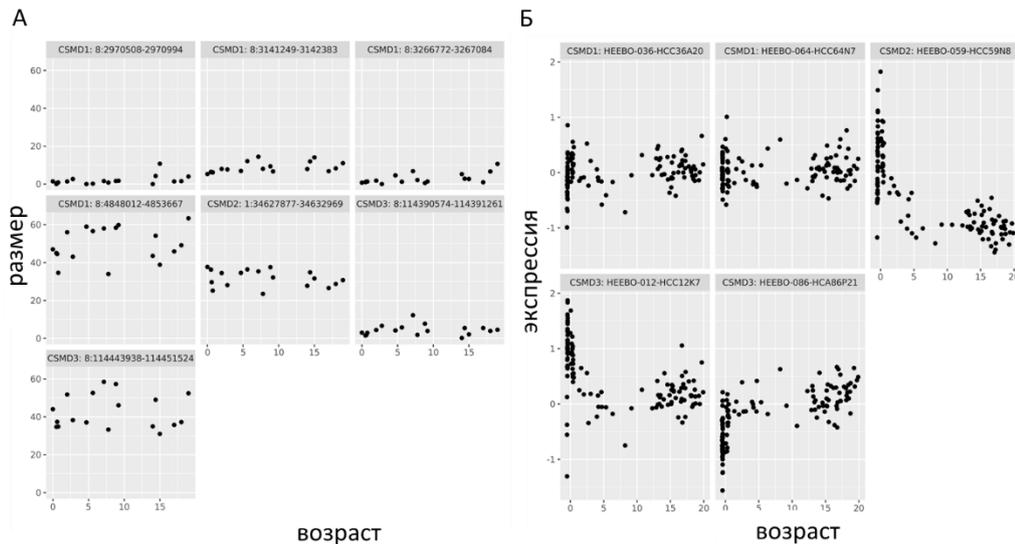


**Рисунок 13 Приложения.** Экспрессия генов-кандидатов и их паралога в различных структурах развивающегося мозга в пренатальный период.  $P_{\text{adj}}$  - максимальное скорректированное р значение для генов *LRCH2* и *CSMD1* и их паралога. Значение  $P_{\text{adj}} < 0,05$  выделено красным.

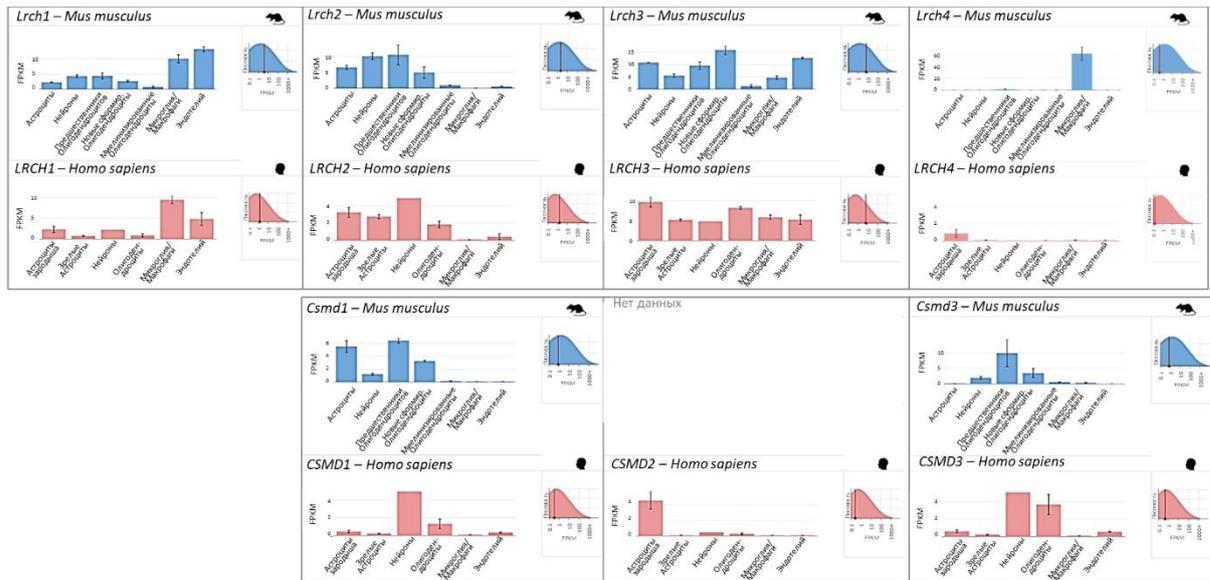
## Постнатальное развитие



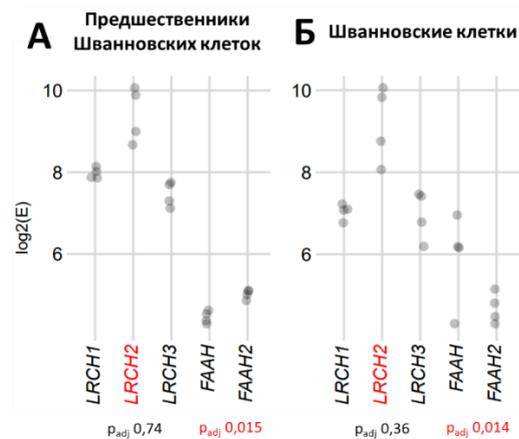
**Рисунок 14 Приложения.** Экспрессия генов-кандидатов и их паралогов в различных структурах развивающегося мозга в постнатальный период.  $P_{adj}$  - максимальное скорректированное  $p$  значение для генов *LRCH2* и *CSMD1* и их паралогов.



**Рисунок 15 Приложения.** Сравнение активности генов семейства CSMD в лобной коре. А - размер пика H3K4me3 ChIP-seq в нейронах. В – данные об экспрессии генов, полученные в рамках проекта GSE30272.



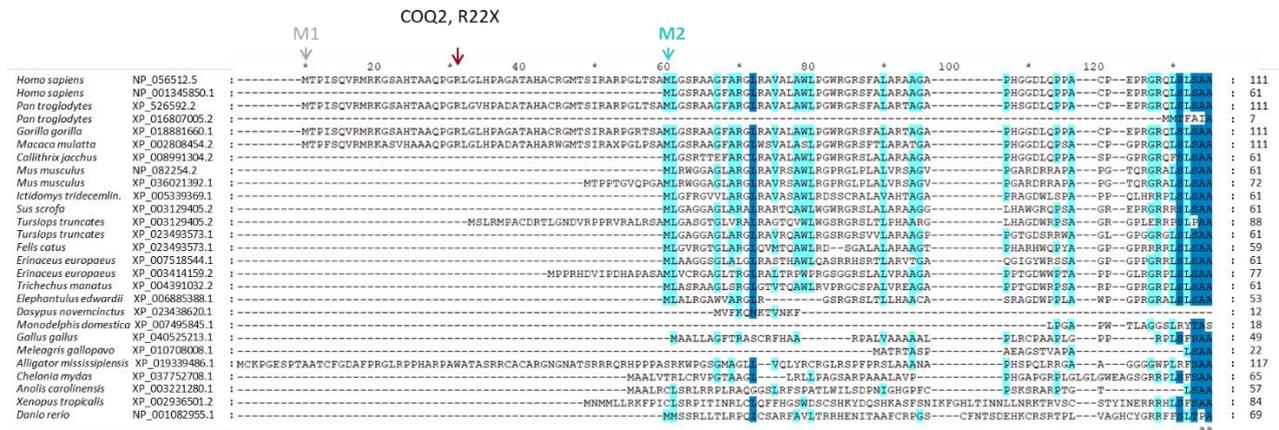
**Рисунок 16 Приложения.** Экспрессия одиночных клеток генов-кандидатов *LRCH2* и *CSMD1* и их паралоги в тканях коры головного мозга человека и мышей (получена из проекта Brain RNA-Seq) [Zhang et al., 2016; Zhang et al., 2014].



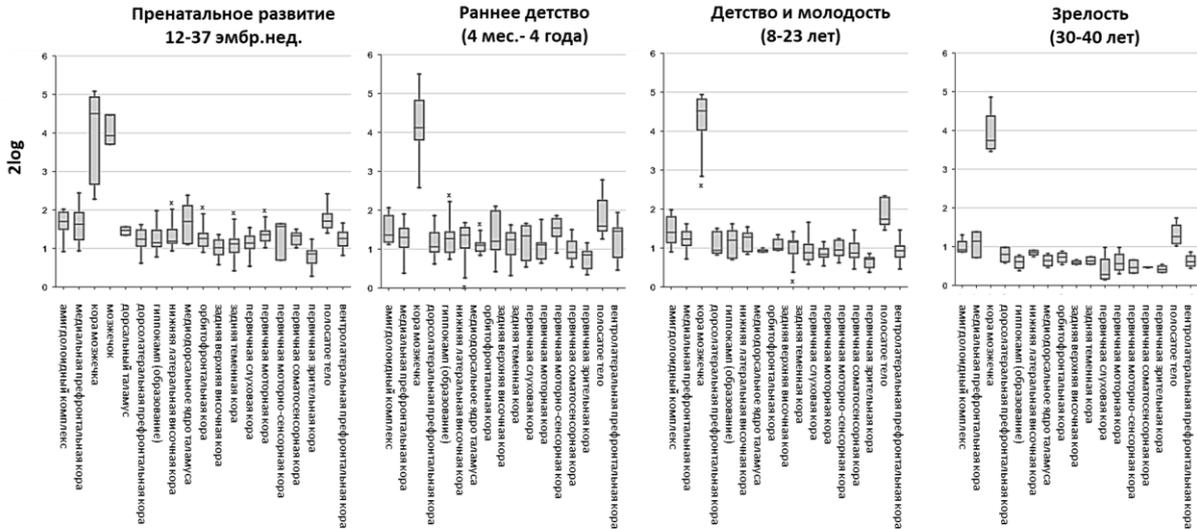
**Рисунок 17 Приложения.** Экспрессия в шванновских клетках генов-кандидатов *LRCH2* и *FAAH2* и их паралоги, идентифицированных в семье A1. *LRCH2* демонстрирует некоторую тенденцию к более высокому уровню экспрессии в развивающихся и зрелых шванновских клетках по сравнению с его паралогами. Статистически значимые различия наблюдаются в экспрессии генов *FAAH* и *FAAH2* в предшественниках и зрелых шванновских клетках. Данные об экспрессии генов были получены [Kim H-S, et al., 2017].  $P_{adj}$  - максимальное скорректированное  $p$  значение.

Виды	VLDLR						CDS1					PUM3					ARNT2					ODF3L2													
	AK						AK					AK					AK					AK													
	позиция						позиция					позиция					позиция					позиция													
	пациента						пациента					пациента					пациента					пациента													
	78	79	80	81	82	83	84	45	46	47	48	49	50	51	207	208	209	210	211	212	213	459	460	461	462	463	464	465	98	99	100	101	102	103	104
	V	C	N	S	G	Q	C	D	R	Y	A	D	L	D	V	E	L	G	K	A	K	Y	D	L	C	Q	V	P	R	F	G	H	S	C	T
<i>Homo sapiens</i>	V	C	N	N	G	Q	C	D	R	Y	G	D	L	D	V	E	L	S	K	A	K	Y	D	L	S	Q	V	P	R	F	G	R	S	C	T
<i>Pan troglodytes</i>	V	C	N	N	G	Q	C	D	R	Y	G	D	L	D	V	E	L	S	K	A	K	Y	D	L	S	Q	V	P	R	F	G	R	S	C	T
<i>Gorilla gorilla</i>	V	C	N	N	G	Q	C	D	R	Y	G	D	L	D	V	E	L	S	K	A	K	Y	D	L	S	Q	V	P	R	F	G	R	S	C	T
<i>Macaca mulatta</i>	V	C	N	N	G	Q	C	D	R	Y	G	D	L	D	V	E	L	S	K	A	K	Y	D	L	S	Q	V	P	R	F	G	R	S	C	T
<i>Callithrix jacchus</i>	V	C	N	N	G	Q	C	D	R	Y	G	D	L	D	I	E	L	S	K	A	K	Y	D	L	S	Q	V	P	R	F	G	R	S	C	T
<i>Mus musculus</i>	V	C	K	N	G	Q	C	D	R	Y	G	D	L	D	V	E	L	S	K	A	K	Y	D	L	S	Q	V	P	R	F	G	R	S	C	P
<i>Sciurus vulgaris</i>	V	C	N	N	G	Q	C	D	R	Y	G	D	L	D	V	E	L	S	K	A	K	Y	D	L	S	Q	V	P	R	F	G	R	S	C	T
<i>Sus domesticus</i>	V	C	S	N	G	Q	C	D	R	Y	G	D	L	D	V	E	L	S	K	A	K	Y	D	L	S	Q	V	P	R	F	G	R	S	C	T
<i>Tursiops truncatus</i>	V	C	N	N	G	Q	C	D	R	Y	G	D	L	D	V	E	L	S	K	A	K	Y	D	L	P	Q	V	P	R	F	G	R	S	C	T
<i>Equus caballus</i>	V	C	N	N	G	Q	C	D	R	Y	G	D	L	D	V	E	L	S	K	A	K	Y	D	L	S	Q	V	P	R	F	G	R	S	C	T
<i>Felis catus</i>	V	C	N	N	G	Q	C	D	R	Y	G	D	L	D	V	Q	L	S	K	A	K	Y	D	L	S	Q	V	P	R	F	G	R	S	C	T
<i>Erinaceus europaeus</i>	V	C	N	N	G	Q	C	D	R	Y	G	D	L	D	V	E	L	S	K	A	K	Y	D	L	S	Q	V	P	R	F	G	R	S	C	T
<i>Loxodonta africana</i>	V	C	N	N	G	Q	C	D	R	Y	G	D	L	D	V	E	L	S	K	A	K	Y	D	L	S	Q	V	P	R	F	G	R	S	C	S
<i>Trichechus manatus</i>	V	C	N	N	G	Q	C	D	R	Y	G	D	L	D	V	E	L	S	K	A	K	Y	D	L	S	Q	V	P	R	F	G	R	S	C	A
<i>Elephantulus edwardii</i>	V	C	N	N	G	Q	C	D	R	Y	G	D	L	D	V	E	L	S	K	A	K	Y	D	L	S	Q	V	P	R	F	G	R	S	C	T
<i>Dasyus novemcinctus</i>	V	C	N	N	G	Q	C	D	R	Y	G	D	L	D	V	E	L	S	K	A	K	Y	D	L	S	Q	V	P	R	F	G	R	S	C	T
<i>Monodelphis domestica</i>	V	C	N	N	G	Q	C	D	K	Y	G	D	L	D	V	E	L	S	K	A	R	Y	D	L	S	Q	V	P	R	F	G	R	C	S	A
<i>Gallus gallus</i>	V	C	N	S	G	Q	C	E	G	L	V	D	L	D	V	E	L	S	K	S	K	Y	D	L	S	Q	V	P							
<i>Meleagris gallopavo</i>	V	C	N	S	G	Q	C	E	G	L	V	D	L	D	V	E	L	S	K	S	K	Y	D	L	S	Q	V	P							
<i>Alligator mississippiensis</i>	V	C	S	N	G	Q	C	D	R	F	G	D	L	D	V	E	L	S	K	S	K	Y	D	L	S	Q	V	P	R	F	G	R	A	R	G
<i>Chelonia mydas</i>	V	C	N	S	G	Q	C	E	R	C	G	D	L	D	L	E	L	S	K	S	K	Y	D	L	S	Q	V	P	R	F	G	R	S	G	G
<i>Anolis carolinensis</i>	V	C	Q	N	G	Q	C	E	R	F	A	E	L	D	P	E	L	S	K	S	K	Y	E	L	S	Q	V	P	R	F	G	R	A	K	G
<i>Xenopus tropicalis</i>	V	C	N	N	G	L	C	G	K	Y	-	-	V	E	V	D	L	S	K	S	K	Y	D	L	S	Q	V	P	R	F	G	X	G	-	S
<i>Danio rerio</i>	V	C	R	S	G	Q	C	E	G	D	G	E	M	V	V	E	L	S	K	S	K	Y	D	L	S	Q	V	P	R	F	G	R	D	G	T
Группа подобия	V	C	n	n	G	q	C	g	d	6	d	L	S	K	4	Y	d	L	s	Q	V	P	r	f	g	r									

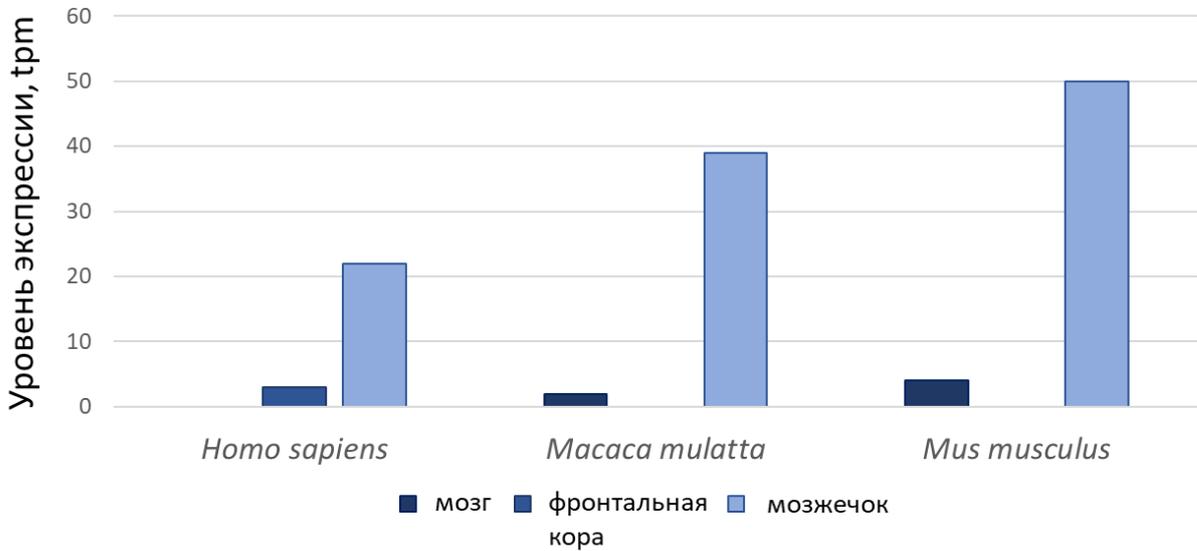
**Рисунок 18 Приложения.** Эволюционный анализ редких аминокислотных замен, найденных у пациента Q-IV-1 из семьи Q, исключённых из дальнейшего анализа ввиду несоответствия критериям отбора, но возможно имеющих минорный эффект на фенотип заболевания.



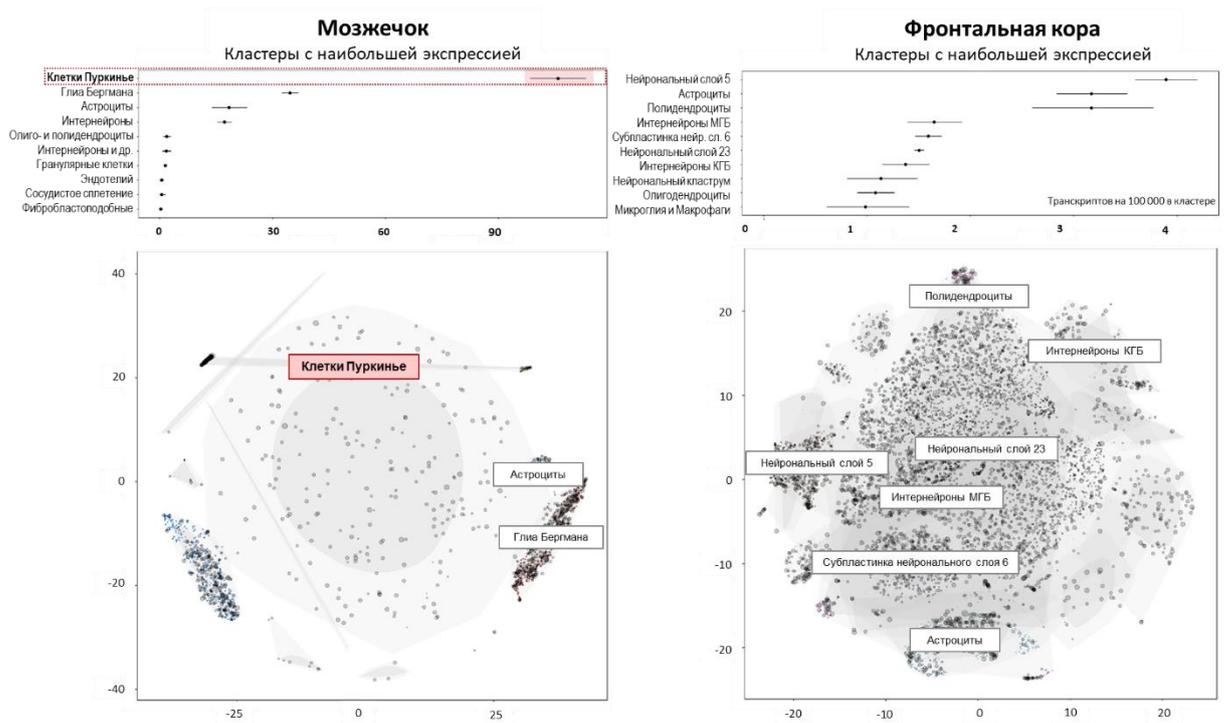
**Рисунок 19 Приложения.** Эволюционный анализ нонсенс варианта R22X в гене *COQ2*, найденного у пациента Q-IV-1 из семьи Q, исключённого из дальнейшего анализа. На рисунке показана низкая консервативность утраченной N-концевой области белка и наличие второго старт кодона (M2), позволяющего сохранить основной продукт гена.



**Рисунок 20 Приложения.** Экспрессия гена *GRID2* в различных областях мозга у *Homo sapiens* (BrainSpan [Miller et al., 2014]), визуализированная с помощью онлайн программы R2: Платформа анализа и визуализации геномики (<http://r2.amc.nl>).



**Рисунок 21 Приложения.** Экспрессия гена *GRID2* в мозжечке у трех видов млекопитающих (получено из данных экспрессии генов млекопитающих лаборатории Каессман и атласа экспрессии генов [Cardoso-Moreira et al., 2019]).



**Рисунок 22 Приложения.** Экспрессия в одиночных клетках гена *GRID2* в мозжечке и лобной коре взрослых мышей (получено из базы данных DropViz [Saunders et al., 2018]). МГБ – медиальный ганглионарный бугорок; КГБ – каудальный ганглионарный бугорок.