

Секвенирование нового поколения в диагностике заболеваний, сопровождающихся расстройствами движений

Н.Ю. Абрамычева*, Е.Ю. Федотова*, В.В. Устинова**, Я.И. Алексеев***

* ФГБНУ “Научный центр неврологии” (Москва)

** ЗАО “Синтол” (Москва)

*** ФГБНУ “ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии” (Москва)

Интенсивное развитие молекулярной биологии, биохимии, микроэлектроники в тесной связи с успехами компьютерной индустрии и биоинформатики привело к появлению качественно нового раздела медицинской науки — *молекулярной медицины*. Ее основные качества — персонализированный характер, высочайшая точность, профилактическая направленность. Достижения молекулярной медицины особенно значимы для наиболее распространенных и социально значимых заболеваний человека, в ряду которых всё более значимую роль сегодня играет многообразная нейродегенеративная патология, нередко сопровождающаяся расстройствами движений.

Следует отметить, что среди нейродегенеративных заболеваний значительную долю составляют поздние формы, манифестирующие у лиц пожилого возраста (болезнь Паркинсона, атипичный паркинсонизм, болезни двигательного нейрона, спиноцеребеллярные дегенерации и др.). Возраст-зависимый характер имеет большое значение при анализе эпидемиологии этих заболеваний, поскольку ведущей демографической тенденцией в большинстве развитых стран мира является неуклонное повышение доли лиц пожилого и старческого возраста. Так, каждый день около 200 тыс. человек на планете преодолевают 60-летний рубеж. Если в 1950 г. лишь 8% миро-

вого населения было в возрасте старше 60 лет, то в 2000 г. эта цифра составила 10% (в Российской Федерации — 18,5%), а к 2050 г. она, согласно прогнозам ООН, достигнет 21% (в Российской Федерации — 37,2%) [1, 40]. Ежегодно пожилое население мира увеличивается на 2%, что существенно опережает темпы роста населения вообще. Предполагается, что такая динамика сохранится по крайней мере в течение следующих 25 лет, а темпы ежегодного прироста пожилого населения достигнут 2,8% в 2025–2030 годах [40].

Современный уровень развития науки позволяет не только идентифицировать различные стадии и степень тяжести патологических процессов в центральной нервной системе (ЦНС) на фоне нормального старения мозга и в условиях возраст-зависимых заболеваний, но и выделять группы риска, проводить индивидуализированную профилактику и определять прогноз болезни. Именно на примере нейродегенеративных заболеваний, сопровождающихся двигательными расстройствами, наиболее рельефно могут быть представлены и реализованы на практике сегодняшние возможности превентивной молекулярной медицины. Центральное место в ней занимают генетическое тестирование и определение конкретных повреждений в том или ином гене, ведущих к нарушению функционирования мозга.

Генетическая гетерогенность и проблема поиска мутаций при нейродегенеративных заболеваниях с двигательными расстройствами

По данным López-Bigas et al. [28], примерно 14% идентифицированных генов человека обуславливают наследственные неврологические заболевания. Если принять во внимание, что общее число генов человека составляет около 22 тыс., то число генов, связанных с развитием заболеваний нервной системы, должно быть не менее 3000. На практике в неврологии мы сегодня имеем дело приблизительно с 1000–1200 генами, причем более трети из них относятся к нейродегенеративным заболеваниям.

Сложности в систематизации и молекулярной диагностике нейродегенеративных заболеваний, сопровождающихся двигательными расстройствами, обусловлены их выраженной генетической гетерогенностью [17, 33]. Наиболее яркие примеры такой гетерогенности представлены в таблице. Из таблицы видно, что (по состоянию на середину 2016 г.) известны уже 76 генов наследственных спастических параличей, 43 гена аутосомно-доминантных спиноцеребеллярных атаксий, более 60 генов аутосомно-рецессивных атаксий, 23 гена первичных дистоний, 20 генов болезни Паркинсона и т.д. [2, 14, 23, 25, 26]. Очевидно, что разобраться в этом кажущемся “хаосе” генов, упорядочить его и построить разумные алгоритмы ДНК-диагностики можно только с помощью новых высокоинформативных молекулярно-генетических методов.

Совсем запутанной становится ситуация, когда различные мутации в одном гене могут приводить к развитию совершенно различных клинических синдромов, квалифицируемых как самостоятельные заболевания. Например, различные по своему характеру мутации в гене кальциевого канала на 19-й хромосоме ответственны за развитие трех самостоятельных форм аутосомно-доминантных наследственных заболеваний нервной системы — прогрессирующей дегенерации

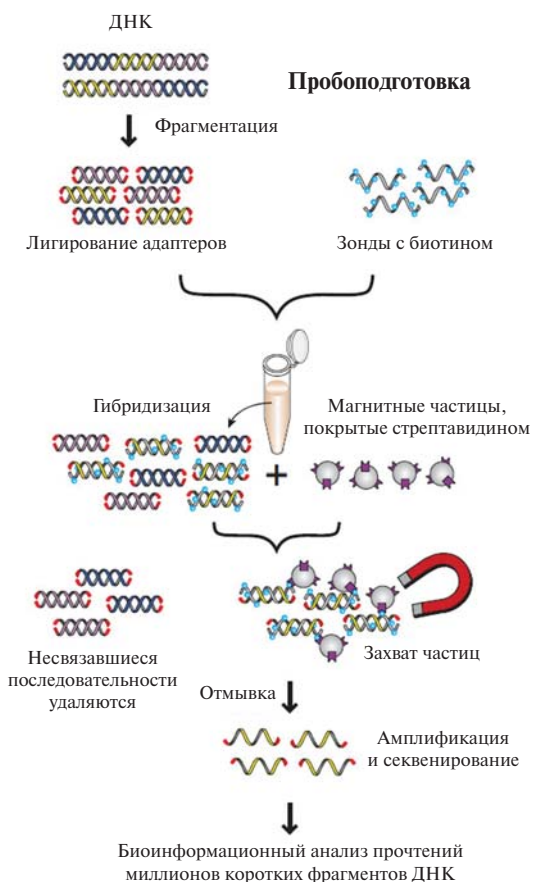
Генетическая гетерогенность нейродегенеративных заболеваний, сопровождающихся двигательными расстройствами

Заболевания	Число генов
Наследственные спастические параличи	76
Аутосомно-доминантные атаксии	43
Аутосомно-рецессивные атаксии	>60
Первичные дистонии	23
Болезнь Паркинсона	20
Нейродегенерации с накоплением железа в головном мозге	6
Формы первичной хорей	6
Эссенциальный тремор	4
Синдром Ретта	3

мозжечка, пароксизмальной атаксии и гемиплегической мигрени [37]. Еще более впечатляющий пример такой дивергенции — заболевания, связанные с мутациями гена ламина А (*LMNA*): к настоящему времени показано, что мутации *LMNA* являются этиологическим фактором 11 (!) самостоятельных нозологических форм, входящих в состав пяти групп наследственных болезней — прогрессирующих мышечных дистрофий, наследственных невропатий, кардиомиопатий, липодистрофий, синдромов преждевременного старения [39]. Разумеется, при диагностике таких заболеваний использование надежных и высокопроизводительных технологий ДНК-скрининга носит решающий характер.

При наличии столь внушительного генетического разнообразия заболеваний нервной системы молекулярно-генетическая диагностика уже не может, как это было ранее, базироваться на простом последовательном скрининге доступных для анализа генов — в этом случае поиск мутаций может оказаться слишком длительным и необоснованно дорогостоящим процессом. Так, Научным центром неврологии совместно с рядом других учреждений проведен систематический поиск генетических основ наиболее частых нейродегенеративных заболеваний в российской популяции (паркинсонизм, первичная дистония, эссен-





Принцип NGS.

генов, что создает новую реальность в клинической медицине.

Общие принципы секвенирования следующего поколения

Секвенирование следующего поколения (Next Generation Sequencing, NGS) – технологическая разработка 2009–2015 годов [12, 29, 41]. Синонимы NGS – *высокопроизводительное секвенирование* и *широкоформатное параллельное секвенирование*. В противоположность классическому сэнгеровскому секвенированию первого поколения, которое требует многих недель (иногда месяцев, в зависимости от размеров и структуры гена) и значительных затрат для установления больших нуклеотидных последовательностей, производительность NGS является беспрецедентной и измеряется **миллиардами нуклеотидов**. В результате за один рабочий цикл может быть обеспечено 20–30-кратное покрытие всего человеческого генома. Ничего подобного ранее наука не знала.

Технология NGS (рисунок) основана на создании библиотек фрагментов ДНК и одновременном параллельном прочтении нескольких миллионов таких коротких фрагментов с последующим биоинформационным анализом.

Известны три основных стратегии применения технологии NGS на практике [38]:

- панельное секвенирование;
- полноэкзомное секвенирование;
- полногеномное секвенирование.

Панельное секвенирование – это NGS-анализ генов, собранных в мультигенные панели. При чрезвычайно высокой гетерогенности основных групп нейродегенеративных заболеваний и значительном перекрытии клинических проявлений десятков генетических форм двигательных расстройств в рамках одной группы удачным решением проблемы является параллельное секвенирование всех известных генов, имеющих отношение именно к исследуемому фенотипу – паркинсониз-

циальный тремор, спиноцеребеллярные атаксии, полиглутаминовые заболевания и др.) [4, 5, 9, 18–22, 24, 34, 36]. Параллельно были разработаны этические принципы ДНК-диагностики, предложены новые биомаркеры пресимптомной стадии и новые модели нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся двигательными расстройствами [3, 7, 8, 31]. Однако эти исследования заняли около 20 лет и оставили более 40% моногенных синдромов без точного молекулярного диагноза.

Решением проблемы стала разработка в последние годы новейших высокопроизводительных молекулярно-генетических технологий, делающих возможным получение быстрой информации об огромном числе нуклеотидных вариантов в сотнях и тысячах

му, атаксии, дистонии и т.п. Таким образом, панельное секвенирование является целенаправленной, адресной разновидностью NGS и представляет собой пример *таргетного* генетического анализа [11]. Панели для NGS-анализа могут включать от 15–20 до нескольких сотен генов.

У панельного секвенирования есть ряд преимуществ по сравнению с другими подходами NGS. Глубина покрытия (т.е. число раз, которые каждый нуклеотид будет прочитан в процессе секвенирования) для генов, входящих в панель, больше аналогичного показателя при полногеномном и полноэкзомном анализе. Поэтому риск “пропуска” мутаций при панельном секвенировании ниже, а общая диагностическая чувствительность — выше [32, 38]. Поскольку любая панель сфокусирована на конкретном синдромальном показании, случайные результаты при таком подходе маловероятны. К тому же стоимость панельного секвенирования уже сегодня вполне сопоставима с рядом стандартных высокотехнологических неврологических обследований. Очевидные недостатки панельного NGS-секвенирования — ограничение возможностей диагностики только набором исследуемых генов и вариабельность этого набора от лаборатории к лаборатории в зависимости от применяемой панели. NGS-панели, как правило, быстро выходят из употребления по мере открытия новых генов или выявления у “непрофильных” заболеваний атипичных симптомов, пересекающихся с показаниями к использованию той или иной панели.

Полноэкзомное секвенирование представляет собой определение нуклеотидного состава *экзома*, т.е. совокупности экзонов — кодирующих областей ДНК. Генные последовательности, кодирующие синтез белков, составляют всего лишь ~1% человеческого генома, но при этом содержат около 85% всех мутаций, вызывающих менделирующие заболевания [2]. Поэтому полноэкзомное исследование весьма привлекательно с клинических позиций: метод не ограничен каким-либо мультигенным набором и способен обеспечить инфор-

мативное секвенирование кодирующей части большинства из 22 000 известных генов человека. В целом, диагностический успех полноэкзомного анализа в выявлении каузальных мутаций у пациентов с генетическими заболеваниями составляет от 22 до 31% [27, 42].

Полноэкзомное секвенирование является центральным на сегодняшний день инструментом для высокопроизводительного мутационного скрининга генов редких заболеваний. О его роли в современной медицинской генетике свидетельствует всё шире используемый термин “клиническое полноэкзомное секвенирование”, подчеркивающий прикладную диагностическую направленность метода. Среди ярких примеров успешного применения полноэкзомного анализа при нейродегенеративных заболеваниях с двигательными расстройствами можно назвать идентификацию более 20 новых генов наследственных спастических параплегий [30], нескольких генов болезни Паркинсона [15] и т.д. Недостатки полноэкзомного анализа — достаточно высокая стоимость (около 1500–2000 долл. США для одного образца и 4000–5000 долл. США для семьи из трех человек) и более низкая чувствительность по сравнению с панельным секвенированием. При проведении полноэкзомного анализа велика вероятность выявления случайных генетических вариантов (“находок”), которые потенциально могут быть значимы для самых разных заболеваний, но их трактовка обычно бывает чрезвычайно затруднена.

Полногеномное секвенирование является наиболее затратным и предполагает определение всех нуклеотидных последовательностей в кодирующих и некодирующих областях. Его очевидное преимущество заключается в возможности обнаружения мутаций в любых регуляторных и вспомогательных участках гена, которые обычно выпадают из поля зрения специалистов, занимающихся практической ДНК-диагностикой. Полногеномный анализ по сравнению с полноэкзомным обеспечивает более равномерное покрытие, поэтому некоторые мутации, отсутствующие в

экзомных данных, могут быть выявлены при полногеномном скрининге [38]. Очевидные недостатки полногеномного анализа – чрезвычайная сложность биоинформационной составляющей, большой выход случайных потенциально значимых мутаций, не связанных с проводимым диагностическим поиском, а также высокая стоимость (как минимум до 3000–5000 долл. США на геном). При этом следует отметить, что существенное удешевление метода прогнозируется уже в ближайшие 3 года.

Интересно, что использование полногеномного и полноэкзомного анализа может приводить к постановке двух и более молекулярных диагнозов у одного и того же пациента, особенно в сложных и длительное время недиагностированных случаях. Так, согласно некоторым оценкам, по итогам NGS двойной диагноз может быть выставлен примерно у 7% обследуемых пациентов с неясной и/или редкой клинической картиной [13].

Собственные данные

В нейрогенетическом отделении Научного центра неврологии за последние 3 года получен опыт участия в применении и оценке результатов NGS и других высокопроизводительных молекулярно-генетических технологий при нейродегенеративных заболеваниях, характеризующихся двигательными расстройствами. В результате впервые в российской популяции выявлены редкие формы нейродегенеративных заболеваний с идентифицированными мутациями в генах *ITPR1* (спиноцеребеллярная атаксия 15-го типа), *DDHD1* (наследственная спастическая параплегия 28-го типа), *C19ORF12* (нейродегенерации с накоплением железа в мозге 4-го типа), *THAP1* (DYT6-форма первичной дистонии) и др. [6, 35]. С 2015 г. в рамках Федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы” Научным центром неврологии совместно с компанией “Синтол” прово-

дится разработка оригинальной диагностической NGS-панели (платформа Illumina MiSeq) для ранней диагностики и профилактики нейродегенеративных заболеваний. Панель направлена на секвенирование кодирующей области **298 генов** социально значимых нейродегенеративных заболеваний ЦНС, проявляющихся двигательными и когнитивными расстройствами, в том числе:

- спиноцеребеллярные атаксии – 136 генов;
- спастические параплегии – 43 гена;
- деменции – 23 гена;
- лейкодистрофии и лейкоэнцефалопатии – 22 гена;
- паркинсонизм – 20 генов;
- боковой амиотрофический склероз – 20 генов;
- дистонии – 16 генов;
- нейродегенерации с накоплением железа в мозге – 6 генов;
- хорее – 5 генов;
- эссенциальный тремор – 4 гена;
- болезнь Фара – 3 гена.

Уже в результате первых циклов использования созданной NGS-панели на платформе Illumina MiSeq при анализе серии случаев нейродегенеративных заболеваний с двигательными и/или когнитивными расстройствами, для которых молекулярный дефект не был установлен ранее с помощью традиционных ДНК-методик, нами были выявлены (и подтверждены с помощью прямого секвенирования) мутации в генах:

- *SPTBN2* (спиноцеребеллярная атаксия 5-го типа);
- *PINK1* (PARK7-форма аутосомно-рецессивного паркинсонизма);
- *GRN*, *AGER*, *NOTCH3* (различные формы первичных деменций);
- *NPCI* (болезнь Ниманна–Пика, тип С).

Наш первый опыт панельного скрининга большой серии диагностически неясных случаев нейродегенеративных заболеваний, проявляющихся двигательными и когнитивными расстройствами, показал, что выявление и последующее подтверждение мутаций в различных генах возможно более чем в 25–30%

обследуемых случаев. Принимая во внимание, что ориентировочная стоимость применения данной диагностической панели для одного пациента составляет около 18 000 руб., можно сделать вывод об экономической оправданности дальнейшей разработки и практического внедрения данной панели при обследовании пациентов с возраст-зависимыми нейродегенеративными заболеваниями.

Как всякий новый, бурно развивающийся метод, высокопроизводительное секвенирование ставит перед исследователями серьезные вызовы, требующие ответа. Сложной проблемой является интерпретация большого числа генетических вариантов (полиморфизмов, мутаций), которые могут быть выявлены в результате применения полногеномного и полноэкзомного форматов NGS. В зависимости от разновидности методики обычное число вариантов составляет от 20 000 до 50 000 на геном, причем даже после жесткой выбраковки остаются от 150 до 500 редких несинонимичных нуклеотидных замен или мутаций в сплайсинговых областях, которые могут рассматриваться как потенциально патогенные [41]. Для интерпретации обнаруживаемых генетических вариантов применяют множество взаимодополняющих подходов – специальные биоинформационные фильтры, программы для оценки патогенности нуклеотидных замен, компьютерные базы данных для мутаций (полиморфизмов) и референсных геномов, оценку сегрегации в семье, функциональный анализ и т.д.

Внедрение в практику технологий NGS привело к появлению и новых этических проблем, ждущих своего решения. Одна из них, о которой уже упоминалось выше, – случайная идентификация неблагоприятных генетических вариантов, не связанных с целью проводимого анализа. Готов ли человек, решающий вполне конкретную диагностическую задачу, узнать “по ходу дела” результаты сложного мультигеномного профилирования, до определенной степени предсказывающего его судьбу? Поскольку для большинства генетических маркеров предиктивная сила на сегодняшний

день весьма невелика, такая информация может оказаться преждевременной и, более того, неблагоприятной с психологической точки зрения. Общая практика здесь состоит в том, что тестируемый должен заранее определиться, желает ли он быть информирован о подобных “находках” [10]. Интересна рекомендация Американского колледжа медицинской генетики и геномики (ACMG): пациенту в качестве опции перед началом NGS-анализа предлагается узнать результаты типирования 56 “значимых” (“действенных”) генов, мутации в которых повышают риск серьезных, но при этом курабельных заболеваний – наследственных форм рака, наследственных аритмий и т.д. [16]. В этом случае доведение “избыточной” информации до тестируемого лица имеет очевидную профилактическую перспективу и представляется оправданным. К числу этических и правовых проблем, возникающих в эпоху NGS, относятся сохранение конфиденциальности результатов геномного профилирования большого числа людей при длительном хранении, а также необходимость адекватного, бережного распоряжения этим уникальным массивом персональных данных со стороны сотрудников лаборатории. Очевидно, что эта задача должна решаться законодательно.

Необходимо подчеркнуть, что практическое внедрение технологий NGS требует повсеместного введения новой специальности в лабораторной медицине – генетической биоинформатики.

Таким образом, результаты применения NGS и других инновационных технологий свидетельствуют о том, что принципы геном-ориентированной персонализированной медицины постепенно занимают всё более значительное место в современной клинической неврологии. Это в полной мере соответствует долгосрочному вектору развития различных областей медицины в постиндустриальную эпоху. В силу того, что рассмотренные разработки носят комплексный характер, для их решения необходимы подготовка и привлечение специалистов из разных областей – вра-

чей (клиницистов и специалистов в области лабораторной диагностики), молекулярных биологов, генетиков, биоинформатиков. В настоящее время компании-лидеры как в России, так и за рубежом ведут эти разработки в тандемах с профильными специализированными научно-исследовательскими организациями. Полученный совместный опыт должен стать основой для широкого внедрения методов NGS в медицинских центрах и лабораториях страны.

Работа проведена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60714X0094).

Список литературы

1. Гонтмахер Е.М. Проблема старения населения в России // *Мировая экономика и международные отношения*. 2012. № 1. С. 22–29.
2. Иллариошкин С.Н., Абрамычева Н.Ю., Иванова-Смоленская И.А. Молекулярно-генетическая диагностика заболеваний нервной системы // *Неврология XXI века: диагностические, лечебные и исследовательские технологии: Руководство для врачей*. В 3-х т. / Под ред. М.А. Пирадова, С.Н. Иллариошкина, М.М. Танашия. Т. I. Современные технологии диагностики заболеваний нервной системы. М.: АТМО, 2015. С. 329–362.
3. Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Лимборская С.А. и др. Пресимптомная ДНК-диагностика спиноцереbellарной атаксии 1-го типа // *Генетика*. 1997. № 5. С. 693–698.
4. Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д. Новый механизм мутации у человека: экспансия тринуклеотидных повторов // *Генетика*. 1995. № 31. С. 1478–1489.
5. Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д. и др. Молекулярно-генетический анализ наследственных нейродегенеративных заболеваний // *Генетика*. 2004. № 6. С. 816–826.
6. Ключников С.А., Абрамычева Н.Ю., Федотова Е.Ю. и др. Применение технологий секвенирования нового поколения в диагностике наследственных нейродегенеративных заболеваний // *Актуальные проблемы современной неврологии и психиатрии*. СПб., 2015. С. 50–53.
7. Ключников С.А., Иванова-Смоленская И.А., Никольская Н.Н. и др. Этические проблемы медико-генетического консультирования на примере хорей Гентингтона // *Рос. мед. журн*. 2000. № 2. С. 32–36.
8. Некрасов Е.Д., Лебедева О.С., Васина Е.М. и др. Платформа для изучения болезни Гентингтона на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2012. № 4. С. 30–35.
9. Платонов Ф.А., Иллариошкин С.Н., Кононова С.К. и др. Спиноцереbellарная атаксия первого типа в Якутии: распространенность и клинико-генетические сопоставления // *Мед. генетика*. 2004. № 5. С. 242–248.
10. Boycott K., Hartley T., Adam S. et al. The clinical application of genome-wide sequencing for monogenic diseases in Canada: position statement of the Canada College of Medical Geneticists // *J. Med. Genet*. 2015. V. 52. P. 431–437.
11. de Koning T.J., Jongbloed J.D., Sikkema-Raddatz B., Sinke R.J. Targeted next-generation sequencing panels for monogenic disorders in clinical diagnostics: the opportunities and challenges // *Expert Rev. Mol. Diagn*. 2015. V. 15. P. 61–70.
12. Erdmann J. Next generation technology edges genome sequencing toward the clinic // *Chem. Biol*. 2010. V. 18. P. 1513–1514.
13. Farwell K.D., Shahmirzadi L., El-Khechen D. et al. Enhanced utility of family-centered diagnostic exome sequencing with inheritance model-based analysis: results from 500 unselected families with undiagnosed genetic conditions // *Genet. Med*. 2015. V. 17. P. 578–586.
14. Fogel B.L., Lee H., Deignan J.L. Exome sequencing in the clinical diagnosis of sporadic or familial cerebellar ataxia // *JAMA Neurol*. 2014. V. 71. P. 1237–1246.
15. Foo J.-N., Liu J.-J., Tan E.-K. Whole-genome and whole-exome sequencing in neurological diseases // *Nat. Rev. Neurol*. 2012. V. 8. P. 508–517.
16. Green R.C., Berg J.S., Grody W.W. et al. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing // *Genet. Med*. 2013. V. 15. P. 565–574.
17. Hershenson J., Haworth A., Houlden H. The inherited ataxias: genetic heterogeneity, mutation databases, and future directions in

- research and clinical diagnostics // *Hum. Mutat.* 2012. V. 33. P. 1324–1332.
18. Illarioshkin S.N., Bagieva G.Kh., Klyushnikov S.A. et al. Different phenotypes of Friedreich's ataxia within one 'pseudo-dominant' genealogy: relationships between trinucleotide (GAA) repeat lengths and clinical features // *Eur. J. Neurol.* 2000. V. 7. P. 535–540.
 19. Illarioshkin S.N., Ivanova-Smolenskaya I.A., Markova E.D. et al. Molecular genetic analysis of essential tremor // *Rus. J. Genetics.* 2002. V. 38. P. 1447–1451.
 20. Illarioshkin S.N., Markova E.D., Slominsky P.A. et al. The GTP cyclohydrolase I gene in Russian families with dopa-responsive dystonia // *Arch. Neurol.* 1998. V. 55. P. 789–792.
 21. Illarioshkin S.N., Tanaka H., Tsuji S. et al. Refined genetic location of the chromosome 2p-linked progressive muscular dystrophy gene // *Genomics.* 1997. V. 42. P. 345–348.
 22. Illarioshkin S.N., Zagorovskaya T.B., Markova E.D. et al. Mutation analysis of the *parkin* gene in Russian families with autosomal recessive juvenile parkinsonism // *Mov. Disord.* 2003. V. 18. P. 914–919.
 23. International Parkinson Disease Genomics Consortium. Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies // *Lancet.* 2011. V. 377. P. 641–649.
 24. Ivanova-Smolenskaya I.A., Ovchinnikov I.V., Karabanov A.V. et al. The His1069Gln mutation in the *ATP7B* gene in Russian patients with Wilson disease // *J. Med. Genet.* 1999. V. 36. P. 174.
 25. Kara E., Tucci A., Manzoni C. et al. Genetic and phenotypic characterization of complex hereditary spastic paraplegia // *Brain.* 2016. V. 139. P. 1904–1918.
 26. Klebe S., Stevanin G., Depienne C. Clinical and genetic heterogeneity in hereditary spastic paraplegias: from SPG1 to SPG72 and still counting // *Rev. Neurol.* 2015. V. 171. P. 505–530.
 27. Lee H., Deignan J.L., Dorrani N. et al. Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders // *JAMA.* 2014. V. 312. P. 1880–1887.
 28. López-Bigas N., Blencowe B.J., Ouzounis C.A. Highly consistent patterns for inherited human diseases at the molecular level // *Bioinformatics.* 2005. V. 22. P. 269–277.
 29. Metzker M.L. Sequencing technologies – the next generation // *Nat. Rev. Genet.* 2010. V. 11. P. 31–46.
 30. Novarino G., Fenstermaker A.G., Zaki M.S. et al. Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders // *Science.* 2014. V. 343. P. 506–511.
 31. Ponomareva N., Klyushnikov S., Abramychyeva N. et al. Alpha-theta border EEG abnormalities in preclinical Huntington's disease // *J. Neurol. Sci.* 2014. V. 344. P. 114–120.
 32. Saudi Mendeliome Group. Comprehensive gene panels provide advantages over clinical exome sequencing for Mendelian diseases // *Genome Biol.* 2015. V. 16. P. 134.
 33. Schneider S.A., Schneider U.H., Klein C. Genetic testing for neurologic disorders // *Semin. Neurol.* 2011. V. 31. P. 542–552.
 34. Shadrina M.I., Semenova E.V., Slominsky P.A. et al. Effective quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of the *parkin* gene (*PARK2*) exon 1–12 dosage // *BMC Med. Genet.* 2007. V. 8. P. 6.
 35. Shadrina M.I., Shulskaya M.V., Klyushnikov S.A. et al. *ITPR1* gene p.Val1553Met mutation in Russian family with mild Spinocerebellar ataxia // *Cerebellum Ataxias.* 2016. V. 3. P. 2.
 36. Slominsky P.A., Markova E.D., Shadrina M.I. et al. A common 3-bp deletion in the *DYT1* gene in Russian families with early-onset torsion dystonia // *Human Mutation.* 1999. V. 14. P. 269.
 37. Tournier-Lasserre E. *CACNA1A* mutations: hemiplegic migraine, episodic ataxia type 2, and the others // *Neurology.* 1999. V. 53. P. 3–4.
 38. Warman Chardon J., Beaulieu C., Hartley T. et al. Axons to exons: the molecular diagnosis of rare neurological diseases by next-generation sequencing // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2015. V. 15. P. 584–592.
 39. Wilkie G.S., Schirmer E.C. Guilt by association. The nuclear envelope proteome and disease // *Mol. Cell. Proteomics.* 2006. V. 5. P. 1865–1875.
 40. World Population Prospects. United Nations. N.Y., 2001.
 41. Xue Y., Ankala A., Wilcox W.R., Hegde M.R. Solving the molecular diagnostic testing conundrum for Mendelian disorders in the era of next-generation sequencing: single-gene, gene panel, or exome/genome sequencing // *Genet. Med.* 2015. V. 17. P. 444–451.
 42. Yang Y., Muzny D.M., Xia F. et al. Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing // *JAMA.* 2014. V. 312. P. 1870–1879.