

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

ТИХОМИР ПЪРВАНОВ ТОДОРОВ

МОЛЕКУЛНИ ОСНОВИ НА СИНДРОМИ С УМСТВЕНО
ИЗОСТАВАНЕ В БЪЛГАРИЯ

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен
„ДОКТОР”

Научна специалност: „Биохимия”

Шифър: 01.06.10

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:

Проф. Д-р Ваньо Митев, ДМ, ДБН

София, 2011

Дисертационният труд съдържа 161 страници,
54 фигури и 23 таблици.

Цитирани са 164 литературни източника и 19 интернет сайта.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита
от Катедра по Медицинска Химия и Биохимия,
Медицински Университет – София.

Включените в дисертацията изследвания са извършени в:
Катедра по Медицинска Химия и Биохимия,
Медицински Университет – София;

Генетична Медико-Диагностична Лаборатория „Геника”, София

Работата по дисертационния труд е финансирана частично
от Съвета за медицинска наука
на Медицински Университет – София
(Договори 8-Д/2008 и 27/2009).

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

FXS – Fragile X syndrome

FRAXA (FraXA) – Fragile X syndrome A

FRAXE (FraXE) – Fragile X syndrome E

RTT – Rett syndrome

PWS – Prader-Willi syndrome

AS – Angelman syndrome

MDS – Microdeletion syndromes, микроделеционни синдроми

WBS – Williams-Beuren syndrome

WHS – Wolf-Hirschhorn syndrome

DGS – DiGeorge syndrome

UPD – Uniparental disomy

ISSX1, ISSX2 - X-linked dominant infantile spasm syndrome-1 and 2

FMR1 – Fragile X mental retardation 1 gene

FMR2 – Fragile X mental retardation 2 gene

FMRP – Fragile X mental retardation protein

ARX – Aristaless X

MECP2 – Methyl-CpG-binding protein 2 gene

MeCP2 – Methyl-CpG-binding protein 2

CDKL5 – Cyclin-dependent kinase like 5 gene

FOXP1 - Forkhead G1 gene

SNRPN – Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N gene

UBE3A - Ubiquitin-protein ligase E3A gene

MLPA - Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification

MS-MLPA - Methylation Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

РНК – рибонуклеинова киселина

PCR/ПВР – Polymerase chain reaction, полимеразна верижна реакция

MS-PCR – Methylation specific PCR

кб – килобази

бд/bp – базови двойки, base pair

СЪДЪРЖАНИЕ		Стр.
РЕЗЮМЕ		1
SUMMARY		3
ВЪВЕДЕНИЕ		5
1.	ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	8
1.1.	КЛИНИЧНА КАРТИНА НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ СИНДРОМИ	8
1.1.1.	СИНДРОМ НА ЧУПЛИВА X ХРОМОЗОМА	8
1.1.2.	СИНДРОМ НА RETT	9
1.1.3.	СИНДРОМ НА PRADER-WILLI	11
1.1.4.	СИНДРОМ НА ANGELMAN	12
1.1.5.	МИКРОДЕЛЕЦИОННИ СИНДРОМИ	13
1.1.5.1.	Williams-Beuren синдром	13
1.1.5.2.	Wolf-Hirschhorn синдром	14
1.2.	МОЛЕКУЛНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ СИНДРОМИ	14
1.2.1.	СИНДРОМ НА ЧУПЛИВА X ХРОМОЗОМА	14
1.2.2.	СИНДРОМ НА RETT	18
1.2.3.	СИНДРОМИ НА PRADER-WILLI/ANGELMAN	22
1.2.4.	МИКРОДЕЛЕЦИОННИ СИНДРОМИ	24
1.2.4.1.	Williams-Beuren синдром	24
1.2.4.2.	Wolf-Hirschhorn синдром	26
1.3.	ПРЕГЛЕД НА МЕТОДИТЕ ЗА ДИАГНОСТИКА НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ СИНДРОМИ	28
1.3.1.	МЕТОДИ ЗА ДИАГНОСТИКА НА СИНДРОМ НА ЧУПЛИВА X ХРОМОЗОМА	28
1.3.2.	МЕТОДИ ЗА ДИАГНОСТИКА НА СИНДРОМ НА RETT	35
1.3.3.	МЕТОДИ ЗА ДИАГНОСТИКА НА СИНДРОМИ НА PRADER-WILLI/ANGELMAN	38
1.3.4.	МЕТОДИ ЗА ДИАГНОСТИКА НА МИКРОДЕЛЕЦИОННИ СИНДРОМИ	41
1.4.	ОБОБЩЕНИЕ НА ЛИТЕРАТУРНИТЕ ДАННИ	43
2.	ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	46
2.1.	ЦЕЛ	46
2.2.	ЗАДАЧИ	46
3.	МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	48
3.1.	МАТЕРИАЛИ	48
3.1.1.	КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ	48
3.1.2.	БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ	49
3.2.	МЕТОДИ	50
3.2.1.	ПРЕДАНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА МАТЕРИАЛА	50

3.2.1.1.	Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв по солевия метод	50
3.2.1.2.	Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна, капилярна кръв, букална лигавица или от фетални клетки по фенол-хлороформен метод	51
3.2.1.3.	Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв чрез кит	52
3.2.1.4.	Бисулфитно конвертиране на ДНК	52
3.3.	АНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА МАТЕРИАЛА	54
3.3.1.	ПОЛИМЕРАЗНА ВЕРИЖНА РЕАКЦИЯ	54
3.3.2.	ЕЛЕКТРОФОРЕЗА В АГАРОЗЕН ГЕЛ	63
3.3.3.	ПРОТОКОЛ ЗА ИЗОЛИРАНЕ НА АМЛИФИЦИРАНИТЕ ФРАГМЕНТИ ОТ АГАРОЗЕН ГЕЛ	64
3.3.4.	ЕЛЕКТРОФОРЕЗА ЗА ФРАГМЕНТЕН АНАЛИЗ НА АВТОМАТИЧЕН СЕКВЕНАТОР	65
3.3.5.	ЕЛЕКТРОФОРЕЗА В ДЕНАТУРИРАЩ АКРИЛАМИДЕН ГЕЛ, SOUTHERN ТРАНСФЕР И ХИБРИДИЗАЦИЯ	66
3.3.6.	ДИРЕКТНО СЕКВЕНИРАНЕ ПО SANGER	69
3.3.7.	МУЛТИПЛЕКСА ЛИГАЗНО ЗАВИСИМА АМПЛИФИКАЦИЯ, МЛРА	73
3.3.8.	МАТЕМАТИЧЕСКИ АЛГОРИТЪМ ЗА КОЛИЧЕСТВЕНА ОЦЕНКА НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ	75
3.3.9.	СПЕЦИФИЧЕН ПО ОТНОШЕНИЕ НА МЕТИЛИРАНЕТО МЛРА АНАЛИЗ	75
4.	РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	79
4.1.	СИНДРОМ НА ЧУПЛИВА X ХРОМОЗОМА	79
4.1.1.	КЛИНИЧНИ СИМПТОМИ	79
4.1.2.	ЛАБОРАТОРНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ	80
4.1.3.	МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ	80
4.1.4.	РЕЗУЛТАТИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНАТА ГРУПА МОМЧЕТА	85
4.1.5.	ДОПЪЛНИТЕЛНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ПРИ ГЕНЕТИЧНО НЕИЗЯСНЕНИТЕ ПАЦИЕНТИ	94
4.2.	СИНДРОМ НА RETT	96
4.2.1.	КЛИНИЧНИ СИМПТОМИ	96
4.2.2.	ЛАБОРАТОРНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ	97
4.2.3.	МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ	97
4.2.4.	РЕЗУЛТАТИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНАТА ГРУПА МОМИЧЕТА С RETT СИНДРОМ	100
4.2.5.	ДОПЪЛНИТЕЛНИ ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИТЕ С НЕИЗЯСНЕНИ МУТАЦИИ	115
4.3.	СИНДРОМИ НА PRADER-WILLI/ANGELMAN	116
4.3.1.	КЛИНИЧНИ СИМПТОМИ	116
4.3.2.	ЛАБОРАТОРНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ	117
4.3.3.	МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ	117
4.3.4.	РЕЗУЛТАТИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНАТА ГРУПА ПАЦИЕНТИ С ДИАГНОЗА PRADER-WILLI/ANGELMAN СИНДРОМ	121
4.3.5.	ДОПЪЛНИТЕЛНИ ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИТЕ С НЕИЗЯСНЕНИ МУТАЦИИ	126

4.4.	МИКРОДЕЛЕЦИОННИ СИНДРОМИ	126
4.4.1.	КЛИНИЧНИ СИМПТОМИ	126
4.4.2.	ЛАБОРАТОРНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ	127
4.4.3.	МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ	127
4.4.4.	РЕЗУЛТАТИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПАЦИЕНТИ С ПРЕДПОЛАГАЕМА ДИАГНОЗА МИКРОДЕЛЕЦИОННИ СИНДРОМИ	128
5.	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	132
6.	ИЗВОДИ	135
7.	БИБЛИОГРАФИЯ	137
7.1.	БЪЛГАРСКА ЛИТЕРАТУРА	137
7.2.	ЧУЖДООЗИЧНА ЛИТЕРАТУРА	137
7.3.	ИНТЕРНЕТ САЙТОВЕ	156
8.	ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ	158
9.	ПРИНОСИ	161

РЕЗЮМЕ

Най-честата форма на X-свързано умствено изоставане е синдромът на чуплива X хромозома, Fragile X mental retardation syndrome (FXS), който се дължи на експанзия на нестабилен CGG повтор в 5'UTR на гена FMR1 (fragile X mental retardation 1). Една от най-честите форми на тежко умствено изоставане при момичета е Rett синдром (RTT), който основно се дължи основно на *de novo* възникнали точкови мутации или големи делеции в MECP2 (methyl-CpG binding protein 2) гена. Мутации в автозомни гени, които водят до подобни на горните клинични симптоми, причиняват Prader-Willi/Angelman синдроми (PWS/AS). Те се дължат на делеция в хромозомния регион 15q11-q13 или унипарентна дизомия (uniparental disomy, UPD) 15. В допълнение, голям брой делеции по дължината на различни хромозоми и гени се оказаха асоциирани с умствено изоставане и причиняват т.нар. микроделеционни синдроми (microdeletion syndromes, MDS).

В настоящата работа бяха извършени молекулярно-генетични изследвания при 90 пациента с умствено изоставане: FXS (n=32), RTT (n=38), PWS/AS (n=16) и MDS (n=4; 2 Williams Beuren синдром (WBS), 1 DiGeorge синдром (DGS) и 1 Wolf-Hirschhorn синдром (WHS). В групата на пациентите с FXS бяха открити само 4 мутации в FMR1 гена (12,5%). Сред пациентите с RTT синдром бяха доказани 12 мутации (31,6%) в MECP2 гена. В групата на PWS/AS бяха установени 9 патологични изменения в 15q11-q13 региона (56,25%). Проведеният MLPA анализ в групата на MDS доведе до 3 генетично верифицирани случая (2 WBS и 1 WHS) от общо 4 изследвани пациента (75%). Бяха изяснени молекулните дефекти при 31% от изследваните пациенти. Основни приноси на настоящето проучване са разработените и оптимизирани за рутинно диагностично изпълнение методи за молекулярно-генетичен анализ на синдроми с умствено изоставане. Бяха открити уникално комплексно мутационно събитие – двоен indel в MECP2 гена и непубликувана 4 нд инсерция в MECP2 гена. На молекулярно ниво бяха охарактеризирани 31% от изследваните пациенти.

SUMMARY

Mental retardation is observed in a broad spectrum of syndromes and in nonsyndromic variant and represents clinically and genetically highly heterogeneous group of disorders. Delay in mental development and absent speech may be the only clinical finding, or may be associated with progressive neurodevelopmental deficits, seizures, autism, ataxia. A variety of genes, X-linked or autosomal, have been found to be involved in the pathogenesis of these syndromes. The most common form of X-linked mental retardation is the Fragile X mental retardation syndrome (FXS), which is due to an expansion of an unstable CGG repeat in the 5'UTR of the FMR1 (fragile X mental retardation 1) gene. The polymorphic CGG repeat numbers 6 to 54±2 copies in normal individuals, 55±2 to 200 copies in healthy carriers of premutation, and >200 copies in FXS patients.

One of the most common forms of severe mental retardation in females is Rett syndrome (RTT), which is mostly due to point mutations or large deletions in MECP2 (methyl-CpG binding protein 2) gene, and rarely in CDKL5 (cyclin dependent kinase-like 5) gene.

On the other hand, mental retardation in females in combination with infantile spasms and other early onset seizures could be caused by mutations in CDKL5 gene.

Some forms of mental retardation and epilepsy in males have been associated with a common mutation dup24 or other mutations in Aristaless X (ARX) gene.

An autosomal gene mutation that gives rise to common clinical symptoms include Prader-Willi/Angelman syndromes (PWS/AS), due to a deletion of 15q11-q13 or uniparental disomy (UPD) 15. Imprinted genes (expressed only from maternal or paternal genome) are localized in the PWS/AS critical region of chromosome 15 and the gene regulation there is based on the specific methylation of the non-active copy. The CpG islands around the exon 1 of SNRPN gene are methylated on the maternal chromosome (non-active) and completely devoid of methylation on the paternal chromosome (active). This finding is used in developing diagnostic methods for PWS/AS. In case of male patients PWS can have some clinical aspects of FXS, and in female patients – some clinical aspects of RTT.

Moreover, a number of deletions along different chromosomes and genes are associated with mental retardation and cause the so called microdeletion syndromes (MDS).

In the present study, molecular genetic testing was performed in 90 mental retardation

patients who were clinically classed as FXS (n=32), RTT (n=38), PWS/AS (n=16) and MDS (n=4; 2 Williams Beuren syndrome (WBS), 1 DiGeorge syndrome (DGS) and 1 Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS)).

The present study was focused on clarification of molecular defects along the FMR1, MECP2, CDKL5 and ARX genes. In addition, methylation analysis of exon 1 of the SNRPN gene was performed and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis for large deletions/duplications, and for methylation status of FMR1 and SNRPN genes.

In the FXS group only 4 mutations in the FMR1 gene (12,5%) were found. In RTT group 12 mutations along the MECP2 gene (31.6%) were determined, but no CDKL5 gene mutations were found. In the PWS/AS group 9 pathological changes were detected along the 15q11-q13 region (56.25%). The MLPA analysis in the group of the MDS revealed 3 genetically confirmed cases (2 WBS and 1 WHS) out of 4 patients tested (75%). Thus, the molecular defects were clarified in 31% of the patients.

The percentage of genetically proved diagnoses among our RTT patients, PWS/AS and the MDS cases was relatively high, which represents a good clinical recognition of these pathological entities. On the contrary, the percentage of the genetically confirmed FXS cases was relatively low, which was in contrast to the well-known fact that FXS was the second leading cause of mental retardation after the Down syndrome. Most probably this was due to the characteristics of this group being clinically mixed and containing some definite autistic cases.

The main contributions of the present study are the developed and optimized for routine diagnostic use methods for molecular-genetic studies in the group of mental retardation syndromes. A unique complex mutational event – double indel, as well as a novel 4 bp insertion were detected in the MECP2 gene. In total 31% of patients tested were characterized on molecular level.

The present study established the beginning of the molecular-genetic diagnostics of syndromes with mental retardation in Bulgaria.

ВЪВЕДЕНИЕ

Умственото изоставане в детска възраст се среща с честота около 2-3% в развиващите се страни [Leonard and Wen, 2002]. За централна Европа честотата на „умствената инвалидизация” се оценява на около 8% [Polder et al., 1998]. Това е една от най-честите причини за насочване към генетична консултация и последващи генетични изследвания. В същото време тази патология при голям процент засегнати остава един от най-важните неизяснени проблеми в съвременното здравеопазване. В резултат на това, на засегнатите семейства не може да бъде предложено адекватно генетично консултиране и репродуктивно планиране чрез пренатална диагностика. Леки форми на умствено изоставане (т.е. интелектуален квотиент (IQ, intellectual quotient) между 50 и 70) се смята, че в повечето случаи се дължат на взаимодействието на много гени и намесата на негенетични фактори. За разлика от тези форми, тежките форми (т.е. IQ<50) се дължат на катастрофални събития като перинатална хипоксия или намесата на специфични генетични фактори, като хромозомни аберации или мутации в специфични гени [Ropers, 2006].

Умственото изоставане е значително по-често при мъже, отколкото при жени [Penrose, 1938; Wright et al., 1959; Priest et al., 1961]. Това наблюдение, както и наличието на огромен брой описани големи фамилии с X-свързан модел на умствено унаследяване доведе до предположението, че X-свързани генни дефекти играят важна роля в етиологията на умственото изоставане [Lehrke, 1972; Lehrke, 1974]. Това предположение е широко прието и експериментално доказано днес. На базата на огромно количество клинични данни и генетични проучвания за локусна скаченост в зесегнати фамилии се установи, че X-свързаното умствено изоставане (ХСУИ) е изключително хетерогенна характеристика. Най-честата форма на наследствено X-свързано умствено изоставане е синдромът на чуплива X хромозома (Fragile X-syndrome, FXS, OMIM#309550) с честота 1:4000 момчета [Turner et al., 1996]. В последствие беше идентифициран регионът от X-хромозомата, който е засегнат при FraX, това е дисталният регион от дългото рамо на X-хромозомата, където беше картиран и клониран генът FMR1 (fragile X-mental retardation 1, OMIM#309550). Това е първият идентифициран ген на X-хромозомата, свързан с умствено изоставане. Оттогава броят на идентифицираните гени на X-хромозомата, свързани с ХСУИ нараства експоненциално. Особено голям прогрес се наблюдава в областта на

несиндромното или „чиста” форма умствено изоставане, което всъщност представлява огромна група заболявания, които са клинично неразличими, тъй като изоставане в усвояването и обучението са единствен симптом на заболяването.

Синдром на Rett (RTT, OMIM#312750) е най-честата причина за X – свързано умствено изоставане при момичета. Честотата на заболяването е 1:10 000, 1:15 000 [Hagberg et al., 1997]. Класическите форми на Rett синдром се причиняват в 90-95% от случаите от мутации в MECP2 гена (метил CpG-свързващ протеин 2, OMIM#300005). Малък процент от случаите ~10% се причиняват от мутации в гена CDKL5 (циклин-зависим кинозо подобен белтък 5, OMIM#300203). Мутации в тези два гена са отговорни и за изява на атипични форми Rett синдром.

Към Rett подобни синдроми се включват други форми X – свързано умствено изоставане, като West синдром (ISSX; OMIM#308350), infantile spasms синдром (OMIM#308350), X-свързан аутизъм и др. West синдромът се дължи на мутации в ARX (Aristaless X, OMIM#300382) гена, докато infantile spasms синдромът се причинява от дефекти в CDKL5 гена. Мутации в ARX гена са описани при момчета с умствено изоставане и епилепсия. Мутации в MECP2 гена се смятаха за летални при момчета (в хемизиготно състояние), но в последно време има открити такива мутации при момчета с първоначална клинична диагноза синдром на чуплива X хромозома [www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM].

Освен X-свързаните форми на умствено изоставане, някои автозомни мутации също водят до синдроми с умствено изоставане и до известна степен припокриваща се симптоматика с X свързаните синдроми. Например синдромите на Prader-Willi/Angelman (PWS/AS, OMIM#176270; 105830), които се дължат на делеция на 15-та хромозома (15q11-q13) или унипарентна дизомия (uniparental disomy, UPD) 15, могат клинично да се припокриват в някои аспекти с FXS или RTT синдром.

В допълнение, голям брой делеции върху различни хромозоми и гени са също асоциирани с умствено изоставане и формират групата на микроделеционните синдроми - МДС (microdeletion syndromes, MDS).

Настоящият дисертационен труд е насочен към изясняване на молекулните характеристики на различни синдроми с умствено изоставане в България. Основна цел беше въвеждането на нови, надеждни и информативни методи за молекулярно-генетична диагностика на болести, свързани с умствено изоставане и с помощта на тези методи изясняването на молекулните основи на тези болести в България. В използваните методики бяха направени и редица собствени нововъведения. Голяма

група пациенти с различна клинична симптоматика бяха подложени на широк спектър генетични изследвания, в резултат на което 31% бяха генетично охарактеризирани. Останалата група генетично неизяснени пациенти бяха подготвени за бъдещи проучвания на геномно ниво, с помощта на навлизащите нови методи за анализ като микрочипове, секвениране от нова генерация и др.

1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1.1. КЛИНИЧНА КАРТИНА НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ СИНДРОМИ

1.1.1. СИНДРОМ НА ЧУПЛИВА X ХРОМОЗОМА (FRAGILE X SYNDROME, FXS, OMIM#300624)

От дълго време се смята, че генни дефекти, свързани с X хромозомата са отговорни за умствено изоставане, имайки предвид по-високата честота на изоставане в умственото развитие при момчета, отколкото при момичета [Penrose, 1938; Lehrke, 1972]. Задълбочени клинични и генетични проучвания показаха, че X-свързаното умствено изоставане е изключително хетерогенна група заболявания. В редица случаи, въпреки множеството изследвания и лабораторни тестове, етиологията на заболяването остава неизяснена, което остава семейството без прецизно генетично консултиране и информиран репродуктивен избор с помощта например на пренатална диагностика.

Синдромът на „чуплива“ X-хромозома, синдром на Martin-Bell (Fragile X syndrome, FXS, Martin-Bell syndrome) е втората най-честа причина за умствена изостаналост след синдрома на Даун [Rousseau, et al., 1995]. Средната честота на заболяването е 1:3600 мъже [Turner et al., 1996]., а при жени-изявени носителки 1:4000-6000 [Crawford et al., 2002]. Заболяването се характеризира с тежка до средна степен умствено изоставане (IQ 20-49%), сериозни говорни нарушения, когнитивни проблеми и дефицит на внимание. Наблюдават се следните поведенчески отклонения: атипично аутистично поведение, с редуващи се безпокойство и безпричинно еуфорично поведение, хиперактивност и агресивност [Mattei et al., 1981].

Дисморфичните изменения обикновено се появяват в детството. Моторно-двигателното развитие често е забавено или нарушено [Mattei et al., 1981]. Съобщава се за по-късно контролиране на главата, самостоятелно сядане, прохождане (след 1г и бм възраст). Мускулна хипотония и хипертрофия на прасците са наблюдавани при някои пациенти.

Описани са случаи на несъразмерно дълги ръце и стъпала, плоскостъпие, често коригирано чрез ортопедични операции, макроорхидизъм, който става видим след настъпване на пубертета [Lubs, 1969].

По отношение на формата на главата при редица пациенти се наблюдава макроцефалия, в някои случаи в комбинация с долихоцефалия. Лицевият дисморфизъм е широко застъпен в тази група пациенти. Наблюдават се асиметрични лицеви характеристики, удължено лице, широко чело, хипоплазия на средната част на лицето, голяма уста с плътни устни, високо небце, голяма ъгловата челност, прогнатизъм, неправилни зъби и ниско поставени големи диспластични ушни миди.

Допълнителни клинични характеристики:

При някои пациенти с FXS се наблюдават патологични изменения на съединителната тъкан, като хипермобилност на ставите на пръстите и нестабилност на други стави [Opitz et al., 1984; Hagerman et al., 1984a]. В сравнително малък процент от случаите се наблюдава сколиоза [Davids et al., 1990].

Засягането на сърцето е рядко; при някои пациенти са докладвани: пролапс на митралната клапа [Pueritz et al., 1982] и слаба дилатация на асцендираща аорта [Hagerman and Synhorst, 1984b].

Периорбитална хиперпигментация и хиперпигментация на скротума са наблюдавани по време на пубертета [Fryns, 1993 лични наблюдения, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>].

Около 20% от момчетата с FXS имат гърчови епизоди. Reiss и сътр. [1991a] докладват увеличен обем на хипокампуса при пациенти с FXS в сравнение с нормални контроли. В друго проучване Reiss и сътр. [1991b] установяват, че момчета с FXS имат значително намален размер на задния церебеларен вермис и увеличен размер на четвъртия вентрикул в сравнение с контролни групи, съответстващи по възраст. В редки случаи се наблюдава тежък дефицит в подвижността на очния клепач, което се свързва с проблеми в церебеларния моторен контрол [Koekekoek et al., 2005].

Жените, изявени носителки, обикновено са по-леко засегнати в сравнение с мъжете, тъй като последните са облигатни хемизиготи (само една от двете X-хромозоми е засегната). Обикновено стойностите на IQ са около 84. Наблюдават се трудности в обучението, говора и проблеми със съсредоточаването. Могат да са на лице и някои от характеристиките на типичния фациес, например големи уши.

1.1.2. СИНДРОМ НА RETT (RTT, OMIM#312750)

Rett синдром е описан за пръв път от виенския педиатър Rett [1966; 1977]. Синдром на Rett (RTT) е най-честата причина за X – свързано умствено изоставане при

момичета. Честотата на заболяването е 1:10 000, 1:15 000 [Hagberg et al., 1997]. Това е прогресиращо заболяване, засягащо неврологичното развитие. Наблюдава се прогресираща енцефалопатия [Hagberg et al., 1983]. Пациентите с Rett синдром обикновено показват нормално развитие през първите 6-18 месеца, след което се наблюдава задръжка в развитието, последвана от бързо влошаване на мозъчните функции. Симптомите варират от леки до тежки. Обикновено първите признаци на заболяването са хипотония и стереотипно движение на ръцете и краката. Забавен растеж на главата (микроцефалия) се забелязва около 5^{ти}-6^{ти} месец. Появяват се забележими промени в развитието, изоставане в растежа, тежки проблеми с говорното развитие. Постепенно се загубва целевото движение на ръцете, забелязва се размахване на ръцете или често поставяне в устата. Други симптоми са апраксия, клатещо се нестабилно тяло или ходене на пръсти, сколиоза, загуба на социален контакт, липса на очен контакт, дефицит на внимание. Допълнителни неврологични отклонения са спастични парепарези, вазомоторни нарушения на долните крайници и епилепсия (гърчове).

Появяват се дихателни проблеми, които се задълбочават при стрес, дишането обикновено е нормално в спящо състояние и се появяват проблеми (спонтанни епизоди на хипервентилация) в будно състояние. Губят се нормалните способности за сън.

Проводни и ритъмни нарушения се наблюдава при децата с Rett синдром, като значително са намалени нискочестотните и високочестотни компоненти. RR интервала е значително по-къс, а коригирания QT интервал е по-дълъг при пациенти в сравнение с нормални контроли [Guideri et al., 1999]. Авторите предполагат, че тази сърдечна проблематика води до сърдечна нестабилност и внезапна смърт при пациенти с Rett синдром. Наблюдават се проблеми в циркулацията, които водят до студени, посиняли крака и ръце.

В допълнение се забелязват гастроинтестинални проблеми, включващи тежък гастроезофагеален рефлукс. Налице е обилно слюнкоотделяне.

Кетг и сътр. [1997] докладват 1.2% годишна смъртност при Rett синдром, голяма част от които (26%) са внезапни и с неизяснена причина.

Различават се няколко типа Rett синдром:

1. Класически (отговаря на диагностичните критерии)
2. Провизорен (наблюдават се някои симптоми между 1 и 3 години)
3. Атипичен – началото е по-късно около 3-4 годишна възраст, говорните проблеми и проблемите с движението на ръцете са леки, много рядко такива симптоми се откриват и при момчета.

4. Конгенитален (проявява се в неонаталния период)

Към атипичните форми Rett синдром интерес представлява т.нар. Zappella Variant или вариант с частично запазен говор (preserved speech variant, PSV). De Bona и сътр. [2000] докладват вариант на Rett синдром с частично запазен говор, който следва същия ход на заболяването с характерните стереотипни движения на ръцете, но се различава по това, че има частично запазване на говора и целевото използване на ръцете. Обикновено тези пациенти нямат изоставане в растежа. Прогресивната сколиоза и епилепсията са рядко срещани при тази група пациенти. Една година по-късно Zappella и сътр. [2001] доразвиват проучванията върху варианта на Rett синдром с частично запазен говор, като посочват, че основните характеристики са частично възстановяване на вербалните способности, очевидно аутистично поведение и нормална обиколка на главата. При част от тези пациенти се наблюдава затлъстяване, кифоза и грубовати черти на лицето. Симптома на „миещите се ръце“ присъства през първите години от поява на заболяването, но често изчезва в последствие.

1.1.3. СИНДРОМ НА PRADER-WILLI (PWS, OMIM#176270)

Клинично синдром на Prader-Willi е описан през 1956 г [Prader et al., 1956] с честота в популацията около 1:25 000. Още по време на бременността майките съобщават за по-слаба двигателна активност на плода. По време на вътреутробното развитие се наблюдава слабо изоставане в растежа и тези бебета обикновено се раждат със средно тегло около 2.8 кг.

По време на неонаталния период бебетата с PWS са със задълбочена хипотония, която често причинява асфиксия. Характерни са хипорефлексия и затруднено хранене поради слаб сукателен рефлекс. При момчета се наблюдава хипопластичен penis и скротум, често в комбинация с крипторхидизъм, докато при момичета се наблюдават хипопластични лабии [Stephenson, 1980]. Бебетата с PWS имат слаб много характерен плач, в някои случаи той липсва. Наблюдават се специфични за синдрома малформативни стигми: високо издадено чело, стеснен бипариетален диаметър, обърнати надолу ъгли на устата, високо небце, микрогнатия, диспластични уши. При повечето новородени се наблюдава преходна брадикардия, термолабилност, акроцианоза и кожни петна [Chitayat et al., 1989].

В детско-юношеска възраст се наблюдава изоставане в умственото развитие, дефицит в говора, изоставане в растежа, акромикрия - малки длани с тънки деликатни пръсти и малки ходила. Лицевият бипариетален диаметър остава стеснен, очите са

издължени нагоре с бадемовидна форма, наблюдава се кривогледство (страбизъм) и пълни бузи. Мимическата активност е намалена поради мускулната хипотония. Характерна особеност за това заболяване е хиперфагия и затлъстяването, като в по-напреднала възраст се образуват коремни стрии. В резултат на дразнещ сърбеж при много деца се забелязват драскотини по кожата.

Често наблюдавана характеристика е задържането на плътна слюнка в ъглите на устата. Пациентите изглежда са с намалена чувствителност за болка, включително и при взимане на кръвни проби.

В напреднала възраст се наблюдават емоционална лабилност, затруднена моторно-двигателна активност, когнитивни проблеми, ненаситен глад. Пубертетът е забавен при двата пола. Появява се сърдечна недостатъчност, която при подходяща диета за намаляване на теглото може и да не се нуждае от лечение. Съветите и опитите за намаляване на теглото при тези пациенти често водят до сериозни психологически и поведенчески проблеми [Curfs et al., 1991].

Пациентите с PWS рядко преживяват повече от 25-30 годишна възраст, като в повечето случаи причина за ранната смърт са диабет и сърдечна недостатъчност. Ако се постигне стриктен контрол на теглото, рискът от диабет и сърдечна недостатъчност значително намалява и продължителността на живота при пациентите става близка до нормалната.

1.1.4. СИНДРОМ НА ANGELMAN (AS, OMIM#105830)

През 1965 г. Angelman описва подробно няколко деца с характерни кукленски „смеещи се” лица, които той нарича “puppet children”. Той обръща внимание и на абнормалната черепна структура, микроцефалия, която би могла да е свързана с мозъчни нарушения. През 1967 г. Bower and Jeavons въвеждат термина “happy puppet”.

Няма точни данни по отношение честотата на AS, тя се оценява на около 1:20 000 до 1:10 000 [Petersen et al., 1995; Steffenburg et al., 1996].

Клинично заболяването се характеризира с тежко моторно и интелектуално изоставане, липса на говор, атаксия, хипотония, хипирефлексия, епилепсия. Дисморфичните стигми характерни за синдрома са: прогнатия, макростомия с показващ се език. По отношение на поведенческите отклонение водещо е постоянната веселост с немотивирани пристъпи на смях. В задната част на главата се наблюдава тилна бразда, абнормална хороидална пигментация. В някои случаи пациентите с AS развиват оптична атрофия. Почти всички пациенти имат светло сини очи, светла кожа и руси къдриви

коси, характерна е хипопигментация в сравнение с техните незасегнати родители. Хипопигментацията е съществена част от фенотипа на AS, дължаща се на намалена продукция на меланин.

Електроенцефалографското изследване (ЕЕГ) при тези пациенти показва характерни за синдрома промени. Наблюдава се преходна миоклонична епилепсия, което корелира с честите резки абнормални движения, наблюдавани при тези пациенти. Често се наблюдават очни отклонения, гърчове и повръщане. Цялостен контрол на гърчовете се постига при сравнително малък брой от тези пациенти [Valente et al., 2006], но се наблюдава тенденция към подобряване на това състояние в по-късна детска възраст и по време на пубертета.

1.1.5. МИКРОДЕЛЕЦИОННИ СИНДРОМИ (MDS)

Към групата на микроделеционните синдроми се отнасят много заболявания характеризиращи се с различна степен на умствено изоставане и синдромни изменения. В настоящата работа представяме клинично само тези микроделеционни синдроми, които са генетично доказани и представляват предмет на обсъждане по-нататък в дисертационния труд.

1.1.5.1. Williams-Beuren syndrome (WBS, OMIM#194050)

WBS се среща с честота 1:10 000 [Grimm and Wesselhoeft, 1980] до 1:7500 живородени деца [Stromme et al., 2002a].

Клинично пациентите с WBS се характеризират с различна степен на умствено изоставане, от тежко засягане до почти незабележимо отклонение в умственото развитие. Специфичните когнитивни проблеми включват лошо визуално-моторно взаимодействие, поради което тези пациенти имат проблем с визуализирането на цялостен обект. Наблюдава се дефицит на внимание и бедно говорно развитие. Поведенческите отклонения се изразяват в невъзможност за концентрация и търсене на внимание от страна на околните.

При повечето пациенти се наблюдава изоставане в растежа, като това изоставане присъства и по време на вътреутробното развитие [Pankau et al., 1992]. Характерна е ранна хиперкалцемия. Налице са сърдечно-съдови отклонения като суправалвуларна аортна стеноза, калцификация на аортата и мултиплени периферални пулмонарни артериални стенози.

Лицето е с характерни елфически черти и рядко поставени зъби [Grimm and Wesselhoeft, 1980].

При някои пациенти като допълнителни изменения се наблюдават характерни ирисни изменения, намалена плътност на ретината, кривогледство (конвергентен страбизъм), езотропия и рядко катаракта [Winter et al., 1996].

Често при описание на клиничните симптоми на пациентите с WBS се споменава наличието на рязък, остър, крещящ или дрезгав глас [Gosch et al., 1994]. На базата на по-подробни проучвания на изменения на гласните струни се предполага, че патологични изменения на гласните струни може да се окажат често срещана находка при пациенти с WBS.

Сравнително рядко при пациенти с WBS се наблюдават бъбречни проблеми като нифрокалциноза, значителна асиметрия в размера на бъбреците, малки бъбреци, липса на бъбрек и ектопичен бъбрек [Pober et al., 1993].

1.1.5.2. Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS, OMIM#194190)

Честотата на Wolf-Hirschhorn синдром се оценява на около 1:50 000 до 1:20 000 родени деца, като съотношението момичета/момчета е 2:1 [Lurie et al., 1980; Maas et al., 2008].

Клиничните симптоми на WHS са описани през 1965 г от Hirschhorn и сътр. [1965] и Wolf и сътр. [1965]. Заболяването се характеризира с тежко изоставане във физическото и умствено развитие. При всички пациенти се наблюдава лицева дисморфия (лицата се оприличават на гръцки шлем), микроцефалия, цепната цепка на устната или небцето, антимонолоидни очни цепки, колобома и др. Наблюдават се сърдечни и бъбречни аномалии. При тези пациенти се съобщават и гърчове, често провокирани от фебрилитет, които намаляват и изчезват с възрастта [Battaglia et al., 1999].

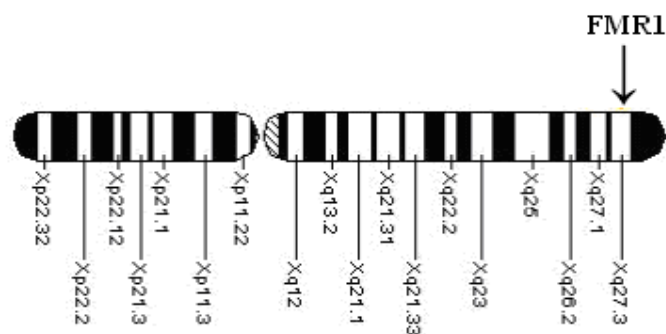
1.2. МОЛЕКУЛНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ СИНДРОМИ

1.2.1. СИНДРОМ НА ЧУПЛИВА X ХРОМОЗОМА (FRAGILE X SYNDROME, FXS)

Синдромът на чуплива X хромозома се дължи на мутации в FMR1 (Fragile X Mental Retardation-1 gene, OMIM#309550) гена, локализиран на X хромозомата, Xq27.3 (Фигура 1). Картирането на гена става след установяване на скаченост между фактор IX

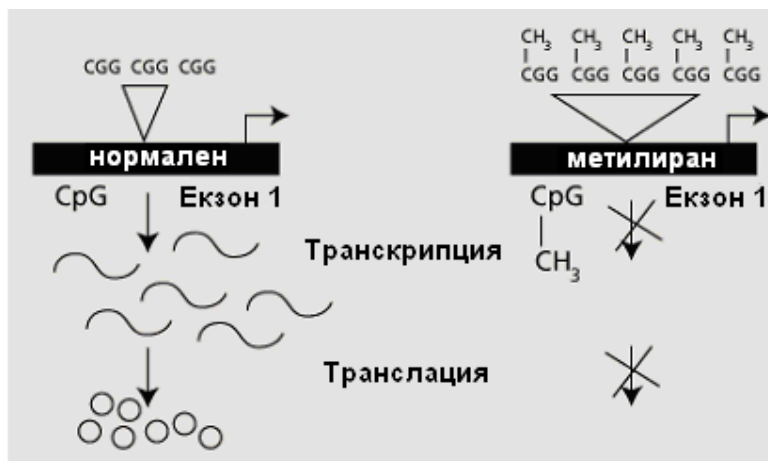
локуса (F9; OMIM#300746), локализиран в Xq27 региона [Camerino et al., 1983], както и доказването, че глюкозо-6-фосфат дехидрогеназния locus (G6PD, OMIM#305900) е дистално разположен спрямо лакуса на „чуплива“ X в региона Xq27.3 [Szabo et al., 1984]. В последствие Richards и сътр. [1991] използват микросателитни маркери за позициониране на локуса на „чуплива“ X хромозома 3.7 сМ дистално от DXS297 и 1.2 сМ проксимално от DXS296. Същите автори откриват два полиморфни микросателитни AC повтора FRAXAC1 и FRAXAC2, физически локализирани в рамките на 10 kb от двете страни на (CCG) $_n$ повторения регион, отговорен за синдрома на „чуплива“ X хромозома.

Генът FMR1 има 17 екзона и покрива 39131 бази от човешкия геном [<http://genome.ucsc.edu>]. Най-честият генетичен дефект е експанзия на полиморфен CGG повтор в 5' нетранслируемия регион на гена [Pieretti et al., 1991; Verkerk et al., 1991]. Тази мутация е причина за заболяването при повече от 95% от случаите.



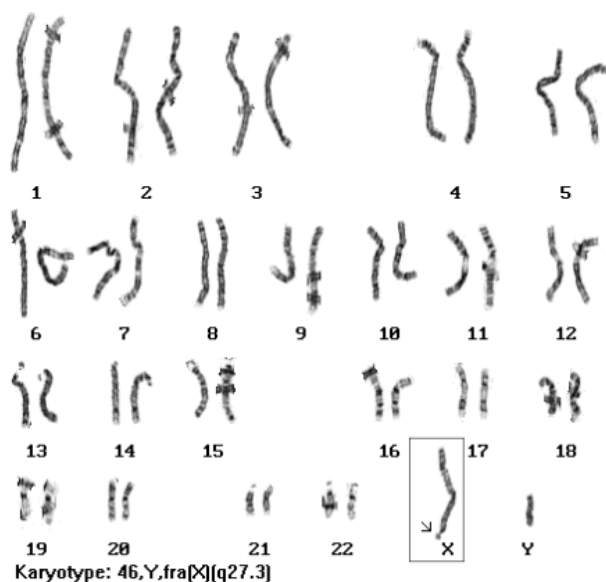
Фигура 1. Локализация на FMR1 гена (Fragile X Mental Retardation-1 gene) върху X-хромозомата [http://en.wikipedia.org/wiki/FRAXA_syndrome]

Полиморфният CGG регион е нестабилен и може да експандира във всяко следващо поколение. Метилирането на цитозина в тринуклеотида CGG и в CpG островите намиращи се в 5'-нетранслируемия район на гена води до хиперметилиране в промоторната област на гена и до неговото заглушаване (инактивиране) – подтиска се транскрипцията на гена и трансляцията в белтък [Devys et al., 1993] (Фигура 2).



Фигура 2. Модел на инактивиране на FMR1 гена чрез подтискане на транскрипцията и транслацията

Името на синдрома “чуплива” X идва от факта, че хиперметилярането и експанзията в съответния генен локус причиняват реконструкции в дългото рамо на X-хромозомата, което става “чупливо” и това събитие може да се наблюдава микроскопски при стандартен цитогенетичен анализ (Фигура 3).



Фигура 3. Кариотип на мъж със синдром на “чуплива” X-хромозома [<http://www.biology.iupui.edu/biocourses/n100/2k2humancsomaldisorders.html>]

Генът FMR1 кодира синтезата на важен РНК-свързващ белтък наречен FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein). Нормално този белтък се синтезира в много тъкани и най-вече в мозъка и тестисите. Все още функцията на този белтък не е напълно

изяснена, но вероятно има връзка с развиването на синаптичните връзки между невроните в мозъка и осъществяването на клетъчните контакти. Счита се, че функцията на FMRP е да свързва и улеснява транслацията на набор от есенциални невронални РНК молекули. Той действа като совалка, като изнася иРНК молекули от ядрото към цитоплазмата, където се извършва белтъчната синтеза [Jin and Warren, 2000]. Болестният фенотип възниква при спиране производството на белтъка FMRP, в следствие на което тези есенциални РНКи не се транслират в белтъци.

Нормално при здрави индивиди броят на CGG-повторите варира от 6 до 55. При повечето засегнати болни, CGG-повторът експандира над 200 копия и експанзията се означава като пълна мутация. Индивиди с т.нар премутация (броят на CGG-повторите варира от 55 до 200) са клинично здрави, но премутацията става нестабилна и може да експандира при предаването ѝ в следващото поколение. Когато броят на повторите е 46-60 копия, се говори за междинна сива зона [Sherman, 2002; Nolin et al., 2003].

Такъв тип мутации, дължащи се на експандиране на три- или тетрануклеотидни повтори се наричат „динамични мутации”. Тези мутации не се дължат на единично генетично събитие, а по-скоро възникват в резултат на няколко последователни стъпки. Първата стъпка води до появата на нестабилен алел, който в следващи стъпки нараства като брой копия или рядко намалява (контрахира) [Arocena et al., 2000]. Добре известно е, че около 40% от засегнатите момчета представляват мозайки от метилирана пълна мутация и неметирана премутация [Nolin et al., 1994]. Много по-редки са известните случаи на мозаицизъм по отношение на пълна мутация и делеция; както и пълна мутация и нормален алел [Nolin et al., 1994; van der Ouweland et al., 1994; Mingroni-Netto et al., 1996; Grasso et al., 1999; Schmucker and Seidel, 1999; Arocena et al., 2000]. Известен е и случай на реверсия на майчина премутация до нормален по размер алел в нейния незасегнат син [Tabolacci et al., 2007]. Възможно е честотата на тези реверсии на „динамични мутации” до нормален по размер алел да е значително по-висока от наблюдаваната, просто защото тези случаи не стигат до генетично диагностициране.

Установено е, че унаследяването на тринуклеотидния повтор е по-нестабилно по мъжка линия, отколкото по женска по отношение на междинните копия. Обратно на това наблюдение, премутационните алели по бащина линия са по-стабилни, отколкото по майчина [Sullivan et al., 2002]. Тази разлика, която зависи от размера на повтора, предполага селекция срещу сперматозоиди, носещи голям размер CGG повтор [Sullivan et al., 2002]. Жени, носителки на пълна мутация, ако предадат този алел на синовете си, то те ще носят пълна мутация. Жени, носителки на премутантен алел, ако предадат този

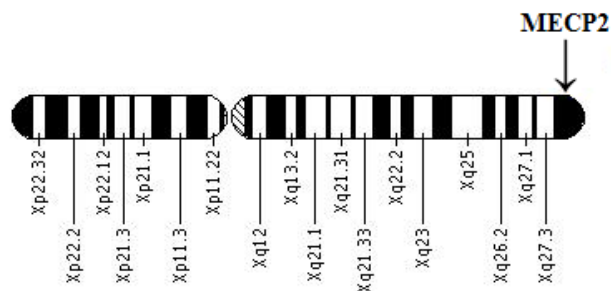
алел на синовете си, то те ще бъдат мозайки от пълна мутация/премутация или пълна мутация/нормален алел [Schmucker and Seidel, 1999].

Доказани са единични случаи на делеции и точкови мутации в FMR1 гена, които клинично се припокриват с FXS случаите, дължащи се на CGG експанзия [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=309550].

В следствие се откри нов ген FMR2 (Fragile X Mental Retardation 2, OMIM#300806), в който подобна експанзия на GCC-повтор създава нов локус на чупливост Xq28 и е свързан със синдром на чуплива X хромозома тип Е (FXSE, Fragile X site 2, OMIM#309548). Генът FMR2 има 21 екзона и покрива 500054 бази от човешкия геном. Честотата на мутацията в FMR2 е значително по-ниска от честотата на експандиране на повтора в FMR1 гена, но клинично двата синдрома се припокриват. В следствие малък процент пациенти с диагноза FXS, но с неясен дефект в FMR1 гена се оказва, че се дължат на експанзия в FMR2 гена [Barnicoat et al., 1997].

1.2.2. СИНДРОМ НА РЕТТ (RTT)

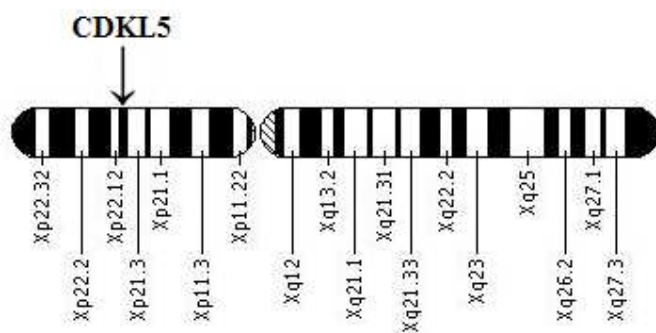
Класическите форми на Rett синдром се причиняват в 90-95% от случаите от мутации в MECP2 гена – метил CpG-свързващ протеин 2 (Methyl-CpG-binding protein 2, OMIM#300005), разположен на дългото рамо на X хромозомата (Xq28) и подлежи на X-хромозомна инактивация (Фигура 4) [Meehan et al., 1992; Adler et al., 1995; D'Esposito et al., 1996; Vilain et al., 1996]. Първоначално на базата на хромозомни транслокации, ангажиращи късото рамо на X хромозомата се е смятало, че генът отговорен за Rett синдром при момичета се намира в Xp рамото. В следствие обаче, са изследвани и последователно изключени редица Xp гени като кандидат гени за Rett синдром [www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM]. Едва 1998 г. на базата на хаплотипен анализ се установява, че RTT локусът най-вероятно лежи в Xq28 региона в близост до маркер DXS15 [Xiang et al., 1998].



Фигура 4. Локализация на MECP2 гена (Methyl-CpG-binding protein 2) върху X-хромозомата [http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/mecp2.jpeg]

Генът МЕСР2 има 4 екзона, от които кодиращи са 2, 3 и 4 и се характеризира с много голям интрон 2 (около 60 кб) [Coy et al., 1999]. Транскрибира се от центромера към теломера, като на транскрипционно ниво се характеризира с високо консервативен 3' нетранслируем регион от 8.5 кб [Coy et al., 1999]. Белтъчният продукт МесР2 се състои от 486 аминокиселинни остатъка, асоцииран е с хроматина и има три главни домена: метил-свързващ домен, домен подтискащ транскрипцията и С-терминален домен с неясна функция. Този белтък се свързва с метилираните CpG острови, като *in vivo* е главно концентриран в зоната на хетерохроматина, но се среща и в зоната на еухроматина. Смята се, че основната функция на белтъка МесР2 е репресираща чрез ремоделиране и опаковане на хроматина. За момента не се знаят точно гените, които се регулират специфично чрез действието на МесР2. Друга функция на МесР2 е взаимодействието с високоповторени елементи като LINE1 ретротранспозони [Yu et al., 2001].

Картирането на основния ген, свързан с патология RTT е било изключително трудно и е преминало през огромен брой изследвания на гени по цялата дължина на X хромозомата, като основно се е следвал пътя на изключване на кандидат-гени. В последствие се установява, че мутации в други гени от Xp региона (както се е предполагало в началото) също са свързани с Rett синдром. Малък процент от случаите на вариант на RTT с инфантилни спазми се причиняват от мутации в гена CDKL5 – циклин-зависим киназа подобен белтък 5 (Cyclin-dependent kinase like 5, OMIM#300203) [Archer et al., 2006a], разположен на късото рамо на X хромозомата (Xp22) (Фигура 5) [Scala et al., 2005].



Фигура 5. Локализация на CDKL5 гена (Cyclin-dependent kinase-like 5) върху X-хромозомата [<http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/cdkl5.jpeg>]

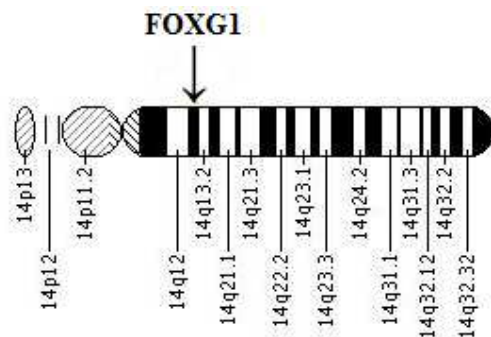
Генът CDKL5 има 21 екзона (20 кодиращи) и покрива 228023 бази от човешкия геном.

Най-честите мутации в тези гени са точкови мутации: транзиции и трансверзии, при които се заменя една аминокиселина с друга (missense) или се генерира стоп кодон (nonsense). Срещат се и малки делеции и инсерции на няколко нуклеотида, както и комбинирани инсерции/делеции (indels) [www.mecp2.chw.edu.au].

В допълнение, в тези гени се откриват и големи делеции и дупликации, покриващи региони от един ген или няколко гена [Kleefstra et al., 2002; Ravn et al., 2005; Hardwick et al., 2007; Lugtenberg et al., 2009]. Голямата клинична вариабилност на RTT корелира с типа на мутацията, нейното разположение в MECP2 гена и инактивацията на X хромозомата [Amir et al., 2000].

Множество фактори на средата могат да променят нивото на кодирания от MECP2 гена белтък в мозъка и да предизвикат ефект подобен на мутация в MECP2 гена. Мутации в MECP2 и CDKL5 гените са отговорни и за изява на атипични форми Rett синдром.

Особен интерес представлява откритието в последните години, че не само X-свързани гени са включени в патологията на Rett синдром. Конгенитални форми на RTT се дължат на мутации в гена Forkhead G1 (FOXG1, OMIM#164874), локализиран на 14-та хромозома (14q13) [Ariani et al., 2008]. Локализацията на FOXG1 гена е представена на Фигура 6.

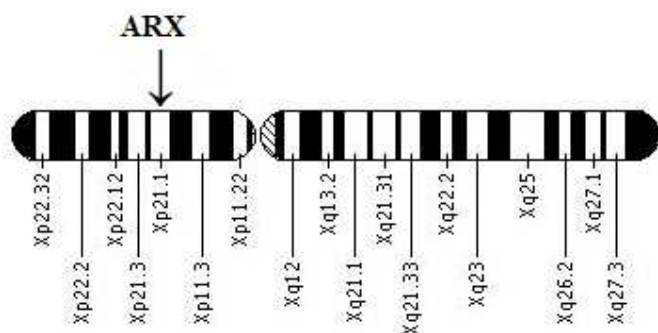


Фигура 6. Локализация на FOXG1 гена (Forkhead G1) върху 14^{-та} хромозома

[<http://ghr.nlm.nih.gov/gene=foxg1>]

Този ген има 1 екзон и покрива 2584 базови двойки. Докладваните до момента мутации във FOXG1 гена са точкови замени от типа missense и nonsense [www.mecp2.chw.edu.au].

Към Rett подобни синдроми (Rett-like syndromes) се включват други форми X – свързано умствено изоставане и аутизъм, като early epileptic encephalopathy тип 1 и 2 (X-linked dominant infantile spasm syndrome-1 & 2 (ISSX1, OMIM#308350, ISSX2, OMIM#300672), известни още под наименованията West синдром и infantile spasms синдром. Синдромът ISSX1 се дължи на мутации в ARX гена (Aristaless X, OMIM#300382), докато ISSX2 синдромът се причинява от дефекти в CDKL5 гена. Генът ARX е локализиран на късото рамо на X хромозомата (Xp22.13) (Фигура 7), има 5 кодиращи екзона и покрива 12251 бази от човешкия геном.



Фигура 7. Локализация на ARX гена (Aristaless X) върху X-хромозомата

[<http://ghr.nlm.nih.gov/gene=arx>]

От друга страна, момчета клинично диагностицирани като синдром на чуплива X-хромозома или момичета с първоначална диагноза синдром на Rett, но с генетично непотвърдена диагноза при анализ на съответните гени, би трябвало да се изследват за мутации в ARX и CDKL5 гените. Вече има съобщени данни за открити мутации в тези гени при момчета с първоначална диагноза синдром на чуплива X хромозома. Например при момчета с умствено изоставане, продълговато лице, големи стърчащи ушни миди (симптоми характерни за FXS) и епилепсия се открива дупликация на 18-24 нуклеотида (dup18-24) в екзон 2 на ARX гена [Stromme et al., 2002b]. В допълнение, в ARX гена се откриват точкови мутации и малки делеции.

Мутации в MECP2 гена се смятаха за летални при момчета (в хемизиготно състояние), но в последно време има докладвани такива мутации при момчета [www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM]. Докладвана е 2 бд делеция в MECP2 гена при момче със средна степен на умствено изоставане, затлъстяване и гинекомастия, с първоначална диагноза синдром на Prader-Willi [Kleefstra et al., 2002]. Смята се, че около 2% от

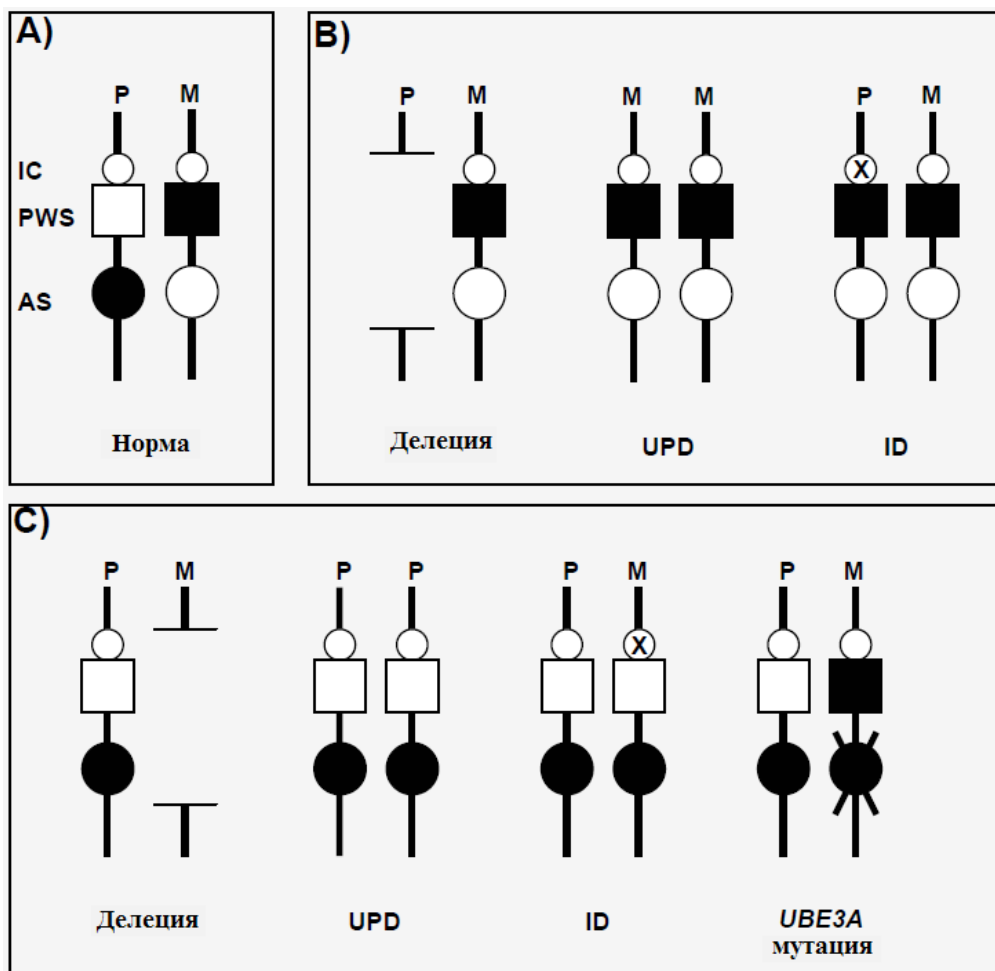
момчетата с тежка енцефалопатия се причиняват от дупликации в MECР2 [Lugtenberg et al., 2009].

1.2.3. СИНДРОМИ НА PRADER-WILLI/ANGELMAN (PWS/AS)

С помощта на пулсова електрофореза и рядко режещи рестриктази Kirkilionis и сътр. [1991] създават широкообхватна рестрикционна карта на PWS/AS рисковия регион 15q11.1-q12. Ozcelik и сътр. [1992] локализируют генът за малък ядрен рибонуклеарен протеин N (SNRPN; OMIM#182279), който попада в минималния делетиран регион. В следствие с помощта на FISH и микросателитни маркери се определят границите на минималния делетиран регион между маркерите D15S13 и D15S10. Mutirangura и сътр. [1993] публикуват завършеният YAC контиг на PWS/AS критичния регион и за първи път дискутират потенциалната роля на унипарентната дизомия при PWS и AS.

PWS/AS се дължат на загуба на функцията на импринтвани гени (експресирани само от майчиния или бащиния геном) в региона 15q11-13. Геномният импринтинг играе важна роля при редица генетични заболявания, включително и PWS/AS синдроми. Метилирането в PWS/AS критичния регион на 15-та хромозома е различно, като майчиният хомолог е метилиран и неактивен, а бащиният е неметилиран и следователно транскрипционно активен. Около 70% от PWS се дължат на de novo делеция на бащин неметилиран регион от 15q11-13, около 25% са причина на майчина унипарентна дизомия 15, а останалите случаи се дължат на 15q транслокации или епимутации в импринтвания регион, при което се инактивират активни гени от бащиния хомолог [Nicholls et al., 1989; Zieve and Sauterer, 1990; Nakao et al., 1994] (Фигура 8).

Angelman синдром в около 70% от случаите се причинява от делеция на майчин 15q11-13 регион и около 2-5% от случаите се дължат на бащина унипарентна дизомия 15. Друга генетична причина за синдром на Angelman (20%) са точкови мутации в гена UBE3A (Ubiquitin-protein ligase E3A, OMIM#601623) (Фигура 8).



Фигура 8. Схематично изображение на различни генетични дефекти, водещи до PWS/AS [Kokkonen, 2003]

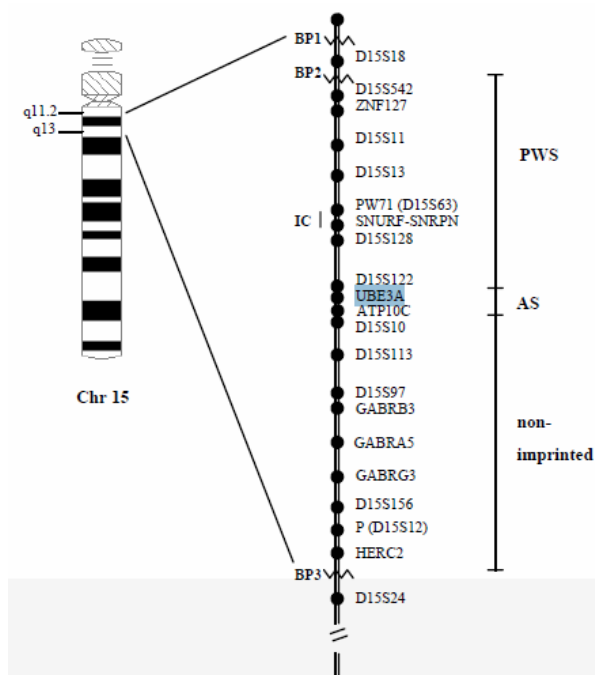
(A) Нормален импринтинг на бащин (P) и майчин (M) регион от 15q11-q13. В бащината хромозома 15, гените свързани с PWS са активни (бяло квадратче), а гените свързани с AS са неактивни (черно кръгче). В майчината хромозома 15, гените свързани с PWS са неактивни (черно квадратче), а гените свързани с AS са активни (бяло кръгче).

(B) Генетични дефекти, водещи до загуба на експресия на бащини гени при PWS.

(C) Генетични дефекти, водещи до загуба на експресия на майчини гени при AS.

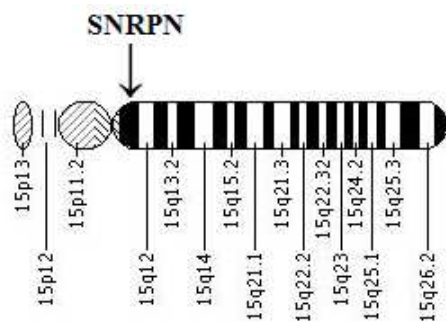
IC= център на импринтинг; UPD= унипарентна дизомия; ID= импринтинг дефект; X=дефект в импринтинг центъра

UBE3A генът е локализиран на дългото рамо на 15^{-та} хромозома (15q11-q13), състоящ се от 11 екзона и покрива 71399 бази от човешкия геном (Фигура 9).



Фигура 9. Генетична карта на региона 15q11-q13 [Kokkonen, 2003]

Zeschnigk и сътр. [1997] установяват, че почти всички динуклеотиди 5'-CG-3' около екзон 1 на SNRPN (Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N, OMIM#182279) (Фигури 9 и 10) гена са метилирани върху майчината хромозома и напълно неметилирани върху бащината хромозома. Това важно откритие намери приложение в последствие в почти всички методи, анализиращи метилирането в региона на 15q11-13 и използвани за генетично верифициране на PWS/AS.

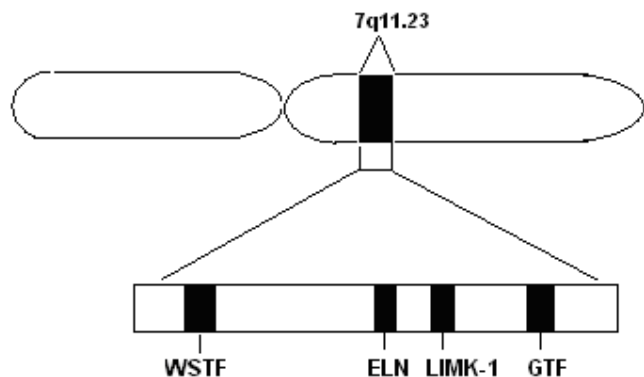


Фигура 10. Локализация на SNRPN гена (Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N) върху 15^{-та} хромозома [http://ghr.nlm.nih.gov/gene=snrpn]

1.2.4. МИКРОДЕЛЕЦИОННИ СИНДРОМИ (MDS)

1.2.4.1. Williams-Beuren syndrome (WBS)

William-Beuren syndrome (WBS) се причинява от хемизиготна делеция на няколко последователни гени от 7-ма хромозома (7q11.23) (Фигура 11).



Фигура 11. Генетична карта на региона 7q11.23

[http://www.lakeforest.edu/images/userImages/eukaryon/Page_7093/valtierra%201.bmp]

Първоначално при пациенти с WBS е докладвана делеция, покриваща еластиновия ген ELN (OMIM#130160) [Ewart et al., 1993]. В последствие се установява, че тази делеция покрива много по-голям регион от поне 114 kb. Тежестта на умственото изоставане и проявата на различни симптоми, свързани със синдрома зависят от големината на делецията и гените попадащи в делецията. С помощта на ДНК полиморфни маркери се установява, че делециите са както с майчин (39%), така и с бащин (61%) произход [Nickerson et al., 1995]. Присъствието обаче на две копия ELN ген не изключва диагнозата.

Друг ген включен в делетирания регион при WBS е генът RFC2 (OMIM#600404) [Peoples et al., 1996]. Авторите докладват, че 40-кД белтъчен продукт на гена RFC2 е една от 5-те субединици на репликационния фактор С комплекс. В този случай делецията би могла да намали ефективността на ДНК репликацията, което би могло да е свързано с изоставане в растежа и нарушения в развитието.

В допълнение към еластиновия ген, генът кодиращ LIM киназа (LIMK1; OMIM#601329) се оказва също делетиран при пациенти с WBS [Tassabehji et al., 1996]. Този ген се експресира преимуществено в мозъка и е пряко свързан със степента на умствено изоставане и когнитивните нарушения при пациентите с WBS, докато делеция на еластиновия ген е пряко свързана със сърдечно-съдовите нарушения.

При някои атипични случаи на WBS делецията обхваща и други гени като генния кластер GTF2IRD1/GTF2I (OMIM#604318), CYLN2 (OMIM#603432), FKBP6 (OMIM#604839), WSCR1 (OMIM#603431) [Osborne et al., 1996; Tassabehji et al., 2005; Metcalfe et al., 2005]. Тези допълнителни гени, включени в делецията се предполага, че са отговорни за степента на умствено изоставане, инфантилната хиперкалцемия и уникалния профил на всеки пациент.

През 1996 г Osborne и сътр. [1996] конструират физическата карта, покриваща 500 кб от 7q11.23 хромозомния регион. Този регион се простира 35 кб 5' и 430 кб 3' от ELN гена и покрива 9 транскрипционни единици, сред които са ELN, LIMK1, RFC2 и WSCR1 гените. Минималния критичен делетиран регион на 7q хромозомата е идентифициран с помощта на 10 микросателитни маркери и FISH анализ при 63 пациенти с WBS, като в това проучване регионът се стеснява до 2 сМ и се фиксира между маркерите D7S489U и D7S1870 [Wu et al., 1998].

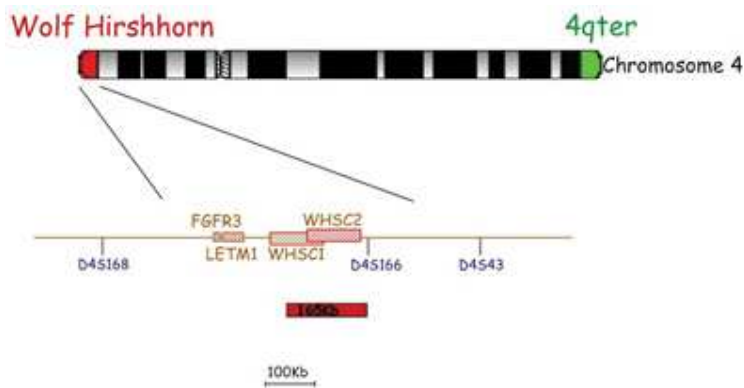
Urban и сътр. [1996] предполагат, че механизмът за възникване на делецията причиняваща WBS е рекомбинация по време на мейозата. Нереципрочната рекомбинация по време на мейозата най-вероятно се дължи на последователности с висока степен на хомоложност, фланкиращи делетирания регион [Baumer et al., 1998].

Хромозомни транслокации, включващи хромозома 7 и засягащи WBS региона могат да са асоциирани с широко разнообразие от фенотипове, вариращи от някои незначителни признаци на синдрома като груб глас до пълна клинична изява на WBS [Duba et al., 2002].

Хромозомната нестабилност на 7q11.23 региона и наличието на множество повторени мотиви в този регион са директно свързани с геномната структура на региона и неговата податливост на мутиране (делетиране).

1.2.4.2. Wolf-Hirschhorn синдром (WHS)

Wolf-Hirschhorn синдром (WHS) се причинява от хемизиготна делеция на дисталното късо рамо на 4-та хромозома (4p16.3) (Фигура 12).



Фигура 12. Генетична карта на региона 4p16.3. [http://www.cytocell.com/images/products/aquarius_wolf_diag.jpg]

Първите проучвания върху WHS рисковия регион датират от 90-те години на миналия век. Gandelman и сътр. [1992] описват 4p делеция при пациент с WHS, като тази делеция обхваща приблизително 2.5 Мб и точката на разкъсване попада приблизително 80 кб дистално от маркер D4S43. Малко по-късно е картиран WHS критичният регион 1 (WHS critical region, WHSCR1), който покрива 165 кб, на около 2 Мб от теломера [Wright et al., 1997]. В последствие се оформя и втори критичен регион за WHS, покриващ 300- до 600-кб интервал от 4p16.3 региона (WHSCR2; 1.9 Мб от теломера), който продължава дистално WHSCR1 [Zollino et al., 2003].

По-подробни изследвания на делетирия регион показват, че съществуват вариации както в размера на делецията, така и в локализацията на точката на разкъсване (breakpoint) [Zollino et al., 2000]. На тази база стана възможно интерпретирането на генотип/фенотипни корелации. Оказва се, че делеция по-малка от 3.5 Мб води до лек фенотип с липсващи малформации. На базата на генотип/фенотип корелациите WHS фенотипът се разделя на два варианта – класическа и лека форма. Най-добре проучени са делециите между 1.9 и 3.5 Мб, като всички те са терминални [Zollino et al., 2003]. Най-малката известна делеция до момента е 1.4 Мб характеризираща се с много лек фенотип [Maas et al., 2008].

Към вече известните гени във WHS региона на 4-та хромозома се причислява генът LETM1 (OMIM#604407), който най-вероятно е отговорен за гърчовата симптоматика при това заболяване. В допълнение генът MSX1 (HOX7) (OMIM#142983), който също попада във WHS рисковия регион, се оказва свързан с агенезис на зъбите, което показва, че олигодонтията е най-вероятно съществена характеристика на синдрома [Niemenen et al., 2003]. Генът WHSC1 (OMIM#602952) в хемизиготно състояние се смята

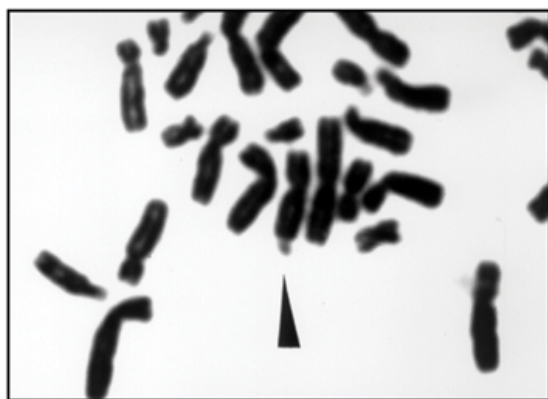
отговорен за характерната лицева симптоматика при WHS [Van Buggenhout et al., 2004]. Резултатите от подробните генетични проучвания показват, че останалите важни характеристики на синдрома, като микроцефалия, цепнато небце и умствено изоставане, най-вероятно се дължат на делеция на повече от един ген в рисковия регион на 4-та хромозома. Според Маас и сътр. [2008], гените отговорни за микроцефалия и изоставане в растежа попадат в региона между 0.3 и 1.4 Мб на 4pter. Липсата на откриваема на молекулно ниво делеция, обаче, не изключва диагноза WHS.

1.3. ПРЕГЛЕД НА МЕТОДИТЕ ЗА ДИАГНОСТИКА НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ СИНДРОМИ

1.3.1. МЕТОДИ ЗА ДИАГНОСТИКА НА СИНДРОМ НА ЧУПЛИВА X ХРОМОЗОМА

Прецизната ДНК диагностика и точното измерване на CGG повтора е технически много сложна процедура. Затрудненията идват основно от големия размер на повторения регион и неговият CG състав.

Първоначално за диагностика на синдром на “чуплива” X-хромозома се е използвал цитогенетичен анализ (виж Фигура 13), като клетките (лимфоцити или фибробласти) са култивирани в среда дефицитна на фолат [Jacky and Dill, 1980]. С помощта на този анализ обаче е възможно да се диагностицират само случаите с много голяма експанзия на тринуклеотидния повтор. Поради тази причина този подход вече не се счита за надежден при диагностика на FXS.



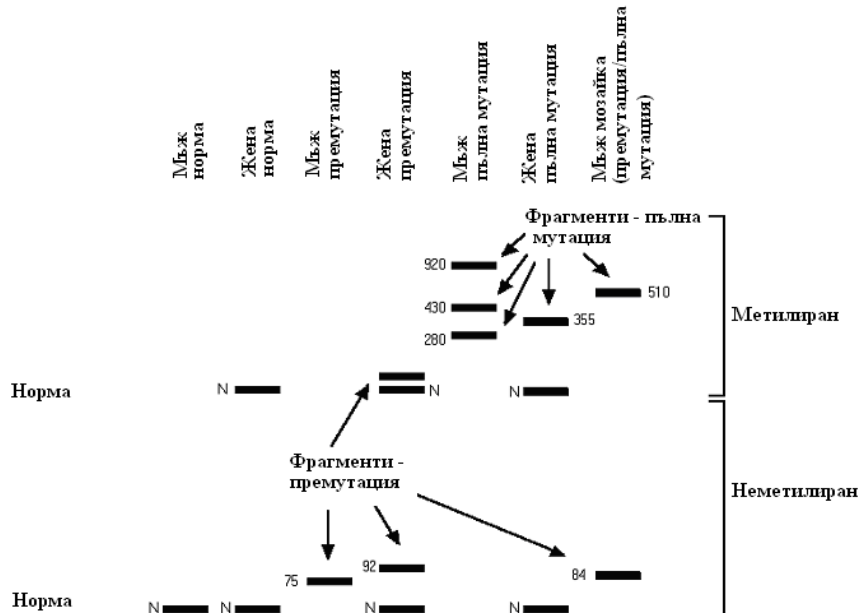
Фигура 13. „Чуплив” участък в локус Xq27.3 (стрелка), който се наблюдава при хромозомен анализ на пациент със синдром на чуплива X хромозома.
[<http://www.scielo.br/img/revistas/anp/v63n3a/a02fig01.gif>]

За златен стандарт в молекулярната диагностика на FXS се смята класическият метод, наречен Southern blot. Той се основава на техниката на геномна рестрикция, разделяне в гел, прехвърляне на ДНК фрагментите върху найлонова мембрана със Southern blot и последваща хибридизиране със специфична сонда [Oberle et al., 1991]. В хода на този анализ се използват две рестриктази, разпознаващи метилирана (EagI) и неметилирана (EcoRI) ДНК [Rousseau et al., 1991]. Специфичната сонда се маркира изотопно с P^{32} или с дигоксигенин (DIG-labeling). Детекцията се извършва след проявяване на рентгенова плака или DIG детекция с анти тяло, при което фрагментите се визуализират директно върху найлоновата мембрана (Фигура 14).

Предимство на Southern blot анализа е много прецизното визуализиране на пълния набор CGG повторени фрагменти от норма, през малки и големи премутации до пълни мутации. Чрез тази техника за анализ могат да се интерпретират метилирани и неметилирани фрагменти. Методът позволява детекция на мозаечен генотип.

Тази техника обаче, страда от съществени недостатъци: изпълнението на хибридизация по Southern е трудоемко и дълго, като едва в края на анализа може да се установи, че в хода на работата е възникнал някакъв технологичен проблем; изисква работа с изотоп и други канцерогенни реагенти; изисква присъствието на много контроли към всеки блот; не дава възможност за точно определяне на броя CGG повтори; изисква голямо количество геномна ДНК, което го прави трудно приложим за пренатална диагностика.

Анализ на синдром на чуплива X хромозома чрез Southern блот



Фигура 14. Анализ на синдром на “чуплива” X-хромозома чрез метода хибридизация по Southern [http://www.fragilex.org/html/southern.htm]

Пътека 1- мъж, нормален: наблюдава се една ивица отговаряща на повтор с нормала дължина, неметиран;

Пътека 2- жена, нормална: наблюдават се две ивици отговарящи на повтори с нормала дължина, един неметиран (на активната X-хромозома) и един метилиран (на инактивираната X-хромозома);

Пътека 3- мъж, премутация: наблюдава се една ивица отговаряща на повтор с по-голяма дължина, неметиран. Премутацията съдържа 75 повтора (определено е с PCR);

Пътека 4- жена, премутация: наблюдават се 4 ивици съответстващи на премутацията и на нормалния по дължина повтор. Премутацията съдържа 92 повтора (определено е с PCR);

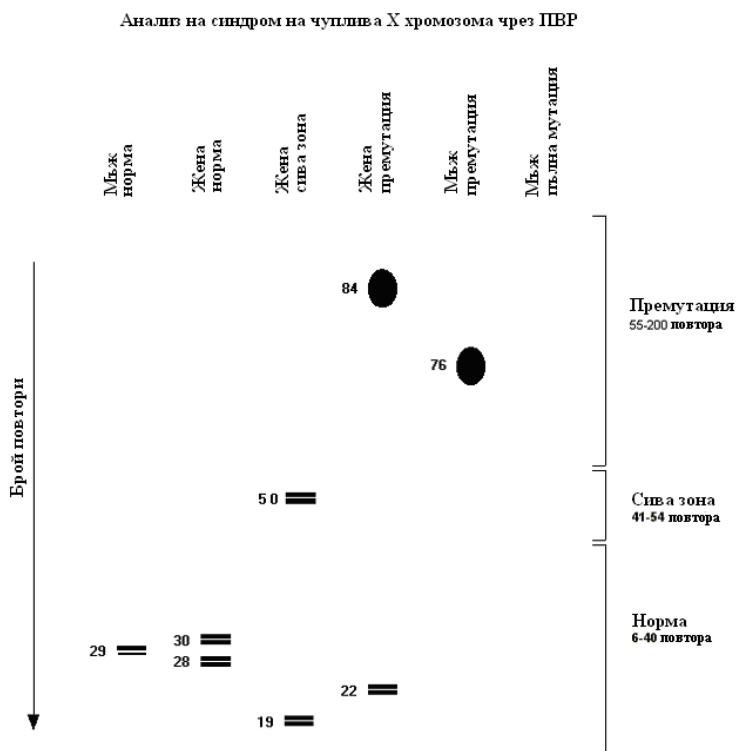
Пътека 5- мъж, пълна мутация: наблюдават се ивица(и) с брой на повторите над 200, метилирани. Липсва нормален неметиран повтор.

Пътека 6- жена, пълна мутация: наблюдават се ивица(и) с брой на повторите над 200, метилирани. На лице са и две ивици съответни на повторите с нормални дължини.

Пътека 7- мъж, мозайка: пълна мутация и премутация.

Поради методологичните трудности при използване на Southern blot анализа, напоследък изследователите насочват усилията си към въвеждане и използване за диагностика на синдром на “чуплива” X-хромозома по-бързи и по-лесно изпълними техники, които се основават на *in vitro* размножаване на CGG повторения регион чрез полимеразна верижна реакция (polymerase chain reaction, PCR) [Brown et al., 1996; O'Connell et al., 2002; Rosales-Reynoso et al., 2007; Yim et al., 2008]. За визуализиране и интерпретация на размножения продукт се извършва разделяне в акриламиден гел и се подлага на хибридизация със специфична сонда (CGG)₅ (Фигура 15). Сондата се маркира

изотопно или с дигоксигенин.



Фигура 15: Анализ на синдром на “чуплива” X-хромозома чрез метода на полимеразна верижна реакция (ПВР)

<http://www.fragilex.org/html/pcr.htm>

Пътека 1- мъж, нормален: наблюдава се една ивица, съответстваща на повтор съдържащ 29 копия;

Пътека 2- жена, нормална: два повтора с нормална дължина – 30 и 28 броя копия на повтора;

Пътека 3- жена, сива зона: 50 броя копия на повтора (сива зона) и 19 броя копия на повтора (норма);

Пътека 4- жена, премутация: 84 броя копия на повтора (премутация) и 22 броя копия на повтора (норма);

Пътека 5- мъж, премутация: 76 броя копия на повтора;

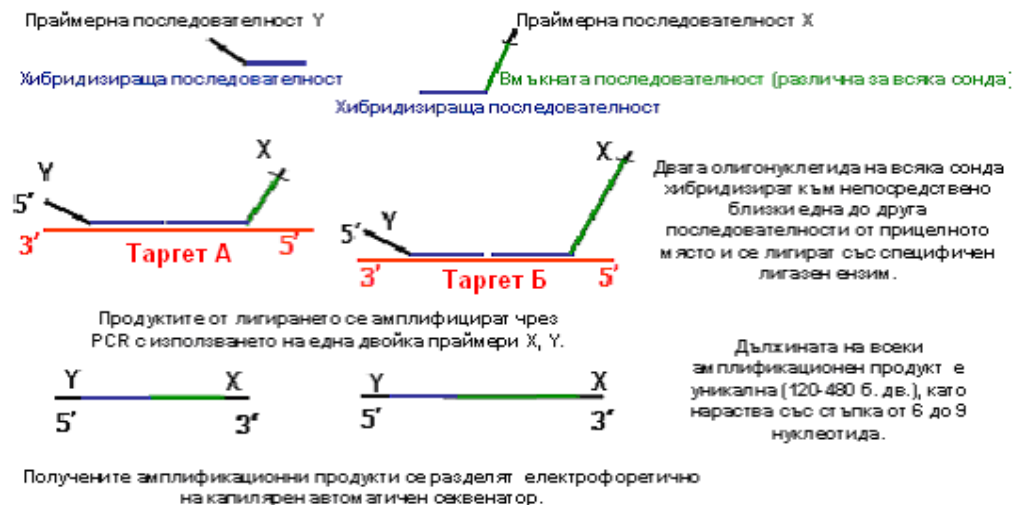
Пътека 6- мъж, пълна мутация: няма ивица с нормален брой копия на повтора. Пълната мутация е необходимо да се потвърди със Southern blot анализ.

Правени са опити и за провеждането на PCR, специфичен по отношение на метилирането, използвайки като матрица бисулфитно третирана геномна ДНК, за прецизно разграничаване на нормален алел, премутация и пълна мутация [Zhou et al., 2004]. Този метод не се оказва много успешен и не намира широко приложение за диагностични цели.

Големи надежди се възлагаха на изпълнението на PCR в присъствие на бетаин в две реакции: първа реакция амплифицираща нормалните фрагменти (short PCR) и втора реакция с участието на „хиμεрен“ CGG праймер за намножаване на експанзията (TP-PCR, triple-primed PCR) [Tassone et al., 2008]. Този метод позволява бързо изпълнение на анализа и детекция чрез агарозна електрофореза и оцветяване с етидиев бромид, което го прави удобен за скринингов метод. TP-PCR обаче не се оказва много удачен за диагностицирането на премутантните алели и пълните мутации, поради което за момента не намира широко приложение в диагностиката.

Възможно е полимеразната верижна реакция да се извърши и с флуоресцентно белязани праймери и последваща детекция на амплификационните продукти на автоматичен секвенатор [Khaniani et al., 2008; Yim et al., 2008]. Този метод за момента се оказва най-удачен за диагностика и позволява максимално прецизно определяне на броя CGG повтори с отклонение ± 1 . За пълно изясняване размера на премутантен алел и пълна мутация се налага комбиниране на този PCR с друг вид анализ при всеки конкретен пациент.

В последните години в диагностиката на генетични заболявания широко навлиза нов модерен метод, комбиниращ класическите техники на хибридизация, лигиране и амплификация в една реакция. Методът се нарича мултиплексна лигазно зависима амплификация (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MLPA) (Фигура 16) [Schouten et al., 2002; www.mlpa.com].



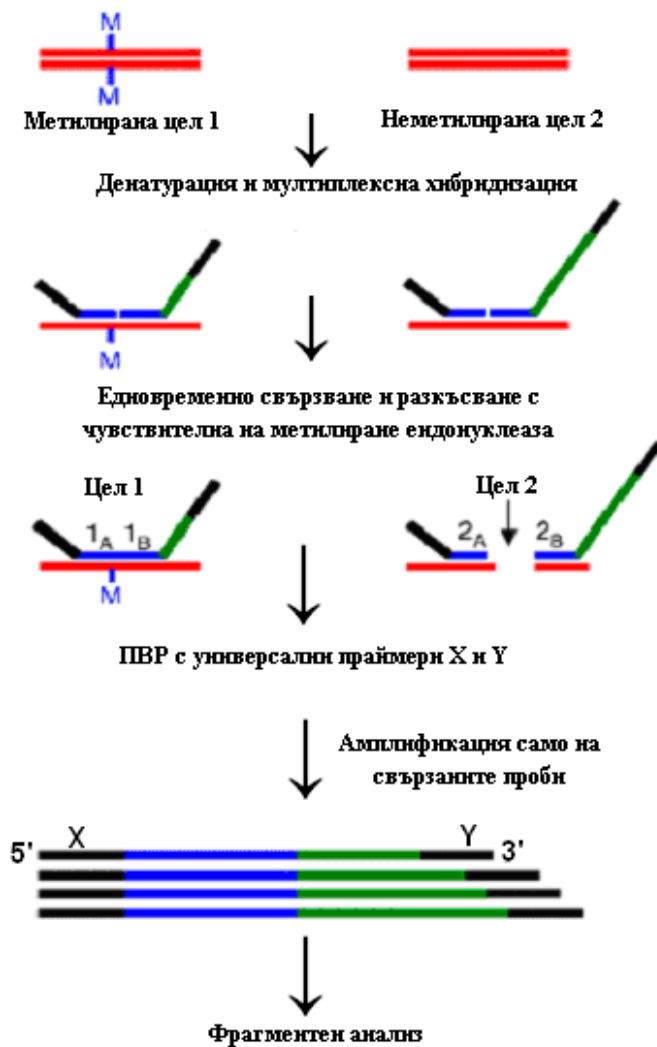
Фигура 16. Принцип на метода MLPA [Schouten et al., 2002; www.mlpa.com].

За всяка прицелна последователност (Target A и Target B) се дизайнират по две специфични сонди. Към всяка от сондите са прикачени специфични секвенции, които се разпознават от праймерите X и Y. Двата края на специфичните сонди се лигираат със специфичен лигазен ензим

Този метод позволява детекция на големи делеции и дупликации, чрез анализ на броя копия, получени в хода на амплификацията (copy number test, CNT) (Фигура 17). В допълнение методът е приложим за анализ на метилирани и неметилирани геномни фрагменти (methylation specific MLPA, MS-MLPA) и на тази база дава информация за отклонения в метилирането (methylation test, MT) (Фигура 17). Метилирането на ДНК представлява добавяне на метилова група към азотната база цитозин в CG динуклеотидни повтори. Районите от ДНК, съдържащи голям процент от тези динуклеотиди се наричат CpG острови и често са локализирани в промоторния регион на гените. Ако промоторът на даден ген е метилиран, то генът няма да се транскрибира и съответният белтък няма да се произвежда. В човешкия геном около 1% от ДНК е метилирана.

Трябва да се подчертае изключително бързото навлизане на този метод в диагностиката на все по-голям брой генетични заболявания. Лесното му и бързо изпълнение, ниска себестойност на анализа и висока надеждност на получените резултати го правят предпочитан метод, успешно заместващ стандартните използвани до момента техники.

MS-MLPA тест [www.mlpa.com] беше разработен и за анализ на FMR1 и FMR2 гените, позволяващ оценка на метилирането, лесна и бърза интерпретация на хиперметирана пълна мутация, както и оценка наличието на делеции и дупликации по дължината на тези гени.



Фигура 17. Принцип на MS-MLPA метода [Nygren et al, 2005]

Подобно на класическия MLPA анализ, първоначално геномната ДНК се подлага на денатурация и хибризация със специфични сонди, някои от които хибрилизират към последователности разпознавани от рестрикционната ендонуклеаза HhaI. Следва реакция на лигиране и едновременно с това подлагане на рестрикция с ензима HhaI, който е чувствителен на метилиране. В последствие лигираните фрагменти се размножават чрез PCR. Пробата, която не е срязана от ензима е метилирана, тя ще се амплифицира и дава PCR продукт. Ако CpG мястото не е метилирано, образувания комплекс ДНК/сонда ще се среже от ендонуклеазата и при последващата амплификация няма да се получи продукт. Получените

амплификационни продукти се подлагат на фрагментен анализ на автоматичен секвенатор.

За всяка ДНК проба MS-MLPA анализа се провежда с и без рестрикционната ендонуклеаза HhaI. В хода на всеки анализ се използват нормална контрола и контрола болен, носител на пълна мутация.

При ДНК диагностиката на синдром на "чуплива" X-хромозома чрез MS-MLPA хиперметирането се детектира чрез използването на рестрикционен анализ с ензима HhaI. Рестрикционната ендонуклеаза HhaI разпознава и реже неметирана ДНК. При

експандиране и пълна мутация, което води до хиперметиране на CGG повтора, ДНК не се реже от ензима HhaI и на електроферограмата се отчита наличие на фрагмент. Ако фрагментът не е метилиран (т.е. при нормална проба без пълна мутация), то той се срязва от рестриктазата и не се отчита фрагмент на електроферограмата.

Методът позволява бързо и сравнително евтино да се анализират много големи експанзии на CGG-повтора, които не могат да се амплифицират с полимеразна верижна реакция. Това го прави подходящ метод за комбиниране с PCR амплификацията, при изясняване генотипа на всеки конкретен пациент. Голямо предимство на метода е, че с него могат да се изследват и големи делеции/дупликации в FMR1 и FMR2 гените, които макар и по-рядко също са причина за заболяването FXS и които с класическите методи на диагностика се пропускат.

Уникалният дизайн на метода в две реакции CNT и MT дава възможност за идентифициране на:

- големи делеции (чрез CNT се установява загуба на сигнал за съответния генен регион – при момчета е налична една X хромозома);
- големи дупликации (чрез CNT се наблюдава удвояване на сигнал за съответния генен регион);
- хиперметиране (чрез MT се наблюдава поява на пикове, които нормално трябва да липсват при неметирана проба).

Фрагментите се сравняват като площ на получените пикове, както в рамките на една проба, така и спрямо контролни проби, анализирани едновременно с изследвания пациент. Освен това важна информация носи и сравняването на профилите от CNT и MT при един и същи пациент.

1.3.2. МЕТОДИ ЗА ДИАГНОСТИКА НА СИНДРОМ НА RETT

Поради естеството на мутациите, причиняващи синдром на Rett (главно точкови мутации, малки делеции и инсерции), използваните техники за анализ се основават на амплификация на кодиращите региони и екзон/интронните граници на прицелните гени. Получените амплификационни продукти могат да бъдат изследвани за търсене на мутации посредством анализ на полиморфизми в дължината на рестрикционните фрагменти (single strand polymorphism, SSCP), хетеродуплексен анализ и други техники. Основен недостатък на тези пре-скриниращи методи е бавното им изпълнение и възможността за откриване само на около 80% от генетичните изменения в анализирания регион. В последно време всички тези пре-скриниращи техники за търсене

на мутации се заместват с приложението на PCR в реално време (real time PCR) за търсене на конкретни известни мутации в даден генен регион.

Като златен стандарт за откриването на точкови мутации, малки делеции и дупликации се приема директно секвениране по Sanger [Sanger et al., 1977]. Този метод, макар и по-скъп от пре-скриниращите методи се оказва много удобен за диагностика поради бързото и лесно изпълнение в автоматизиран вариант чрез автоматични секвенатори и практически 100%-ова детекция на наличните генетични изменения в даден генен регион.

Наличните до момента ДНК диагностични методи за анализ на изброените по-горе гени имаха някои сериозни ограничения. Големите делеции и дупликации до скоро оставаха неидентифицирани, поради липсата на надежден диагностичен метод откриващ този тип дефекти. Основно ДНК диагностиката се базираше на пълно секвениране на кодиращата последователност на тези гени екзон по екзон, като този тип анализ изпуска големи дефекти (делеции и дупликации), обхващащи повече от един екзон.

С цел по-прецизно изясняване на генните дефекти в посочените по-горе гени и тук се разработи и въведе в рутинната практика новият метод за геномно профилиране Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) (виж Фигура 16). Приложението на този метод за откриване на делеции и дупликации позволява едновременно да се анализират до 45 нуклеотидни фрагмента в една реакция, като се оценява количествено броят копия, получени при амплификацията на всеки фрагмент. Амплификационните продукти се разделят на автоматични секвенатори, както в гелово, така и в капиларно изпълнение.

Уникалният дизайн на метода дава възможност за идентифициране на:

- големи делеции (чрез загуба на сигнал за съответния генен регион – при една X хромозома или намаляване на сигнала наполовина – при 2 X хромозоми);
- големи дупликации (чрез удвояване на сигнал за съответния генен регион).

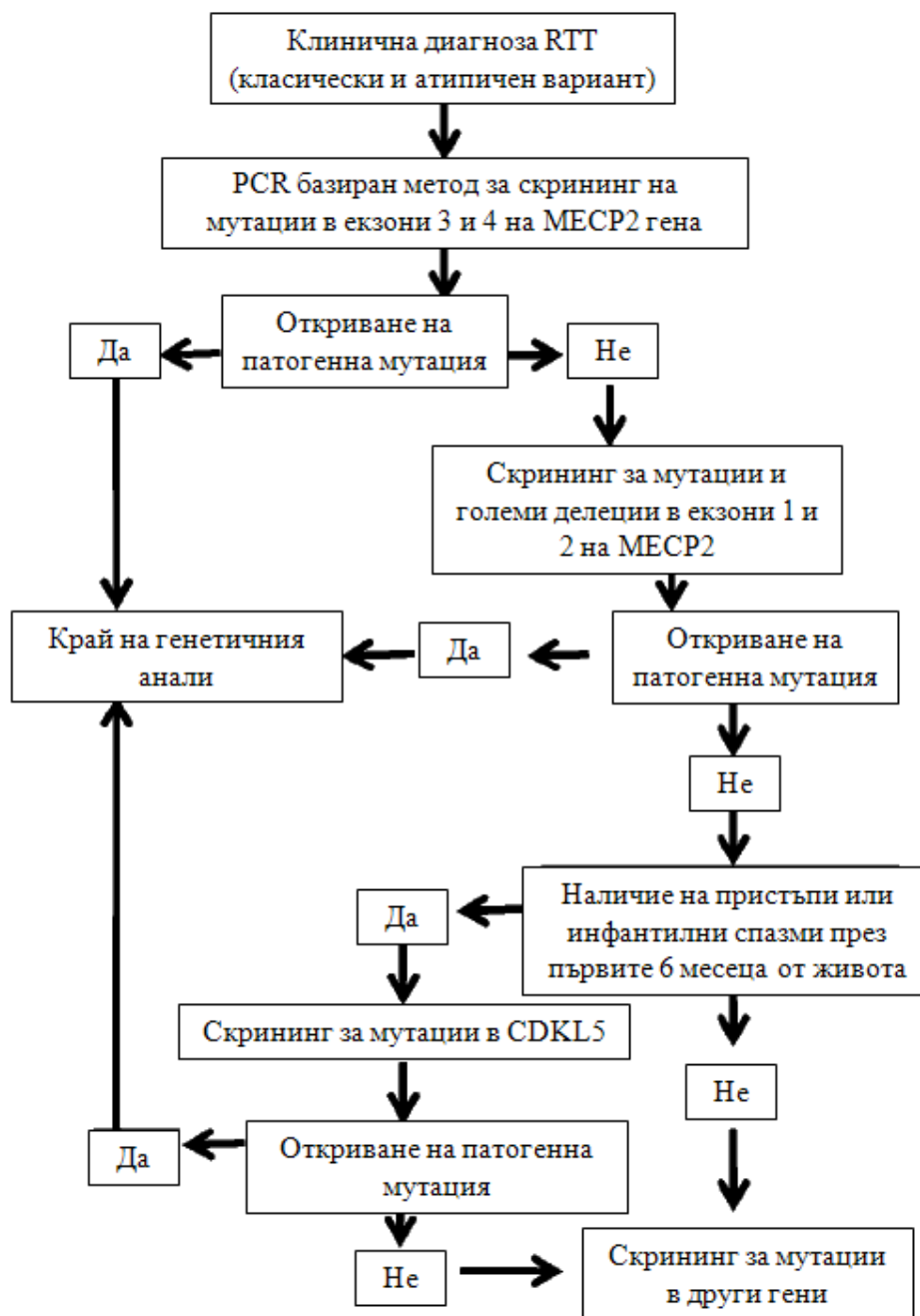
Фрагментите се сравняват като площ на получените пикове, както в рамките на една проба, така и спрямо контролни проби, анализирани едновременно с изследвания пациент.

Разработените китове за MLPA анализ при пациенти с Rett и Rett-like синдром покриват гените MECP2, CDKL5, NTNG1 и ARX. Данните за големи делеции/дупликации по дължината на тези гени са съвсем оскъдни в литературата. Освен това точкови мутации/полиморфизми, разположени много близко до участъка за лигиране на сондите, биха могли да доведат до намаляване на амплификационния сигнал

и да покажат MLPA профил идентичен с този при делеции. По тази причина, делеции на един екзон трябва да бъдат верифицирани с друг независим метод или да бъде секвениран видимо делетираният екзон за проверка наличието на точкови замени в него.

С помощта на MLPA метода за детекция на мутации в гени, мутации в които водят до изява на Rett синдром или Rett-подобни форми се очаква изясняване на процента големи делеции/дупликации, отговорни за тези генетични заболявания. Освен това, значително ще бъде подобрена генетичната диагностика на този вид заболявания, характеризиращи се с много близка клинична симптоматика.

Понастоящем молекулярно-биологичната диагностика на пациент с предполагаема диагноза Rett синдром започва със секвениране на MECP2 гена, в който се предполага че попадат около 90-95% от мутациите, причиняващи класически Rett синдром [Williamson and Christodoulou, 2006]. Като втора стъпка се препоръчва търсенето на големи делеции/дупликации в MECP2 гена (Фигура 18). В случай, че не се открие мутация в този ген, ако пациентката има гърчове и инфантилни спазми се преминава към търсене на мутации в CDKL5 или се обсъжда изследването на други гени като Netrin G1, FoxG1 и др. (Фигура 18). Всички изследвания за мутации в Netrin G1 гена за момента са безрезултатни [Archer et al., 2006b], докато за гена FoxG1 вече има ясни доказателства, че мутации в този ген причиняват конгенитална форма на RTT [www.mecp2.chw.edu.au].



Фигура 18. Системен подход за генетично изследване при пациенти с RTT

[Williamson and Christodoulou, 2006]

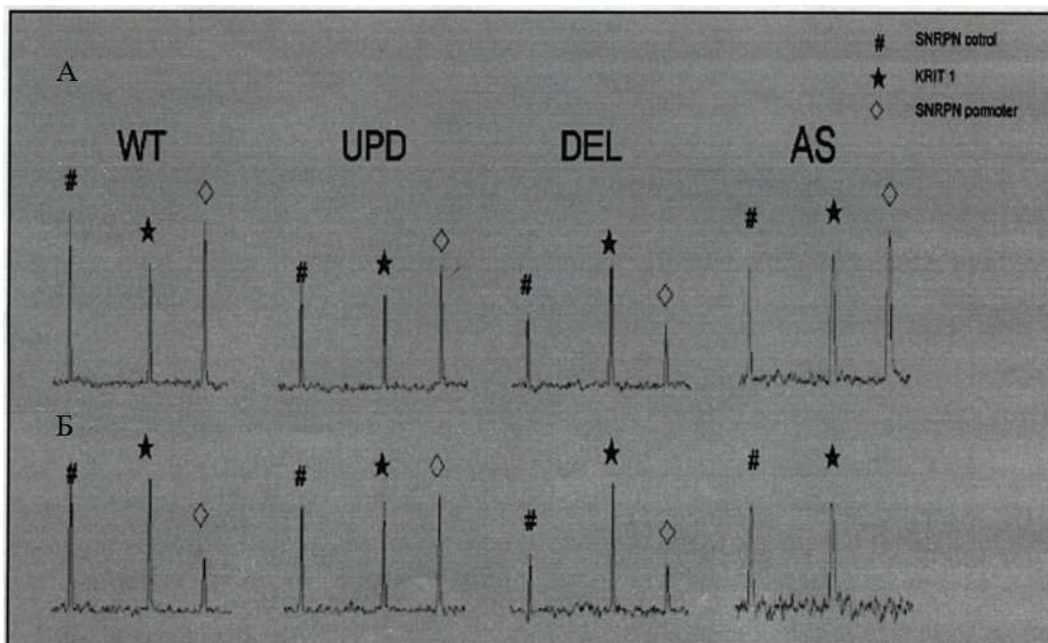
1.3.3. МЕТОДИ ЗА ДИАГНОСТИКА НА СИНДРОМИ НА PRADER-WILLI/ANGELMAN (PWS/AS)

Класическата цитогенетика не може да постави диагноза PWS/AS. С този метод могат да бъдат доказвани единствено транслокации, ангажиращи 15-та хромозома [Nakao et al., 1994; Nicholls, 1994; Zieve and Sauterer, 1990].

Флуоресцентната *in situ* хибридизация (FISH) със специфична сонда за региона 15q11-13 успешно може да детектира само делеционната форма, но това е един много скъп метод.

Редица методи са разработени с цел интерпретация на метилирането в PWS/AS региона на 15-та хромозома. Такъв метод е Southern blot хибридизацията [Dittrich et al., 1992; Glenn et al., 1996], който обаче е много трудоемък анализ и изисква голямо количество ДНК с добро качество [Martinez et al., 2006]. Този недостатък на Southern blot анализа беше преодолян в последствие с разработването на методи базирани на PCR, които също изследват метилирането в даден хромозомен регион. За целта се използва третиране на ДНК със натриев бисулфит, който конвертира неметиления цитозин в урацил без да променя метилирания цитозин. Амплификацията се извършва посредством специфични праймери за майчиния и бащиния алел [Kubota et al., 1997; Kosaki et al., 1997].

В последно време беше разработен мултиплексен количествен PCR за детекция генни пренареждания, делеции и дупликации, който се интерпретира след капилярна електрофореза [Markoulatos et al., 2002; Hung et al., 2006]. Модерна модификация на този метод е извършването на специфичен по отношение на метилирането мултиплексен PCR (methylation-specific multiplex PCR), който се базира на триплексна амплификация на един контролен генен регион (KRIT1 гена), екзон 20 на SNRPN гена за интерпретация на делеции и промоторния регион на SNRPN гена за интерпретация на унипарентна дизомия след рестрикция с HhaI рестриктаза, специфична по отношение на метилирането (Фигура 19) [Lin et al., 2008]. В панел А (преди рестрикция с HhaI) съотношението между пиковете на SNRPN контрола и SNRPN промотор към пика за KRIT1 гена е наполовина при PWS делеция спрямо това при див тип. Унипарентната дизомия в панел А не се отличава като съотношение на пиковете спрямо нормална контрола. Същото се отнася и за пациент с AS. В панел Б (след рестрикция с HhaI) при PWS пациенти с унипарентна дизомия двете майчини копия на SNRPN промотора са метилирани и следователно не се разпознават от HhaI (няма рестрикция). Получава се двойно по-висок фрагмент в сравнение с див тип и PWS пациент с делеция, където бащиното копие на SNRPN е неметирано в промотора, разпознава се от HhaI (има рестрикция) и не се амплифицира – получава се наполовина намален фрагмент.



Фигура 19. Специфичен по отношение на метилирането мултиплексен PCR (methylation-specific multiplex PCR) - триплексна амплификация на един контролен генен регион (KRIT1 гена), екзон 20 на SNRPN гена за интерпретация на делеции и промоторния регион на SNRPN гена за интерпретация на унипарентна дизомия след рестрикция с HhaI рестриктаза, специфична по отношение на метилирането [Lin et al., 2008]

(А) – Преди рестрикция с HhaI

(Б) – След рестрикция с HhaI

WT – див тип; **UPD**– унипарентна дизомия; **DEL** – делеция; **AS** – синдром на Ангелман.

Модерна техника, използвана в диагностиката на PWS/AS е високочувствителна мелтинг система (High resolution melting system, HRM), използваща отново бисулфитно третирана ДНК [Lin et al., 2008]. Недостатък на всички методи използващи бисулфитно третирана ДНК е трудоемкото изпълнение на методиката за третиране и това, че натриевият бисулфит е мощен карциногенен фактор.

Използването на бисулфитно конвертирана ДНК се избягва с въвеждането на специфичен по отношение на метилирането MLPA анализ (methylation specific MLPA, MS-MLPA) [www.mlpa.com], който се базира на извършването на две реакции: тест за брой копия (copy number test, CNT) и тест за метилиране, с участието на HhaI рестриктаза (methylation test, MT, HhaI restriction) (виж подробното описание на

методиката при FXS). Този метод се използва успешно за диагностика на PWS/AS, като открива делеции и доказва унипарентна дизомия [Procter et al., 2006; Dikow et al., 2007].

Уникалният дизайн на метода в две реакции CNT и MT дава възможност за идентифициране на:

- големи делеции (чрез CNT се установява намален наполовина сигнал за съответния генен регион);

- големи дупликации (чрез CNT се наблюдава удвояване на сигнал за съответния генен регион);

- оценка статуса на метилиране (чрез MT се наблюдава двойно по-висок пик при унипарентна дизомия и намален наполовина пик при делетирана или нормална проба).

Фрагментите се сравняват като площ на получените пикове, както в рамките на една проба, така и спрямо контролни проби, анализирани едновременно с изследвания пациент. Освен това важна информация носи и сравняването на профилите от CNT и MT при един и същи пациент.

Молекулярно-генетичната диагностика на AS включва всички техники описани до момента за PWS. Всички тестове оценяващи метилирането при AS показват загуба на фрагменти, тъй като наличието само на бащин неметилиран фрагмент (при делеция) или на два бащини неметилирани фрагменти (при унипарентна дизомия) води до срязване на неметилираните фрагменти чрез специфичната рестриктаза HhaI и загуба на сигнал. Около 20% от AS пациентите нямат отклонение в броя копия и метилирането на 15 хромозома (нямат делеции или унипарентна дизомия 15) и се нуждаят от допълнителни изследвания за търсене на точкови мутации в UBE3A гена [Kishino et al., 1997; Matsuura et al., 1997; Malzac et al., 1998; Fang et al., 1999; Rapakko et al., 2004]. Този ген има 16 екзона и се налага пълно секвениране на всички кодиращи региони и екзон/интронните граници за поставяне или пълно отхвърляне на диагнозата.

1.3.4. МЕТОДИ ЗА ДИАГНОСТИКА НА МИКРОДЕЛЕЦИОННИ СИНДРОМИ

Класическият цитогенетичен анализ диагностицира надеждно хромозомни транслокации, ангажиращи хромозома 7 и хромозома 4, които биха могли да са причина за WBS и WHS, респективно. Големи делеции върху тези хромозоми също могат да се диагностицират чрез конвенционалния прометафазен хромозомен анализ [Anvert et al., 1991; Thies et al. 1992].

Микроделеции и малки транслокации, засягащи хромозоми 7 и 4 могат да бъдат надеждно диагностицирани с флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH) [Estabrooks et al., 1992; Goodship et al., 1992; Osborne, 1999].

В последните години модерният MLPA анализ дава възможност за бърза и надеждна диагностика на микроделеционни синдроми, включително WBS и WHS [www.mlpa.com]. Разработени са различни варианти китове за детекция на микроделеционни синдроми [www.mlpa.com].

Подробното описание на метода е представено по-горе при анализ на делеции и дупликации в MECP2 гена.

Уникалният дизайн на метода дава възможност за идентифициране на:

- големи делеции (чрез намаляване сигнала на амплификационния продукт наполовина);
- големи дупликации (чрез удвояване на сигнал за съответния генен регион).

Фрагментите се сравняват като площ на получените пикове, както в рамките на една проба, така и спрямо контролни проби, анализирани едновременно с изследвания пациент.

С помощта на този количествен анализ в една реакция бързо могат да бъдат диагностицирани голям брой синдроми, дължащи се на различни по големина хромозомни делеции или дупликации. Наличието на повече от една специфична сонда за всеки рисков регион прави анализа високо надежден за реална диагностика при пациенти. С помощта на този вид анализ може да се извършва и пренатална диагностика, защото изследването е бързо и изисква малко количество ДНК. Този комбиниран тест за микроделеционни синдроми е един от препоръчителните пренатални тестове при отхвърлени хромозомни аномалии, но наблюдавана сърдечно-съдова патология при плода.

1.4. ОБОБЩЕНИЕ НА ЛИТЕРАТУРНИТЕ ДАННИ

Прецизната клинична диагноза в изброените по-горе синдроми с умствено изоставане често се нуждае от потвърждение на молекулярно-генетично ниво. Единствено на базата на молекулния дефект е възможно определяне на точния тип заболяване сред голямата група синдроми, характеризиращи се с умствено изоставане. Изясняването на молекулните основи на заболяването при всеки пациент е от значение както за прогнозиране хода на заболяването и на тази база прилагане на правилна терапия, така и за адекватното генетично консултиране на засегнатото семейство.

Клинично представените синдроми с умствено заболяване са описани средата на миналия век, а молекулярно-генетичните им характеристики са изяснени 90-те години на миналия век. В технологическо отношение, молекулярно-генетичната диагностика имаше редица проблеми при прецизното определяне на големи експанзии, изясняването на генни дефекти свързани с неправилно метилиране и патология в импринтването на гени и хромозомни региони, както и детектирането на синдроми, свързани с микроделеции/микродупликации на хромозомни региони. Секвенционният анализ, признат като “златен стандарт” за детектиране на точкови мутации и малки делеции/инсерции/дупликации, в радиоактивно изпълнение, преди ерата на лазерните автоматични секвенатори, също беше трудоемък, бавен и ниско ефективен метод за диагностика.

По тази причина, усилията в последните години бяха насочени към разработването на нови високоефективни, автоматизирани, модерни технологии, с помощта на които молекулярно-генетичната диагностика коренно се промени, като възможност за прецизиране на генните дефекти, като бързина и качество на анализа и до голяма степен като почти напълно автоматизиран и компютъризиран процес. Предимствата и недостатъците на дискутираните молекулярно-диагностични методи са представени в Таблица 1.

Нашите усилия в областта на молекулярно-генетичната диагностика също са насочени от една страна към разработването на нови модерни методики за анализ, а от друга, съвместно с клиницистите, към изясняване молекулните характеристики на синдроми, характеризиращи се с умствено изоставане в България. Очаква се съществен процент от пациентите с умствено изоставане да бъдат изяснени на молекулярно-генетично ниво и на тази база на семействата да бъде предложена адекватна генетична консултация и профилактика.

Таблица 1. Предимства и недостатъци на дискутираните молекулярно-диагностични методи.

Метод	Предимства	Недостатъци
Цитогенетичен анализ	Евтин; диагностицира големи експанзии, делеции, дупликации и транслокации	Ниска разделителна способност
FISH	По-голяма разделителна способност от цитогенетиката	Скъп, трудоемък, изисква специфична апаратура
Геномна рестрикция / хибридизация по Southern	Детектира норма, премутации, пълни мутации, мозайки; интерпретира метилиране	Трудоемка, дълга процедура, изисква работа с изотоп или канцерогенни реагенти; изисква присъствието на много контроли; изисква голямо количество ДНК – трудно приложим за пренатална диагностика; не определя точно броя повтори
PCR/хибридизация по Southern	По-бързо и лесно изпълнение; изисква по-малко количество ДНК	Не детектира големи премутации и пълни мутации; изисква присъствието на много контроли; не интерпретира метилиране
PCR/TP-PCR	Бърз, евтин, изисква малко количество ДНК; подходящ за скрининг и пренатална диагностика.	Не определя размера на премутантните и мутантни алели; не интерпретира метилиране
PCR/флуоресцентна детекция	Бърз, евтин, изисква малко количество ДНК; подходящ за скрининг и пренатална диагностика; определя точно размера на алелите с точност ± 1 повтор; не изисква едновременното анализиране на контроли	Не определя размера на премутантните и мутантни алели; не интерпретира метилиране; изисква комбиниране с друг метод
Специфичен по отношение на метилирането мултиплексен PCR (MS-PCR)	Бърз, евтин, лесен за изпълнение; интерпретира метилиране	Изисква бисулфитно конвертиране на ДНК
MLPA	Бърз, евтин, лесно изпълнение; детектира големи делеции и дупликации; понякога детектира точкови мутации и полиморфизми; анализира голям брой фрагменти (синдроми) в една реакция; изисква малко количество ДНК; подходящ за пренатална диагностика.	Изисква комерсиални китове; изисква специфична апаратура
MS-MLPA	Всички предимства за MLPA + интерпретира метилиране като избягва бисулфитното конвертиране на ДНК; доказва унипарентна дизомия	Изисква комерсиални китове; изисква специфична апаратура
PCR/SSCP/хетеродуплексен анализ	Евтин	Бавно изпълнение; детектира максимум 80% от мутациите
Real time PCR	Бърз анализ	Изисква специална апаратура; изисква калибриране спрямо контроли; за неизвестни мутации изисква потвърждаващ метод (комбиниране със секвениране)
Секвениране по Sanger	Бърз, лесен, автоматизиран; детектира 100% точкови и малки мутации	По-скъп, изисква автоматичен секвенатор; не детектира големи делеции, дупликации, инверсии, експанзии

Останалите пациенти, с все още неизяснен дефект са подготвени и представляват база за нови проучвания чрез микрочипов анализ и секвениране от нова генерация на целия геном или на цели хромозоми с цел търсене на нови гени и генни локуси, мутации в които са отговорни за синдроми с умствено изоставане.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

2.1. ЦЕЛ

Изясняване на молекулните характеристики на синдроми, свързани с умствено изоставане, за диагностика и профилактика в засегнатите семейства.

2.2. ЗАДАЧИ

2.2.1. FXS

- 2.2.1.1. Въвеждане и оптимизиране на методи за анализ на CGG експанзията в FMR1 гена.
- 2.2.1.2. Приложение на разработените методи за диагностика при група български пациенти с FXS и техните семейства.
- 2.2.1.3. Провеждане на допълнителни изследвания в други гени при генетично неизяснените пациенти.

2.2.2. RTT

- 2.2.2.1. Въвеждане и оптимизиране на методи за анализ на гени, мутации в които са свързани с RTT.
- 2.2.2.2. Разработване на математически алгоритъм за оценка на големи делеции/дупликации, детектирани чрез MLPA.
- 2.2.2.3. Приложение на разработените методи за диагностика при група пациенти с RTT.
- 2.2.2.4. Изработване на системен подход за молекулярно-генетична диагностика при пациенти с RTT.
- 2.2.2.5. Провеждане на допълнителни изследвания в други гени при генетично неизяснените пациенти.
- 2.2.2.6. Сравнение на получените резултати с публикуваните данни. Модели на мутагенеза.

2.2.3. PWS/AS

- 2.2.3.1. Въвеждане и оптимизиране на методи за анализ на делеции и унипарентна дизомия в региона на 15-та хромозома (15q11-q12).
- 2.2.3.2. Приложение на разработените методи за диагностика при група български пациенти с PWS/AS.
- 2.2.3.3. Провеждане на допълнителни изследвания в други гени при генетично неизяснените пациенти.
- 2.2.3.4. Сравнение на получените резултати с публикуваните данни

2.2.4. MDS

- 2.2.4.1. Въвеждане и оптимизиране на метод за анализ на микроделеционни синдроми.
- 2.2.4.2. Приложение на разработения метод за диагностика при български пациенти с WBS, WHS, DGS.

2.2.5. Обобщение на получените резултати

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. МАТЕРИАЛИ

3.1.1. КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ

Молекулярно-генетичните изследвания са проведени общо при **90 пациента**, около 0.1% от пациентите с умствено изоставане у нас, при които се очаква генетична причина за изява на заболяването [Ангелова, 1994]. На базата на клиничната диагноза пациентите са групирани както следва:

- 32 момчета са с клинична диагноза синдром на чуплива X хромозома;
- 38 момичета са с клинична диагноза Rett синдром;
- 13 пациенти с клинична диагноза PWS;
- 3 пациенти с клинична диагноза AS;
- 2 пациенти с клинична диагноза Williams-Beuren синдром;
- 1 пациенти с клинична диагноза Wolf-Hirschhorn синдром;
- 1 пациенти с клинична диагноза DiGeorge синдром;

Всички изследвани пациенти са спорадични и неродствени. От пациентите с RTT 4 са с румънски произход, всички останали пациенти са с български произход.

В допълнение са изследвани още 45 здрави родственици (41 майки и бащи и 4 братя и сестри) на засегнатите деца.

В разработването на диагностичните методики са използвани следните контролни ДНК проби предоставени от Institute of Human Genetics, University of Muenster, Germany и Institute of Human Genetics, University of Wuerzburg, Germany:

- 6 жени носителки на премутация в FMR1 гена
- 2 момчета с пълна мутация в FMR1 гена
- 2 пациента с доказана диагноза Angelman синдром

Пациентите са клинично диагностицирани и насочени за ДНК анализ от:

Специализирана Болница за Активно Лечение по Детски Болести ЕАД, гр.София
Университетска Специализирана Болница за Активно Лечение по Неврология и Психиатрия „Св. Наум”, гр. София

Многопрофилна Болница за Активно Лечение „Св. Марина” гр. Варна

Университетска Многопрофилна Болница за Активно Лечение Александровска,
гр. София

Регионални педиатрични, неврологични центрове и генетично-консултативни
звена.

Carol Davila University of Medicine, Pediatric Neurology Clinic, Al Obregia
Hospital, Bucharest, Romania.

Настоящото изследване е финансирано частично по договор 8-Д/2008 и 27/2009
на МУ- София.

Клиничната диагноза е поставена на базата на стандартни клинични и
лабораторни изследвания: оценка на характерните дисморфични стигми, поведенчески
фенотип и степен на умствено изоставане, генеалогичен анализ, ЕЕГ, хромозомен
анализ (кариограма) и др.

При една част от изследваните деца родителите съобщават тежко боледуване,
например коклюш, ваксинация и др. като отключващ фактор за поява на първите
симптоми на заболяването.

3.1.2. БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ

При провеждане на изследвания на генетични заболявания на ниво ДНК и в
частност при изследванията, извършени в настоящия дисертационен труд се използва
високомолекулна ДНК, изолирана от левкоцити от венозна или капилярна кръв, както и
ДНК изолирана от букална лигавица.

Използват се 3-6 ml венозна кръв, взета в пластмасова епруетка (тип
вакутейнер) и антикоагулант етилен диамин тетраацетат – натриева сол (ЕДТА).
Капилярна кръв се взема в пластмасови епруетки от 1 ml със същия антикоагулант
ЕДТА. Клетки от букална лигавица се събират във вода в епруетки тип Eppendorf 1.5
ml чрез остъргване на лигавица от вътрешната страна на бузата с пластмасова шпатола
и промиване на шпатолата във водата в епруетката.

Кръвните проби се взема след нахранване и се съхранява на +4°C до времето за
обработка (за изолиране на високомолекулна ДНК се съхранява не повече от 48 часа).

В случаите на пренатална диагностика, ДНК се изолира от хорионни вѐси, взети
чрез биопсия на хорион или от амниотични клетки, получени чрез амниоцентеза.

3.2. МЕТОДИ

3.2.1. ПРЕДНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА МАТЕРИАЛА

3.2.1.1. Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв по солевия метод

Принцип:

- разрушаване на червените кръвни клетки;
- утаяване на ядрените клетки;
- разрушаване на ядрените клетки;
- преципитация на белтъците;
- преципитация на ДНК.

Процедура:

Лизиране на еритроцитите и утаяване на ядрените клетки:

В 50 ml стерилна конична пластмасова епруветка се излива 10 ml венозна кръв и се добавят 30 ml студен лизиращ буфер. Разбърква се добре и се инкубира 30 min в лед, като от време на време епруветките се разклащат. Центрофугира се 15 min при 3000rpm и температура +4°C. Надстоящата течност се отлива внимателно и се изхвърля. Епруветките се оставят да се отцедят върху филтърна хартия.

Утайката се ресуспендира в 10 ml студен лизиращ буфер и се центрофугира още веднъж при същите условия. Надстоящата течност се отлива внимателно.

Лизиране на ядрените клетки.:

Получената от предходния етап утайка, съдържаща ядрените клетки, се ресуспендира в 5ml SE (нуклеолизиращ) буфер. Добавят се 25 µl протеиназа К (10mg/ml) и 250 µl 10%-ен натриев додецил сулфат (SDS). Разбърква се леко и се инкубира на 37°C за цяла нощ или на 55°C за 5 часа.

Утаяване на белтъците:

След протеолизата се добавят 1.4 ml преситен (6M) натриев хлорид (NaCl) и се разбърква на вортекс. Центрофугира се 15 min на 3000rpm при стайна температура, за да не преципитира SDS. Белтъците се утаяват на дъното.

Преципитация на ДНК:

Надсточщата течност, съдържаща ДНК, се отлива внимателно в нова 50 ml стерилна конична пластмасова епруветка и се добавят 2 обема ледено студен абсолютен етанол. При тези условия ДНК видимо преципитира и изплува на повърхността, обира се със стерилна (обгорена) пастърка и се промива в 70%-тен етанол. Изсушава се на въздух и се разтваря в стерилен TE буфер.

Буфери използвани за изолирането на ДНК:

Лизис буфер (pH=7.4): NH_4Cl - 155mM; KHCO_3 – 10mM; Na_2EDTA – 0.1mM

SE буфер (pH=8.0): NaCl – 75mM; Na_2EDTA – 25 mM

TE буфер (pH=7.4): TRIS/HCl (pH=7.4) – 10mM; EDTA (pH=8.0) – 1mM

Апаратура:

Центрофуга Hermle, Germany, центрофуга MiniSpin Eppendorf ; вортекс Heidolph Reax Top; термостат Memmert, Germany

3.2.1.2. Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна, капилярна кръв, букална лигавица или от фетални клетки (хорионни въси или амниотични клетки) по фенол-хлороформен метод

Принцип:

- разрушаване на клетките и клетъчните ядра;
- екстрахиране на белтъците;
- преципитация на ДНК.

Процедура:

Разрушаване на клетките и клетъчните ядра:

Изходните клетки се поставят в епруветка тип Eppendorf от 1.5 ml и към тях се добавят 500µl SE-буфер, 25 µl 10%-ен натриев додецил сулфат (SDS) и 25 µl протеиназа К (10mg/ml). Разбърква се леко и се инкубира се на 55°C за 3-4 часа.

Екстрахиране на белтъците:

След протеолизата в епруветката се добавят 300µl фенол (pH=8.0) и 300µl хлороформ/изоамилов алкохол в съотношение 24:1. Разбърква се интензивно на вортекс и се центрофугира 15 min на 12000rpm.

Преципитация на ДНК:

Горната фаза се прехвърля в нова Eppendorf-епруветка чрез внимателно отпипетиране без да се увлече интерфазата. Добавя се 1/10 от обема 3М натриев ацетат (CH₃COONa) и внимателно се размесва. Добавят се 2 обема ледено студен абсолютен етанол и се инкубира 30 min на -70°C. Центрофугира 15 min на 13000rpm. Надутаечната течност се отлива внимателно. Утайката се промива с 0.5 ml 70%-тен етанол, след което се центрофугира 10 min на 13000rpm. Надутаечната течност се отлива и утайката се суши на въздух. Утайката се разтваря в TE буфер.

Буфери използвани за изолирането на ДНК:

SE буфер (pH=8.0): NaCl – 75mM; Na₂EDTA – 25 mM

TE буфер (pH=7.4): TRIS/HCl (pH=7.4) – 10mM; EDTA (pH=8.0) – 1mM

Апаратура:

Центрофуга MiniSpin Eppendorf ; вортекс Heidolph Reax Top; термостат Memmert, Germany

3.2.1.3. Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв чрез кит Qiagen, Hilden, Germany

Принцип:

Изолиране на ДНК базирано на взаимодействието между силика-гел мембрана и ДНК.

Процедура: Следват се инструкциите на производителя (QIAmp DNA Blood Mini Kit)

Апаратура:

Центрофуга MiniSpin Eppendorf ; вортекс Heidolph Reax Top; Biore Thermo E термоблок

3.2.1.4. Бисулфитно конвертиране на ДНК

Принцип:

Метилираните и неметилирани алели се модифицират различно в присъствието на натриев бисулфит [Clark et al., 1994]. Натриевият бисулфит конвертира цитозиновите остатъци до урацилови остатъци в едноверижни ДНК фрагменти, докато метилираният цитозин (5-метилцитозин) остава непроменен. В хода на последващата амплификация цитозиновите остатъци представляват метилирани остатъци в изходната верига, докато неметилираният цитозин, конвертиран в урацил се детектира като тимин в получения амплификационен продукт. По този начин бисулфитното конвертиране позволява визуализиране и разграничаване на метилиран от неметилиран фрагмент. Метилираният хомолог е неактивен, докато неметилираният е транскрипционно активен. В настоящия дисертационен труд бисулфитно конвертирана ДНК се използва в молекулярната диагностика на PWS/AS.

Процедура:

За бисулфитното конвертиране на ДНК се използва фабричен кит EZ DNA Methylation–Gold™ Kit (Zymo Research, USA).

Към 20 µl от изходната ДНК проба се добавят 130 µl CT Conversion Reagent (този реагент за конвертиране се приготвя непосредствено преди процедурата чрез добавяне на 900 µl вода, 300 µl M-Dilution Buffer и 50 µl M-Dissolving Buffer към една епруветка CT conversion Reagent). Смесената проба с конвертиращия реагент се миксира добре. Бисулфитното конвертиране на ДНК се извършва при следния температурен режим: 98°C за 10 мин. денатурация; 64°C за 2 часа и 30 мин. конвертиране и след това съхранение на 4°C. Към предоставените в кита колонки (Zymo-Spin™ IC Column) се накапват 600 µl M-Binding Buffer и конвертираната проба. Затварят се капачките и се миксира чрез обръщане на колонките. Следва центрофугиране на пълни обороти (>10 000 x g) за 30 сек. Изхвърля се събраната в държателя под колонката течност. Към колонките се добавят 100 µl M-Wash Buffer и се повтаря центрофугирането при същите условия. Изхвърля се събраната течност. Към колонките се добавят 200 µl M-Desulphonation Buffer и се инкубират за десулфониране 15-20 мин. на стайна температура. След стъпката на десулфониране се повтаря центрофугирането при същите условия. Отново се изхвърля събраната в държателя течност. Към колонките се добавят отново 200 µl M-Wash Buffer и се повтаря центрофугирането при същите условия. Изхвърля се събраната течност. Последната

стъпка на промиване се повтаря два пъти. Елуирането на бисулфитно конвертираните ДНК фрагменти се извършва с 10 µl M-Elution Buffer, които се накапват директно върху мембраната в колонките. Колонките се поставят върху 1.5 ml Eppendorf епруветки и се центрофугират кратко за елуиране на бисулфитно конвертираната ДНК.

Апаратура: GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, USA, центрофуга MiniSpin Eppendorf

3.3. АНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА МАТЕРИАЛА

3.3.1. Полимеразна верижна реакция (ПВР; Polymerase chain Reaction; PCR)

• **Протокол за размножаване на CGG повтора в 5' нетранслируемия регион на FMR1 гена (за детекция на агарозна електрофореза или на автоматичен секвенатор)**

За да бъде възможно размножаването на огромния CG богат повтор се използва обогатен на бетаин PCR протокол [Henke et al., 1997; Tassone et al., 2008]. Ролята на бетаина в този амплификационен протокол е дискутирана в глава „Резултати и обсъждане”. Използваните праймери за амплификация на CGG повтора са публикувани [Fu et al., 1991].

Оптималната концентрации на компонентите в реакционната смес за обогатената на бетаин амплификация са посочени в Таблица 2.

Таблица 2. Оптимална концентрация на компонентите участващи в полимеразната верижна реакция за размножаване на CGG повтора в 5' нетранслируемия регион на FMR1 гена.

Компонент на реакционната смес	Обем (µl)
Високомолекулна ДНК	1-2
Праймер F (10pmol/µl) – 5' 6-FAM	1
Праймер R (10pmol/µl)	1
Разтвор на дезоксинуклеотидтрифосфати, дНТФ (5mM)	1
Бетаин (Sigma) 5 M*	5
DMSO 100%	1
10x буфер	2.5

Термостабилна полимераза Phusion® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase, New England Biolabs, Inc., UK 5 U/μl	0.1
Дестилирана вода	До краен обем 25

*Високата концентрация на бетаин беше специфицирана след поредица от експерименти и вариране на концентрацията от 0.5 до 2.5 M.

Оптималната програма за провеждане на ПВР за получаване на специфичен продукт е представена на Таблица 3.

Таблица 3. Оптималната програма за провеждане на ПВР за получаване на специфични продукти на CGG повтора в FMR1 гена.

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	97°C	5 min	1
Денатурация	97°C	35 sec	10
Хибридизация на праймерите	55°C	1 min	
Синтез на нова верига	72°C	2 min	
Денатурация	97°C	35 sec	25
Хибридизация на праймерите	57°C	1 min	
Синтез на нова верига	72°C	3 min	
Краен синтез	72°C	5 min	1

• **Протокол за намножаване на CGG повтора в 5' нетранслируемия регион на FMR1 гена с цел електрофореза в акриламиден гел и последваща хибридизация по Southern**

За класическия метод на намножаване на CGG повтора си използва следния протокол:

Денатурация на ДНК: 3 μg геномна ДНК се подлагат на денатурация с 0.4N NaOH за 10 мин на стайна температура.

Преутаяване: Добавя се 5M Амониев ацетат 1/10 от обема и 96% ледено студен етанол 2.5 обема. Пробите престояват 5 мин на стайна температура и се центрофугират

на 13 000 грм за 15 мин. Следва промиване с 80% етанол и сушене на стайна температура.

Разтваряне на обработените ДНК проби: Пробите се разтварят в 20 μ л дестилирана вода и се подлагат на амплификация.

Използваните праймери за амплификация на CGG повтора са същите [Fu et al.,1991].

Оптималната концентрации на компонентите в реакционната смес за обогатената на бетаин амплификация са посочени в Таблица 4.

Таблица 4. Оптимална концентрация на компонентите участващи в полимеразната верижна реакция за намножаване на CGG повтора в 5' нетранслируемия регион на FMR1 гена с цел последваща хибридизация по Southern.

Компонент на реакционната смес	Обем (μ л)
Денатурирана ДНК	20
Праймер F (50pmol/ μ л)	1
Праймер R (50pmol/ μ л)	1
Разтвор на дезоксинуклеотидтрифосфати, дНТФ (5mM) (100% deaza dGTP)	12.8
Желатин (0.1%)	3.5
DMSO 100%	2
10x буфер	5
Термостабилна полимераза Phusion® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase, New England Biolabs, Inc., UK 5 U/ μ л	0.5
Дестилирана вода	До краен обем 50

Оптималната програма за провеждане на ПВР за получаване на специфичен продукт е представена на Таблица 5.

Таблица 5. Оптималната програма за провеждане на PCR за получаване на специфични продукти на CGG повтора в FMR1 гена.

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	97°C	2 min	1
Денатурация	97°C	30 sec	40
Хибридизация на праймерите	55°C	1 min	
Синтез на нова верига	72°C	1 min	
Краен синтез	72°C	5 min	1

• **Протокол за размножаване на екзони от МЕСР2 гена**

Използваните праймери за амплификация на МЕСР2 гена са публикувани [Amir et al., 1999]

Оптималната концентрации на компонентите в реакционната смес за ПВР са посочени по-долу (Таблица 6).

Таблица 6. Оптимална концентрация на компонентите участващи в полимеразната верижна реакция за размножаване на екзони от МЕСР2 гена.

Компонент на реакционната смес	Обем (µl)
Високомолекулна ДНК	1-2
Праймер F (10pmol/µl)	1
Праймер R (10pmol/µl)	1
Разтвор на дезоксинуклеотидтрифосфати, дНТФ (5mM) (GENET BIO, Chungnam, Korea)	2
10x Prime Taq буфер (GENET BIO, Chungnam, Korea)	2.5
Термостабилна полимераза Prime Taq, (GENET BIO, Chungnam, Korea)	0.1
Дестилирана вода	До краен обем 25

Оптималната програма за провеждане на ПВР за получаване на специфичен продукт е представена на Таблица 7.

Таблица 7. Оптималната програма за провеждане на ПВР за получаване на специфични продукти на екзони от МЕСР2 гена.

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	94°C	5 min	1
Денатурация	94°C	30 sec	35
Хибридизация на праймерите	59°C	40 sec	
Синтез на нова верига	72°C	1 min	
Краен синтез	72°C	5 min	1

● **Протокол за размножаване на екзони от CDKL5 гена**

В настоящото изследване за ензимното размножаване с ПВР на кодиращите райони на CDKL5 гена и заграждащите ги интронни последователности бяха използвани праймери, дизайнирани от нашия екип (секвенциите на праймерите и размера на амплификационните продукти са представени в Таблица 8).

Таблица 8. Праймерна секвенция и размер на ампликона за гена CDKL5.

Екзон	Посока	Праймерна секвенция	Размер на продукта [bp]
CDLK5 Exon 1	F	5'- GGA GTC ATT TAA TAC TTC AT -3'	323
CDLK5 Exon 1	R	5'- GGT TAA ATT AAC AGG ATC TAA -3'	
CDLK5 Exon 2	F	5'- GGC TCA TTA TTG CAT TAT CA -3'	285
CDKL5 Exon 2	R	5'- GCA TTT CAG ATA AGG AAT -3'	
CDKL5 Exon 3	F	5'- GCT ACT CTG TCC CAG AAT AT -3'	231
CDKL5 Exon 3	R	5'- CCC ACT TCT TCC ACA CTC TA -3'	
CDKL5 Exon 4	F	5'- GCA GAA GTA CTC AAA GCA GAA - 3'	346
CDKL5 Exon 4	R	5'- CCA TAT TAG ATA ACA GTA CTT -3'	
CDKL5 Exon 5	F	5'- GCT CTG TAT TGG ATG AAT TA -3'	324
CDKL5 Exon 5	R	5'- GCC AAT GCT TAT GAA AAT AT -3'	
CDKL5 Exon 6	F	5'- GCC ACA GTT TTC TAT TCA AA -3'	249
CDKL5 Exon 6	R	5'- GCT ACC TAT GTG TTA CAA TA -3'	
CDKL5 Exon 7	F	5'- GCG AGA ACA GTC ATT ACA TT -3'	291

CDKL5 Exon 7	R	5'- CCA TAG ATG AAC TCA AAG CAA -3'	
CDKL5 Exon 8	F	5'- GCA CAT AAA TTT GTT CAC AAT -3'	350
CDKL5 Exon 8	R	5'- CCA TTG TGC AAT GAA CAA T -3'	
CDKL5 Exon 9	F	5'- GGG ATT GGC ATT TTT GCT TAT -3'	296
CDKL5 Exon 9	R	5'- CCA CAT CTC CTA AAA TTT CAT T -3'	
CDKL5 Exon 10	F	5'- CCT GAA CTG TGT TTA CTT GAT A -3'	385
CDKL5 Exon 10	R	5'- GGC TTT CCT TCT TTT CTC TAA -3'	
CDKL5 Exon 11	F1	5'- CCA GGT GTT TTG AGT ATT T -3'	1194
CDKL5 Exon 11	R1	5'- CCC TAA ATG CAT CCT ATC AA -3'	
CDKL5 Exon 11	F2	5'- CCA GGG ACA AAG TAC CTC AA -3'	437
CDKL5 Exon 11	R2	5'- GGC AGC TTC AAT TCC TCC AT -3'	
CDKL5 Exon 12	F	5'- GGT CCT AGT TCT ACC AAA TA -3'	322
CDKL5 Exon 12	R	5'- GCC ACA AGG AAA ACT ACT TA -3'	
CDKL5 Exon 13	F	5'- GCA CTA CAG CCT GGG CAA TA -3'	301
CDKL5 Exon 13	R	5'- CGC TGG CCT GAG TCG GTG AAA -3'	
CDKL5 Exon 14	F	5'- GCT TGA GCC TGG GAG GTC AA -3'	368
CDKL5 Exon 14	R	5'- CCT AGC AGG AGA AAG GAC ACT A -3'	
CDKL5 Exon 15	F	5'- GGC TCT TTA CCC AAG TGT TT -3'	315
CDKL5 Exon 15	R	5'- GCC AAG TGC AAA GTG TAA A -3'	
CDKL5 Exon 16	F	5'- CCT CTT GGG TGT GGT TGC ATA -3'	313
CDKL5 Exon 16	R	5'- GGT GCT CAG CCT TAC TGT AA -3'	
CDKL5 Exon 17	F	5'- CCC AGT CAC CTC ACC TCT AA -3'	391
CDKL5 Exon 17	R	5'- GGC ACC CAG CTG TTC AGA GTA -3'	
CDKL5 Exon 18	F	5'- GGT CAA TGG GAT GTG GGC AGA A -3'	280
CDKL5 Exon 18	R	5'- GCA AGA CTC TGT CTC AGA AA -3'	
CDKL5 Exon 19	F	5'- CGC TCT CAC TGT CAC CTT -3'	368
CDKL5 Exon 19	R	5'- GCC TGA ACA TCT GCA TTT CTA -3'	
CDKL5 Exon 20	F	5'- CGG TGG AAG AGA CAG AGC TTT -3'	363
CDKL5 Exon 20	R	5'- GGT TGA TTC ATT GGT GTT AA -3'	

За всеки фрагмент са оптимизирани условията за провеждане на ПВР, като са променени следните параметри на полимеразната верижна реакция: концентрация на бетаин, температура и време за хибридизация на праймерите, време за синтез на

желания продукт. Намерените оптимални концентрации на компонентите в реакционната смес за ПВР са посочени по-долу (Таблица 9).

Таблица 9. Оптимална концентрация на компонентите участващи в полимеразната верижна реакция за размножаване на изследваните екзони от CDKL5 гена.

Компонент на реакционната смес	Обем (μl)
ДНК	1
Праймер F (10pmol/ μl)	1
Праймер R (10pmol/ μl)	1
Разтвор на дезоксинуклеотидтрифосфати, дНТФ (5mM) (GENET BIO, Chungnam, Korea)	2
Бетаин (5M)	4
10x Prime Taq буфер (GENET BIO, Chungnam, Korea)	2.5
Термостабилна полимераза Prime Taq, (GENET BIO, Chungnam, Korea)	0.1
Дестилирана вода	До краен обем 25

Оптималната програма за провеждане на ПВР за получаване на специфичен продукт е представена в Таблица 10.

Таблица 10. Оптималната програма за провеждане на ПВР на екзони от CDKL5 гена.

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	94°C	5 min	1
Денатурация	94°C	45 sec	30
Хибридизация на праймерите	60 °C	45 sec	
Синтез на нова верига	72°C	1 min	
Краен синтез	72°C	5 min	1

• **Протокол за размножаване на екзони от ARX гена**

Използваните праймери за амплификация на ARX гена са публикувани [Kato et al., 2004].

Оптималната концентрации на компонентите в реакционната смес за ПВР са посочени по-долу (Таблица 11).

Таблица 11. Оптимална концентрация на компонентите участващи в полимеразната верижна реакция за размножаване на екзони от ARX гена.

Компонент на реакционната смес	Обем (μ l)
Високомолекулна ДНК	1-2
Праймер F (10pmol/ μ l)	1
Праймер R (10pmol/ μ l)	1
Разтвор на дезоксинуклеотидтрифосфати, дНТФ (5mM) (GENET BIO, Chungnam, Korea)	2
10x Prime Taq буфер (GENET BIO, Chungnam, Korea)	2.5
Термостабилна полимераза Prime Taq, (GENET BIO, Chungnam, Korea)	0.1
Дестилирана вода	До краен обем 20

Оптималната програма за провеждане на ПВР за получаване на специфичен продукт е представена на Таблица 12.

Таблица 12. Оптималната програма за провеждане на ПВР за получаване на специфични продукти на екзони от ARX гена.

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	94°C	5 min	1
Денатурация	94°C	30 sec	35
Хибридизация на праймерите	59°C	40 sec	
Синтез на нова верига	72°C	1 min	
Краен синтез	72°C	5 min	1

• **Протокол за размножаване на SNRPN гена**

Използваните праймери за амплификация на промоторния регион на SNRPN гена върху майчино метилирано и бащино неметилирано копие са по [Kosaki et al., 1997; Kubota et al., 1997].

За амплификацията на промоторния регион на SNRPN гена се използва специфичен по отношение на метилирането PCR (Methylation-specific PCR). Оптималната концентрации на компонентите в реакционната смес са посочени по-долу (Таблица 13).

Таблица 13. Оптимална концентрация на компонентите участващи в полимеразната верижна реакция за размножаване на промоторната област и екзон 1 на SNRPN гена.

Компонент на реакционната смес	Обем (μl)
Бисулфитно конвертирана ДНК	1-2
Праймер Met-F (20pmol/ μl)	0.5
Праймер Met-R (20pmol/ μl)	0.5
Праймер Unmet-F (20pmol/ μl)	0.5
Праймер Unmet-R (20pmol/ μl)	0.5
Разтвор на дезоксинуклеотидтрифосфати, дНТФ (5mM)	2
10x буфер (22.5mM MgCl_2)	2.5
Термостабилна полимераза Phusion® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase, New England Biolabs, Inc., UK 5 U/ μl	0.1
Дестилирана вода	До краен обем 25

Оптималната програма за провеждане на ПВР за получаване на специфичен продукт е представена на Таблица 14.

Таблица 14. Оптималната програма за провеждане на ПВР за получаване на специфични продукти от промоторната област и екзон 1 на SNRPN гена.

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	96°C	6 min	1
Денатурация	96°C	40 sec	30
Хибридизация на праймерите	60°C	1 min	
Синтез на нова верига	72°C	1 min	
Краен синтез	72°C	7 min	1

Апаратура:

За провеждане на ПВР са използвани апарати: GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, USA; Bioer XP cycler, Hangzhou, P.R. China.

3.3.2. ЕЛЕКТРОФОРЕЗА В АГАРОЗЕН ГЕЛ

Количеството и качеството на получените амплификационни продукти чрез ПВР се контролира посредством агарозна гел-електрофореза. Използва се 2-3% агарозен гел, хоризонтална електрофорезна система, като пробите се анализират в присъствието на молекулен маркер, спрямо който се отчита дължината на намножения фрагмент.

ДНК фрагментите се разделят в зависимост от молекулната им маса, а разтвореният в агарозата етидиев бромид позволява визуализирането на ДНК при облъчване с ултравиолетова светлина.

Използвани буфери:

1x TBE буфер: TRIS - 90mmol/l; Борна киселина – 90mmol/l; Na₂EDTA – 1mmol/l
Буфер за нанасяне на пробите: 0.25% бромфенол блу; 25% фикол

Апаратура:

За изливане на агарозния гел: Микровълнова фурна – SM 20MW, SOGO, China; нивелирна масичка; ваничка за изливане на агарозен гел (2500x1800mm); стартови гребени с размер 2x22 бр., размери на ямките 5x4x1mm;

За провеждане на електрофорезата: Апарат за хоризонтална подводна гел-електрофореза A. Hartenstein, Wuerzburg, Germany; токоизправител Consort EV222, Turnhout, Belgium;

За визуализиране на пробите: Транслюминатор LKB Bromma 2011 Macrovue, LKB Vertriebs GmbH, Vienna, Austria.

За архивиране на получените резултати: Фотодокументационна система: Alpha DigiDoc Pro, Alpha Innotech, Cell Biosciences, Inc., Santa Clara, CA, USA

3.3.3. ПРОТОКОЛ ЗА ИЗОЛИРАНЕ НА АМПЛИФИЦИРАНИ ФРАГМЕНТИ ОТ АГАРОЗЕН ГЕЛ:

За целта е използван готов кит за екстрахиране на фрагменти от агарозен гел на фирмата QIAGEN – QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Процедура:

Желаният фрагмент се изрязва от агарозния гел максимално близо със скалпел, измерва се теглото на изрязаното парченце и се поставя в епруветка тип Eppendorf.

Добавят се 3 обема QG буфер, който буфер е с жълт цвят (на един обем гел – 100 mg съответства 1 обем буфер – 100 µl). Инкубира се на 50°C за 10 min или повече, докато агарозата се разтопи напълно.

След пълното разтваряне на агарозата се отчита дали цвета на сместа все още е жълт или близък до този на QG буфера. Ако цветът е оранжев или виолетов се добавят 10 µl 3M натриев ацетат с pH 5.0 и се разбърква. Цветът на сместа става отново жълт.

Добавя се 1 обем изо-пропанол и сместа се накапва върху колонка, поставена в колекторна епруветка, предоставена към кита. Центрофугира се на 12 000 rpm за 1 min. Отделената течност се изхвърля.

В колонката се накапват 750 µl буфер за миене – PE Wash buffer. Центрофугира се на 13000 rpm за 1 min. Отделената течност се изхвърля.

За изсушаване се центрофугира на 12 000 rpm за 1 min.

Колонката се прехвърля в епруветка тип Eppendorf и ДНК фрагмента се елуира от колонката с 30 µl EB буфер (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) или с дестилирана вода. Центрофугира се на 12 000 rpm за 1 min.

Екстрахираният фрагмент е готов за ре-амплификация или директно секвениране (виж по-долу).

3.3.4. ЕЛЕКТРОФОРЕЗА ЗА ФРАГМЕНТЕН АНАЛИЗ НА АВТОМАТИЧЕН СЕКВЕНАТОР

За правилното оразмеряване на амплификационните продукти, съдържащи CGG повтора на FMR1 гена се налага използването на електрофореза на автоматичен секвенатор. Разделянето се извършва с помощта на фабричен акриламиден полимер POP4 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), като пробите се анализират в присъствието на молекулен маркер (напр. ROX500 Size Standard, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), спрямо който се отчита дължината на намножения фрагмент.

Процедура:

Полимерът POP4 се поставя в стъклена спринцовка, която го подава равномерно за пълнене на капиларата. Използваният електрофоретичен буфер е 10xSequencing Buffer (предоставен от производителя) (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), който се разрежда до концентрация 1x за използване в хода на електрофорезата.

Електрофоретично разделяне на пробите

Условията на електрофореза са:

Module:	GS STR POP4 (1ml) D
Inj secs:	5.0
Inj kV:	15.0
Run kV:	15.0
Run T°C:	60.0
Run time:	26-29 min

Приготвяне на пробите за електрофореза

Към 2.5 µl амплификационен продукт се прибавят 12 µl Hi-Di Formamide (Applied Biosystem, Foster City, USA) и 0.7 µl ROX500 Size Standard (Applied Biosystem, Foster City, USA). Така приготвените проби се денатурират на 95°C в продължение на 5 мин и се охлаждат бързо на лед. Прехвърлят се в специални епруветки (Genetic Analyzer 0.5 ml Sample Tubes, Applied Biosystem, Foster City, USA) и се поставят за анализ в апарата.

Визуализиране на фрагментите

За визуализиране на фрагментите чрез този вид капиларна електрофореза един от използваните праймери за амплификация е белязан с флуоресцентно багрило 6-FAM

(виж по-нагоре описанието на праймерите), което се детектира от лазера. Получените резултати се обработват с програмата GenScan v.3.4.1 (Applied Biosystem, Foster City, USA).

Апаратура

Използва се автоматичен капилярнен секвенатор ABI 310 genetic analyzer (Applied Biosystem, Foster City, USA) и компютър McIntosh G3 (Apple Inc, Cupertino, CA, USA).

3.3.5. ЕЛЕКТРОФОРЕЗА В ДЕНАТУРИРАЩ АКРИЛАМИДЕН ГЕЛ, SOUTHERN ТРАНСФЕР И ПОСЛЕДВАЩА ХИБРИДИЗАЦИЯ СЪС СПЕЦИФИЧНА СОНДА.

Процедура:

- Подготовка на апаратурата и изливане на денатуриращ полиакриламиден гел;
- Подготовка на пробите за анализ;
- Електрофоретично разделяне на пробите;
- Southern трансфер;
- Хибридикация със специфична сонда;
- Визуализиране на резултатите.

Подготовка на апаратурата:

Стъклата на апаратурата (20/40 см) за вертикална електрофореза се измиват с топла вода и детергент и 70% етилов алкохол. Подсушават се. Стъклата се сглобяват, като по между им в двата вертикални края се поставят странични ограничители с дебелина 0.1 mm. Долните ръбове на стъклата се изравняват с долния край на ограничителите и стъклата се фиксират с метални щипки. Така сглобената система се поставя върху масата за изливане на гелове под наклон около 15°.

Изливане на полакриламиден гел (ПААГ):

Приготвя се 60 ml работен разтвор за 6%-ен ПААГ, като в бехерова чаша се смесват 9 ml 40%-тен разтвор на акриламид и метиленбисакриламид в съотношение 19:1, 3.6 ml 10xTBE буфер, 25.2 gr уреа (7 M) и до 60 ml дестилирана вода.

Изливане на тапа:

Към 5 ml от приготвения работен разтвор за ПААГ се добавят 5 µl N,N,N,N-тетраметилетилендиамин (TEMED) и 50 µl 10% амониевперсулфат (APS). Разбърква се и веднага се нанася чрез пипета в долния край на сглобената система, така че да се получи равномерен слой. Излятата тапа се оставя да полимеризира 10 min.

Изливане на гела:

Към остатъка от работния разтвор (55 ml) се добавят 35 µl TEMED и 210 µl 10%-ен APS. Разбърква се и равномерно се излива между двете стъкла от към горния край на системата без да се допуска образуването на въздушни мехурчета в гела. След като системата се запълни, от към горния и край между двете стъкла се поставя гребен (shark tooth) с дебелина 0.1 mm за оформяне на стартовите ямки в гела. Гребенът заедно със стъклата се фиксират с метални щипки. Излятият гел се оставя да полимеризира 45 min.

След полимеризирането на гела металните щипки се свалят и гребена се изважда внимателно, обръща се наобратно и зъбчетата се забиват около 1 mm в гела за оформяне на стартовите ямки, в които се нанасят пробите. С помощта на щипки гела се монтира към вертикалната система за провеждане на електрофореза и буферните камери се запълват с 0.6xTBE буфер. Гелът се оставя за преелектрофореза за около 20 min за достигане на нужната температура (около 50°C).

Подготовка на пробите за електрофоретично разделяне:

В епруветка тип Eppendorf се смесват 10 µl от намножените ДНК фрагменти и 10 µl денатуриращ разтвор за нанасяне на пробите (95% дейонизиран формамид, 20 mM EDTA, 20 mM NaOH, 0.25% ксиленцианол и 0.25% бромфенол-блу). Пробите се денатурират за 5 min на 95°C, след което се оставят на лед за 5 min за предотвратяване на ренатурацията на получените едноверижни фрагменти.

Електрофоретично разделяне на пробите:

Така приготвените проби се нанасят в стартовите ямки на гела и се провежда електрофорезата при 50 W около 2-3 часа докато бромфенол-блу изтече, а ксиленцианол е малко под средата на гела.

● **Southern трансфер**

След електрофорезата стъклената конструкция се разглобява, като гелът остава закачен за едното стъкло. Върху него се поставя предварително приготвената мембрана (Nylon Membrane, positively charged, Roche, Penzberg, Germany), на кисната във вода. Върху мембраната се поставят две парчета суха филтърна хартия 3ММ Whatman Blotting Paper. Цялата конструкция се завива със Saran Wrap, за да не изсъхва гела, покрива се с горното стъкло и се затиска с тежести. Конструкцията се оставя за трансфер през нощта.

● **Хибридизация със специфична сонда**

Мембраната се поставя в пликче за хибридизация (Roche, Penzberg, Germany). За 2 кв.см. мембрана е необходим 1 ml Hyb mix (DIG DNA Labeling and Detection Kit, Roche, Penzberg, Germany). Към 1 ml Hyb mix се добавят 10 pmol дигоксигенин-маркирана сонда DIG-(CGG)₅. Хибридизацията се извършва при 42°C на клатачка, водна баня в продължение на 2-3 часа.

● **Визуализиране на резултатите**

Извършват се няколко последователни промивания: 2xSSC/0.5% SDS – 5 мин на стайна температура на клатачка; буфер 2 - 30 мин на стайна температура на клатачка; към буфер 2 се добавят 20 µl антитяло (Anti-DIG-AP Fab fragments, DIG DNA Detection Kit, Roche, Penzberg, Germany) - 20 мин на стайна температура на клатачка; промиване в буфер 1 - 10 мин на стайна температура на клатачка; оцветяване – 70 ml буфер 3 + 240 µl NBT + 240 µl BCIP (DIG DNA Detection Kit, Roche, Penzberg, Germany).

Буфер 1 – 5 M NaCl, 1 M Малеинова к-на, рН=7.5

Буфер 2 – 90 ml буфер 1 + 10 ml 10% блокиращ реагент (DIG DNA Labeling and Detection Kit, Roche, Penzberg, Germany)

Буфер 3 – 1 M Tris (рН=9.5), 5 M NaCl, 1 M MgCl

След прибавяне на проявителя върху мембраната тя се поставя на тъмно на стайна температура за през нощта.

За документиране и съхранение мембраната се сканира или копира на ксерокс.

Апаратура: Апарат за вертикална електрофореза: Elettrofor, Padova, Italia; водна баня с клатачка: Elpan Water bath shaker type 357, Poland; клатачка: IKA VIBRAX VXR Basic Shaker, Ika-Werker GmbH&Co.KG, Staufen, Germany

Скенер: Epson Perfection 1660 Photo, Seiko Epson Corporation, Suwa, Nagano, Japan

Ксерокс: Brother DCP-7030 Brother Industries, LTD., Nagoya, Japan

3.3.6. ДИРЕКТНО СЕКВЕНИРАНЕ ПО SANGER С ФЛУОРЕСЦЕНТНО БЕЛЯЗАНИ ДИДЕЗОКСИ НУКЛЕОТИДИ.

Принцип на метода на Sanger:

Секвенирането е ензимен метод за определяне на нуклеотидната последователност на участък от ДНК. Използва се реакция за синтез *in vitro* на ДНК вериги върху едноверижна матрица с участието на ДНК полимераза. Полимеразната реакция се инициира на точно определено място, където синтетични олигонуклеотидни зародиши (праймери) хибридизират с матрицата. Чрез случайно включване на нуклеотидни аналози, които не позволяват удължаване на растящата верига, реакцията се прекратява в различни места. Като такива аналози се използват 2', 3'-дидезоксинуклеозид 5'-трифосфати (ддНТФ). Те спират изграждането на ДНК веригата, тъй като нямат 3'-хидроксилна група. Ензимът Thermo Sequenase II ДНК-полимеразата е термостабилна ДНК-полимераза, толерантна към високи солеви концентрации и с висока процесивност. Това позволява използването ѝ за ДНК синтезата *in vitro*, която се извършва чрез PCR реакция. В резултат на това се получават различни по дължина вериги с еднакво начало и различен край, определен от включването на един от четирите вида ддНТФ. Тези фрагменти се разделят електрофоретично. Визуализацията им може да се осъществи по различен начин в зависимост от това с какво са белязани терминаращите дидезоксинуклеотиди.

Принцип на работа на автоматичен секвенатор ABI310 Sequence Genetic Analyzer:

В настоящото изследване за разделянето на фрагментите е използван автоматичен секвенатор ABI310 Sequence Genetic Analyzer на фирмата Applied Biosystems.

Разделянето на фрагментите в автоматичния секвенатор ABI310 се извършва на принципа на капилярната гел-електрофореза. Използваните при секвенционната реакция терминаращи дидезоксинуклеотиди са флуоресцентно белязани, поради което се осъществява лазерна детекция. Всеки от четирите дидезоксинуклеотида (ddG, ddA,

ddT и ddC) е белязан с два флуорофора – флуоресцин и един от четирите типа родамин. Флуоресцинът има висок екстинкционен коефициент при $\lambda = 488$ nm. (това е и дължината на вълната, емитирана от аргоновия лазер, който се използва в автоматичните секвенатори). Играейки ролята на донор, флуоресцинът поглъща енергията на лазерния лъч и я прехвърля към акцепторния родамин върху същата молекула. Всеки от четирите акцептора емитира светлина с определена дължина на вълната, която се детектира от апарата и така се идентифицира съответният нуклеотид.

Процедура:

- Намножаване на желанния ДНК фрагмента чрез ПВР;
- Пречистване на намножения продукт;
- Провеждане на секвенционна реакция;
- Преутаяване на секвенционния продукт;
- Разтваряне на секвенционния продукт и електрофоретично разделяне;
- Визуализиране на резултатите.

Намножаване на желанния ДНК фрагмента чрез ПВР

Извършва се при споменатите по-горе условия за съответните участъци.

Пречистване на намножения продукт:

Пречистването на амплификационния продукт е необходимо за да бъдат премахнати останалите в пробата дезоксинуклеотидтрифосфати и праймери, които биха повлияли върху по-нататъшните реакции.

В настоящото изследване се използва ензимно пречистване на продукта с реагент ExoSAP-IT® на фирмата Amersham Biosciences Corp., основаващ се на метода описан от Werle и сътр. [1994]. Реагентът съдържа два хидролитични ензима - Екзонуклеаза I (Exo) и алкална фосфатаза, изолирана от скариди (Shrimp Alkaline Phosphatase - SAP), в буфер. Екзонуклеаза I разгражда едноверижни ДНК фрагменти (в случая това са неизползваните праймери след полимеразната верижна реакция), а алкалната фосфатаза пренахва 5'-фосфатния остатък от дезоксинуклеотидтрифосфатите и така ги инактивира.

Предимство на ензимния метод на пречистване е, че няма никакви загуби на продукт при процедурата, използва се много малко количество матрица, процедурата е бърза и лесна за изпълнение.

Техника:

В епруветка тип Eppendorf от 0.5 ml се смесват 1.5 μ l амплификационен продукт и 0.5 μ l ExoSAP-IT®.

Инкубира се на 37°C за 30 min, след което реакцията се спира чрез инактивиране на ензимите на 80°C за 15 min.

Така пречистената матрица може да се съхранява на -20°C.

Провеждане на секвенционна реакция:

За секвенционната реакция е използван кит за секвениране BigDye® Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) включващ Thermo Sequenase II ДНК-полимераза и флуоресцентно белязани нуклеотиди.

Техника:

Към пречистената матрица се добавят 0.3 μ l праймер с концентрация 10pM/ μ l, 2 μ l 5x секвенционен буфер, 1 μ l кит BigDye® Terminator v.3.1, бидестлирана вода до краен обем 10 μ l.

Режимът за провеждане на секвенционната реакция е:

Денатурация – 95°C – 20 sec;

Хибридиране на праймера – 50°C – 15 sec;

Синтез на верига – 60°C – 3 min.

Този цикъл се повтаря 25 пъти.

На този етап не се накапва течен парафин върху пробата, а се използва нагриващ капак, за да се предотврати изпаряването ѝ.

Преутаяване на секвенционния продукт:

Секвенционните продукти се преутаяват чрез преципитират с етанол с цел отстраняване на несвързаните нуклеотиди.

Техника:

Към секвенционната проба се добавят по 1/10 от обема 1.5М натриев ацетат с рН>8 / 250 mM EDTA буфер и се размесва добре чрез неколккратно пипетиране. Добавя се 80 µl студен абсолютен етанол и се вортексира. Центрофугира се на стайна температура за 15 мин при 12 000 rpm. Супернатантата се отстранява внимателно чрез изсмукване на вакуум.

Получената утайка се промива с 200 µl 80% етанол, вортексирт се и се центрофугирт за 10 мин на 12 000 rpm на стайна температура. Супернатантата се изсмукване на вакуум. Утайката се суши на стайна температура на тъмно за 12 часа.

Сухата утайка може да се съхранява на тъмно на стайна температура за няколко дни.

Разтваряне на секвенционния продукт:

Към сухите утайки се добавят 12 µl Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Пробата се вортексира, денатурира се за 5 min на 94°C и се прехвърля върху лед за 5 min. След това отново се вортексира и се центрофугира леко, за да се събере цялото количество на дъното.

Така приготвената проба е готова за анализ и се подава на апарата за електрофоретично разделяне.

Визуализиране и отчитане на пробите:

Секвенционните данни се обработват автоматично от програмата ABI310 Data Collection Software v2.1 и се анализират посредством програмата ABI310 Sequencing Analyzer v5.1.1, при което се получават в готов вид под формата на електрофореграма.

Апаратура:

За провеждането на полимеразната верижна реакция, ензимното пречистване на получения продукт и последващата секвенционна реакция са използвани апарати GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, USA; Bioer XP cycler, Hangzhou, P.R. China

Електрофоретичното разделяне на секвенционните продукти се извършва на автоматичен секвенатор ABI Prism 310 Genetic Analyzer.

3.3.7. МУЛТИПЛЕКСНА ЛИГАЗНО ЗАВИСИМА АМПЛИФИКАЦИЯ (MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION, MLPA).

Принцип на MLPA анализа:

Преди няколко години беше разработен новият метод за геномно профилиране Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) (виж Фигура 16) [Schouten et al., 2002; www.mlpa.com].

Фрагментите се сравняват като площ на получените пикове, както в рамките на една проба, така и спрямо контролни проби, анализирани едновременно с изследвания пациент. Когато анализът касае X свързани гени, пациентите от мъжки пол се анализират спрямо контроли от мъжки пол, а пациентите от женски пол – спрямо контроли от женски пол.

Процедура за MLPA анализ:

Приготвяне на разредки от изходните ДНК проби с концентрация около 100 ng в 1xTE буфер. Разредените проби се денатурират 10 мин на 98°C, след което се охлаждат до 25°C.

ДНК	2.0µl	98°C – 10`
TE buffer	<u>3.0 µl</u>	25°C – 5`
	5.0 µl	

Хибридизация със специфични за отделните генни фрагменти сонди. Към денатурираните проби се добавят по 1.5 µl от сондите и 1.5 µl буфер за хибридизация. Пробите се размесват добре, денатурират се 1 мин на 95°C и се инкубират за хибридизация на 60°C най-малко 16 часа.

Salsa probe black	1.5 µl
Buffer yellow	<u>1.5 µl</u>
	по 3.0 µl на проба

Реакция на лигиране: Пробите се охлаждат до 54°C и се добавят 32 µl Лигаза-65 микс (Лигаза-65 буфер А – 3 µl; Лигаза-65 буфер В – 3 µl; бидестилирана вода – 25 µl; Лигаза-65 – 1 µl). Размесва се добре и се инкубира на 54°C 10-15 мин, след което пробите се денатурират на 98°C за 5 мин и се охладат на 4°C.

Ligase 65 buffer A (transparent)	3.0 µl
Ligase 65 buffer B (white)	3.0 µl
Вода	25.0 µl
Ligase (green)	<u>1.0 µl</u>
	по 32 µl на проба

PCR: Компонентите на амплификационната реакция са: SALSA PCR праймер – 2 µl; SALSA Enzyme dilution buffer – 2 µl; вода – 5.5 µl и SALSA полимераза – 0.5 µl. По 10 µl от този амплификационен микс се добавя към всяка проба.

Salsa PCR buffer (red)	4.0 µl
Вода	26.0 µl
MLPA ligation reaction	10.0 µl

PCR апарата се загрява до 60 ° C, след което добавяме следния микс:

Salsa PCR-primer (brown)	2.0 µl
Salsa Enz.Dil. Buffer (blue)	2.0 µl
Water	5.5 µl
Salsa Polymerase (orange)	<u>0.5 µl</u>
	10 µl на проба

Условия на амплификационната реакция: 95°C – 30 сек.; 60°C – 30 сек.; 72°C – 60 сек. (33 цикъла). Следва инкубиране на пробите на 72°C – 20 мин.

Приготвяне на пробите за електрофоретично разделяне: По 2.5 µl от всяка амплифицирана проба се смесват с 12 µl Hi-Di формамид (Applied Biosystems) и 0.6 µl ROX 500 size standard (Applied Biosystems). Така приготвените проби се денатурират на 95°C – 5 мин и се поставят в лед.

Капилярна електрофореза: Електрофорезата се провежда на къса капиляра 47 см (Applied Biosystems) в полимер POP4 (Applied Biosystems).

Визуализиране и отчитане на пробите:

Електрофоретичния профил се обработва и анализира с посредством програмата ABI310 GeneScan v3.1.2, при което се получават в готов вид под формата на електрофореграма.

Апаратура:

За провеждането на MLPA анализа се използва PCR апарат GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, USA; Bioer XP cycler, Hangzhou, P.R. China

Електрофоретичното разделяне на секвенционните продукти се извършва на автоматичен секвенатор ABI Prism 310 Sequence Genetic Analyzer.

3.3.8. РАЗРАБОТВАНЕ НА ПОДХОДЯЩ МАТЕМАТИЧЕСКИ АЛГОРИТЪМ ЗА КОЛИЧЕСТВЕНА ОЦЕНКА НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ

[Площ на пик (пациент)/ Ср. аритм. от площите на двата съседни пика]

[Площ на пик (контрола)/Ср. аритм. от площите на двата съседни пика]

съотношение около 1 – нормален резултат

съотношение <0.6 – делеция

съотношение >1.6 – дупликация

3.3.9. РАЗНОВИДНОСТ НА МУЛТИПЛЕКСНА ЛИГАЗНО ЗАВИСИМА АМПЛИФИКАЦИЯ - СПЕЦИФИЧЕН ПО ОТНОШЕНИЕ НА МЕТИЛИРАНЕТО MLPA АНАЛИЗ (METHYLATION SPECIFIC MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION, MS-MLPA).

Принцип на MS-MLPA метода:

Метилирането на ДНК представлява добавяне на метилова група към азотната база цитозин в CG динуклеотидни повтори. Районите от ДНК съдържащи голям процент от тези динуклеотиди се наричат CpG острови и често са локализирани в промоторния регион на гените. Ако промоторът на даден ген е метилиран, то генът няма да се транскрибира и съответният белтък няма да се произвежда. В човешкия геном около 1% от ДНК е метилирана.

Напоследък техниката на MLPA е модифицирана и позволява да се детектират метилирани ДНК последователности в CpG островите и едновременно с това да се определи количествено броят копия от дадена генетична последователност. Този най-съвременен метод известен като MS-MLPA метод позволява детекция на хипометилиране (деметилиране) и хиперметилиране на ДНК чрез използването на рестрикционен анализ с ензима HhaI. Рестрикционната ендонуклеаза HhaI е

чувствителна на метилиране и срязва неметилирана ДНК. При хиперметилиране, хиперметилираната ДНК не се реже от ензима HhaI и на електрофореграма се отчита наличие на фрагмент. Ако фрагментът не е метилиран, то той се срязва от рестриктазата и не се отчита фрагмент на електрофореграма (виж Фигура 17).

Протокол за MS-MLPA:

Приготвяне на ДНК пробите:

ДНК	1 μ l	98°C – 10`
TE буфер	3 μ l	25°C – 5`
Денатуриращ буфер	1 μ l	
Общ обем	5 μl	

Хибридизация:

Salsa probe (black)	1.5 μ l
Буфер (yellow)	<u>1.5 μl</u>
	по 3 μ l на проба

Лигиране:

Ligase 65 буфер А (transparent)	3 μ l
Вода	<u>10 μl</u>
	по 13 μ l на проба

Миксира се добре с пробата.

Всяка проба се разделя на две проби по 10 μ l

Инкубиране на всички проби на 49°C – 1`

Без да се изваждат от апарата се добавят:

ЗА ТЕСТ НА БРОЙ КОПИЯ (COPY NUMBER TEST, CNT)

Ligase 65 буфер В (white)	1.5 μ l
Вода	8.25 μ l
Ligase (brown)	<u>0.25 μl</u>
	по 10 μ l на проба

ЗА ТЕСТ ЗА МЕТИЛИРАНЕ (METHYLATION TEST, MT)

Ligase 65 буфер В (white)	1.5 µl
Вода	7.75 µl
Ligase (brown)	0.25 µl
Hha I (10 units/ µl)	<u>0.5 µl</u>
	по 10 µl на проба

Двете реакции се инкубират на 49°C – 30 мин.

Нагриване 98°C – 5 мин.

PCR:

В нови епруветки се накапват по:

CNT и MT	5 µl
SALSA PCR буфер (red)	2 µl
<u>Water</u>	<u>13 µl</u>
	по 15 µl на проба

На лед

Добавят се:

Salsa PCR-праймер (purple)	1 µl
Salsa Enz.Dil. буфер (blau)	1 µl
Вода	2.75 µl
Salsa Polymerase (orange)	<u>0.25 µl</u>
	по 5 µl на проба

Условия на PCR амплификацията:

95°C – 1 min

95°C – 30 sec

60°C – 30 sec 35 cycles

72°C – 1 min

72°C – 20 min

Електрофореза:

PCR – 2.5 µl

ROX 500 – 0.6 µl

HiDi Formamide – 12 µl

Денатуриране –94°C - 2 min, охлаждане на лед

• **Използвани MLPA китове в дисертационния труд:**

SALSA MLPA ME029 FMR1/FMR2 probemix

SALSA MLPA Kit P015C - MECР2

SALSA MLPA Kit ME028-A1 - PWS/AS

SALSA MLPA Kit P245 - A1 Microdeletion Syndromes

[www.mlpa.com]

• **Литературни база данни, използвани в проучването**

При секвенционния анализ на изследваните гени, разчетената от нас секвенция се сравнява с публикуваната за всеки ген в GenBank базата данни. Използваните генни секвенции в настоящето проучване имат следните регистрационни номера: X99686 (MECP2), NM_001037343 (CDKL5), NM_139058 (ARX).

За сравнителния анализ на откритите мутации при български пациенти с публикуваните данни в литературата са използвани редица проучвания на други автори, цитирани в раздел „Резултати и Обсъждане“. Използвана е мутационната база данни: www.mecp2.chw.edu.au.

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Групата от пациенти с умствено изоставане, която представлява обект на молекулярно-генетични изследвания в настоящия дисертационен труд се състои от 90 пациента. На базата на предварително проведените клинични изследвания те са разделени в 4 групи: FXS 32-ма пациента, RTT 38 пациента, PWS/AS 16 пациента и MDS 4-ма пациента. Резултатите от клинично-генетичните изследвания са представени в 2 публикации [Todorov et al., 2010a,b].

4.1. FXS:

4.1.1. КЛИНИЧНИ СИМПТОМИ

Наблюдаваните клинични симптоми при изследваната група момчета с предполагаема клинична диагноза FXS са представени в Приложение 1. Водеща клинична находка при всички момчета от тази група е липсващ или забавен говор (в случаите на забавен говор се касае за речев състав състоящ се от отделни думи или срички). Интелектуалното развитие при всички момчета е забавено, като в тази група се срещат широки вариации в степента на умствено изоставане: от тежка (IQ=20-34) до гранична (IQ=70-80). Тези вариации в степента на умствено изоставане се дължат на наличието на пациенти с чисто аутистично поведение и дискретни синдромни изменения, които подлежат на изключване на FXS като евентуална диагноза.

При всички пациенти от изследваната група са налице дисморфични лицеви характеристики като характерните за тази диагноза големи ниско разположени ротирани назад ушни миди, удължено лице, високо чело, големи раздалечени зъби, високо небце, коси очни цепки, екстравертирани ноздри и др.

Поведенческите отклонения не са характерни за всички пациенти от изследваната група. В някои случаи се наблюдава аутистично поведение и

избягване на очен контакт. В други случаи децата проявяват хиперактивност и са склонни към агресия.

Забавяне във физическото развитие също не е характерно за всички пациенти от изследваната група - наблюдава се при 6 пациента: висока несъразмерна фигура с удължени ръце и крака, хипертрофия на прасците, мускулна хипотония, забавена възможност за самостоятелно седене (около 9м. – 1г.), самостоятелно прохождение (1г6м – 3г.).

При 4 от изследваните момчета са налице епилептични припадъци или единични гърчови епизоди.

Родителите на децата от тази група често свързват появата на патологичната симптоматика с прекарано тежко заболяване като коклюш, пневмония, рецидивиращи отити и др. Често родителите споменават прекарани инфекциозни заболявания като причина за последващ регрес в развитието на техните деца.

4.1.2. ЦИТОГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

Като първа стъпка по дългия път към изясняване на диагнозата при пациенти с посочената по-горе клинична симптоматика се назначава хромозомен анализ (кариотип). Посредством този анализ могат да бъдат отдиференцирани много големи CGG триплетни експанзии в края на дългото рамо на X хромозомата, които се визуализират микроскопски като „счупено” рамо. От този визуален образ идва и името на синдрома – чуплива X хромозома. Хромозомният анализ при 31 от изследваните 32 пациента показва нормален резултат. Само при един пациент #18 от Приложение 1 беше установен патологичен кариотип, отговарящ на диагнозата FXS – 46, fra(X)(q27.3)Y[18]/46, XY[22] [Доц. Л. Ангелова, МБАЛ „Св. Марина” гр. Варна, 1994, дисертационен труд].

4.1.3. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

Системният подход при молекулярно-генетичен анализ на момчета с умствено изоставане предполага като първа стъпка да бъде проверен FMR1 генът за патологични нарушения.

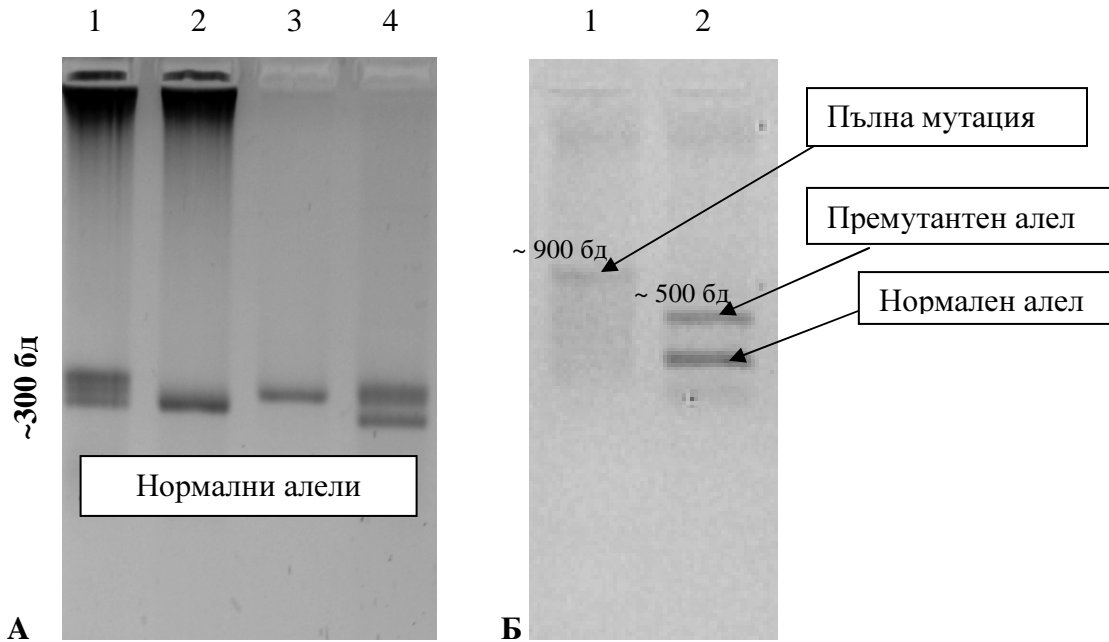
Използвана методика за анализ на FMR1 гена при български пациенти:

1. Амплификация на региона, съдържащ CGG повтора в промоторната област на FMR1 гена

Поради CG съставът на интересуваният ни за анализ генен регион, неговото амплифициране чрез стандартен PCR протокол е невъзможно. За целите на настоящия дисертационен труд и за молекулярно-генетичната диагностика на синдром на чуплива X хромозома в България беше разработен и оптимизиран за рутинно диагностично изпълнение PCR протокол с висока концентрация на бетаин (модификация на протокола на Tassone et al., [2008]). Тази новаторска разработка на екипа беше публикувана в *Molecular Biotechnology* [Todorov et al., 2010c]. Бетаинът подобрява амплификацията на GC-богати ДНК секвенции, тъй като намалява формирането на вторични структури в този регион. Ако прицелната GC-богата ДНК последователност е много дълга (както в нашия случай), формирането на такива вторични структури (hairpin loops) е много често събитие, което прави матрицата недостъпна за действието на полимеразата в хода на амплификационната реакция. Експериментално беше установено, че добавянето на бетаин във вид на монохидрат (Sigma) не пречи на действието на ДНК полимеразата, както и на специфичността и акуратността на PCR реакцията [Henke et al., 1997].

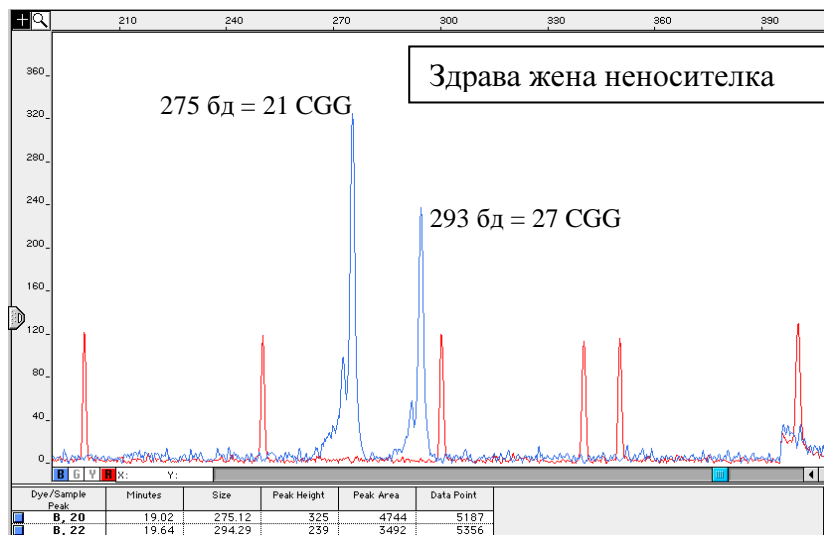
Освен това с увеличаване концентрацията на бетаин се увеличава и интензивността на получения амплификационен продукт [Henke et al., 1997].

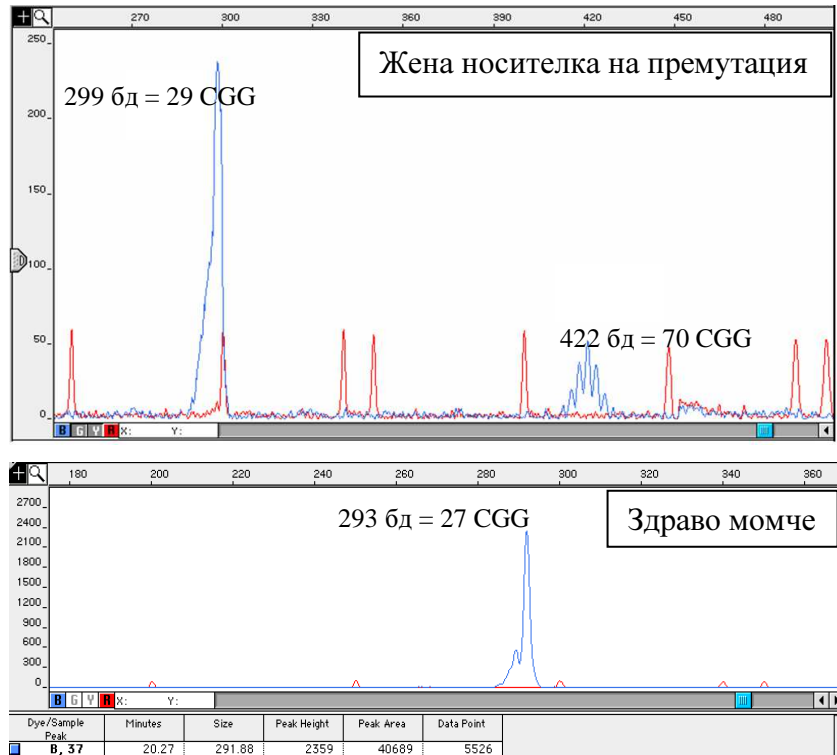
Първоначално разработеният протокол за амплификация беше приложен върху контролна група ДНК проби – 5 здрави момчета, 2 болни момчета с доказана пълна мутация, 5 здрави жени носители и 6 жени носители на премутация. Резултатите се визуализират чрез агарозна електрофореза с детекция етидиев бромид. На този етап се оценява дали амплификацията е била успешна и грубо може да се прецени размера на получените амплификационни продукти (Фигура 20).



Фигура 20. Електрофоретични профили на PCR продукти на CGG повтора в FMR1 гена: (А) Здрави жени носителки - 1; 4; здрави момчета - 2; 3 и (Б) болно момче – 1; жена носителка на премутация - 2. Дължината на фрагментите е определена спрямо молекулен стандарт с известни размери на фрагментите, който не е представен на фигурата.

В последствие за по-точно оразмеряване на получените фрагменти, амплификационните продукти бяха анализирани и чрез капилярна електрофореза на ABI310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) (Фигура 21).





Фигура 21. Електрофоретични профили на PCR продукти на CGG повтора в FMR1 гена, анализирани чрез капилярна електрофореза. Сините пикове представляват фрагментите от амплифицирания CGG повтор, а червените пикове са молекулен стандарт, спрямо който се извършва оразмеряването на фрагментите. Премутантни експандирани алели, които представляват мозайка от фрагменти, различаващи се с по един тринуклеотид, се детектират като поредица от пикове както се вижда от профила на премутантния алел 70 CGG повтора.

Предимство на разработения от нас диагностичен протокол за размножаване CGG повтора в промоторната област на FMR1 гена е неговата бързина на изпълнение и изключителна надеждност при амплификация на фрагменти до около 150 CGG повтора. Този бърз тест, разработен като скринингов метод позволява получаване на резултат в рамките на 24 часа. Протоколът не изисква симултаният анализ на контролни проби с анализиранията проба, тъй като всеки получен амплификат се оразмерява директно от автоматичния секвенатор и в следствие се интерпретира като брой повтори съгласно разработените от нас калкулации, представени в Таблица 15.

Таблица 15. Изчисления на CGG повторите спрямо размера на амплификационните продукти в базови двойки (бд).

Размер*[бд]	Брой CGG повтори
287	25
290	26
293	27
296	28
299	29
302	30
...	...
422	70
...	...
482	90
...	...
512	100
...	...
572	120

*Константният регион е 212 бд.

Това намалява себестойността на анализа. Друго много съществено предимство е използването на много малко количество ДНК – 200 ng, за разлика от класическите методи на Southern хибридизация, където са необходими 5-10 µg ДНК. Това предимство прави метода приложим и за целите на пренаталната диагностика.

Недостатък на представения протокол е невъзможността за размножаване/визуализиране на експанзии по-големи от 150 CGG повтора. Това налага комбинирането на PCR протокола с допълнителен метод за анализ. Това неудобство се налага само при около 13% от изследваните при нас семейства, останалите 87% от случаите (деца с нормален алел, майки хетерозиготи с два нормални алела, носители на малки премутации) бяха изяснени успешно още с първата стъпка на амплификация на CGG повтора.

2. MS-MLPA

Като допълнителен метод за анализ на FXS семействата беше избран нов модерен подход MS-MLPA, оценяващ метилирането в промоторната област на FMR1 гена. По този начин индиректно се идентифицират много големи експанзии, водещи до хиперметиране. С помощта на този метод е възможно и откриването на големи делеции/дупликации в FMR1 гена, които макар и рядко може да са причина за синдром на чуплива X хромозома.

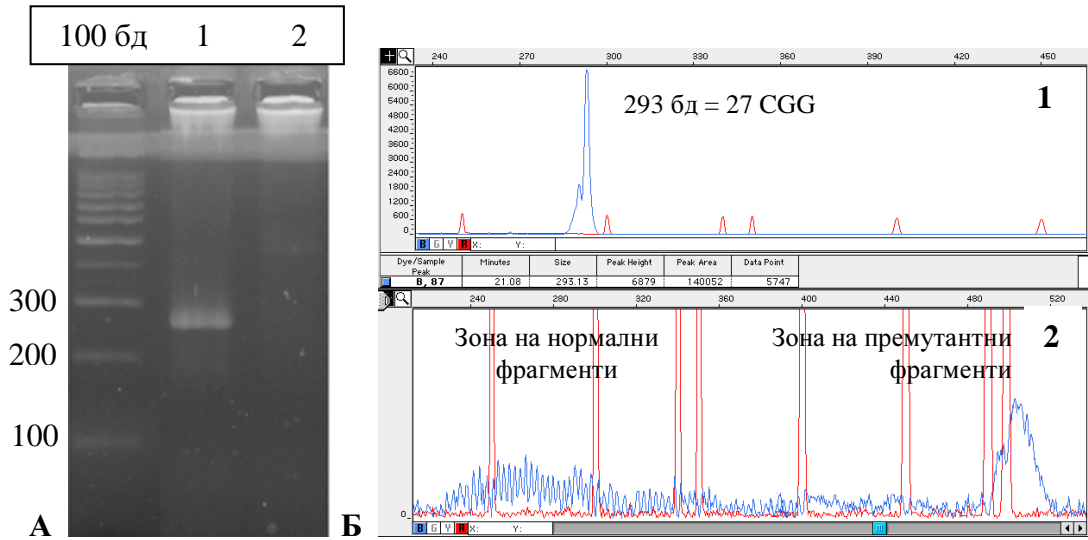
Този метод дава възможност в допълнение да се диагностицират случаи на FXSE (FraXE, FMR2 гена), което го прави много подходящ за диагностика на всички възможни варианти на синдром на чуплива X хромозома. Анализирани от нас гени (FMR1 и FMR2) са разположени на X хромозомата, поради което откриването на делеции в тези гени при пациенти от мъжки пол е лесно, тъй като води до липса на фрагмент от електрофоретичния профил. Наличието на дупликации при пациенти от мъжки пол води до двойно по-висок пик за дублицирания фрагмент(и) в сравнение с нормална контрола. В този случай се изисква извършването на математически калкулации за количествена оценка на получените генни фрагменти. По-високите пикове се калкулират спрямо контрола, като получено съотношение >1.6 се интерпретира като дупликация (виж Материали и Методи т.3.3.8.).

Използваната от нас MS-MLPA методика за анализ на пациенти със синдром на чуплива X хромозома е публикувана в BMJ Case Report [Todorov et al., 2009].

4.1.4. РЕЗУЛТАТИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНАТА ГРУПА МОМЧЕТА:

Всички пациенти от изследваната група и техните майки бяха подложени първо на PCR амплификация с описания по-горе бетаин обогатен протокол. В допълнение всички пробанди бяха изследвани и с MS-MLPA за оценка на хиперметиране в промоторната област на FMR1 гена, делеции и дупликации в този ген и евентуални отклонения в FMR2 гена (FraXE). Резултатите от генетичните изследвания са представени в Приложение 1. При трима пациенти (#9, #18 и #31 в Приложение 1) не беше получен амплификационен продукт в зоната на нормалните CGG повтори на агарозна електрофореза (Фигура 22A).

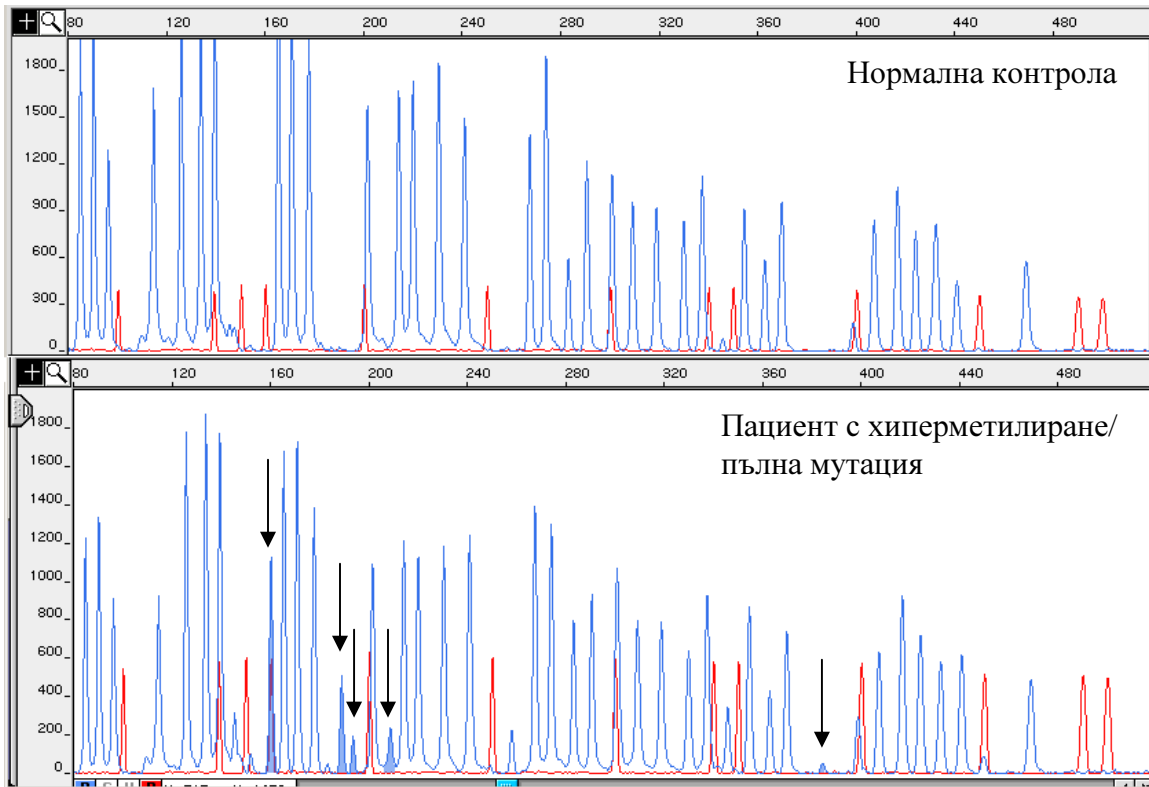
Капилярната електрофореза при пациенти #9 и #18 също показва липса на нормални фрагменти, докато при пациент #31 беше наблюдавана динамична мутация, мозаечен профил - нормални фрагменти/премутантни фрагменти/пълна мутация (Фигура 22Б).



Фигура 22. Електрофоретичен профил на PCR продукт на CGG повтора в FMR1 гена при: 1-майка носителка на премутация (1 нормален алел) и 2-болно момче, носещо динамична мутация (нормални фрагменти/премутантни фрагменти/пълна мутация). (А)-агарозна електрофореза; (Б)-капилярна електрофореза.

При майките на тези пациенти беше установено наличието само на един нормален CGG фрагмент и един увеличен алел (премутация) с размери съответно около 70, 90 и >150 CGG повтора (виж Фигура 21).

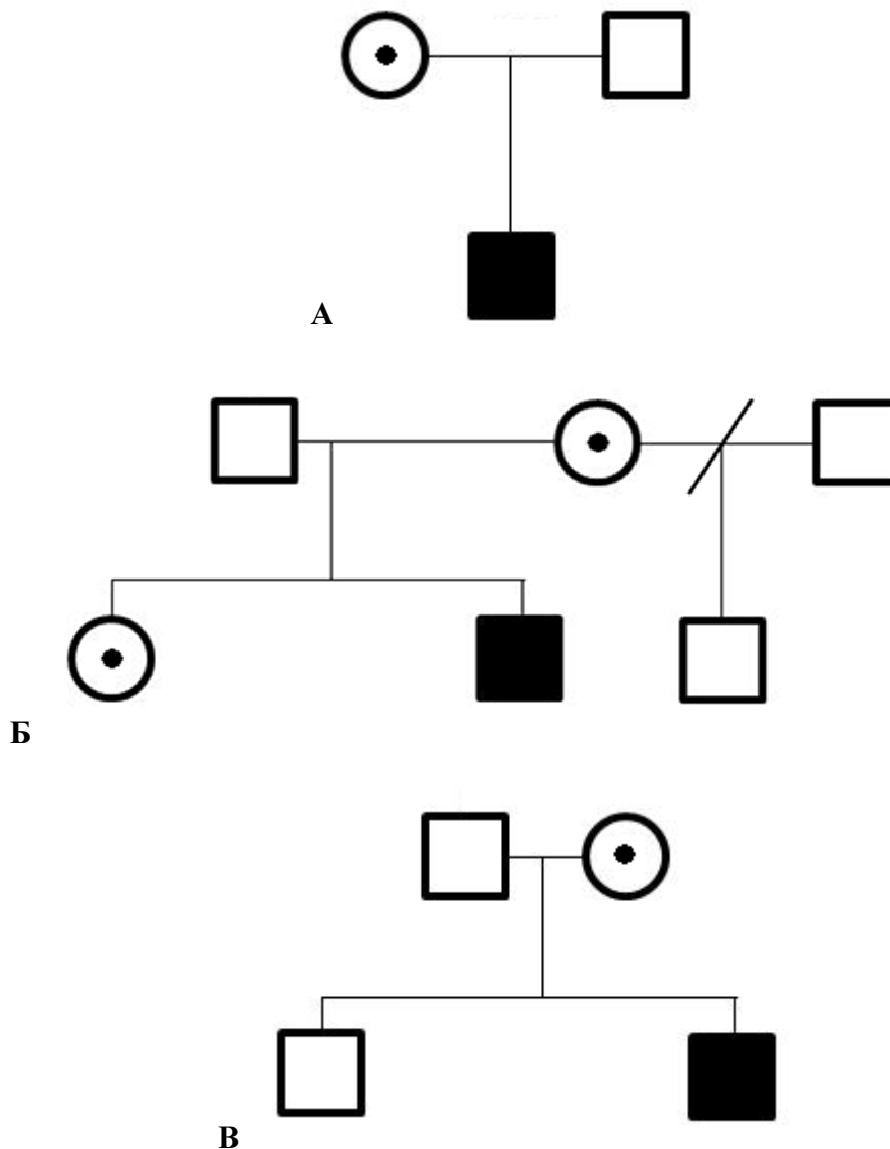
MS-MLPA анализът показва наличието на хиперметиране в промоторната област на FMR1 гена при тримата пациенти #9, #18 и #31 (Фигура 23), което напълно потвърждава наличието на пълна мутация (експанзия >200 CGG повтора).



Фигура 23. MS-MLPA профил за анализ на FXS. След рестрикция с чувствителна към метилиране рестриктаза *Nhe* I при пациент носител на пълна мутация се появяват 5 фрагмента (посочени със стрелки) поради хиперметиране на промоторната област на *FMR1* гена. При нормална контрола тези 5 неметиранни фрагмента се срязват от рестриктазата и липсват като амплификационен профил.

Наблюдаваната динамична мутация при един от нашите пациенти представлява мозайка от нормални фрагменти/премутантни фрагменти/пълна мутация. Тази мутация е резултат от унаследяване на майчиния нестабилен премутантен алел, като най-вероятно този нестабилен алел претърпява множество делеции/експанзии в рамките на самия CGG повтор. Тежестта на наблюдаваната клинична симптоматика при пациент с такъв тип генен дефект би трябвало да зависи от пропорцията на нормалните алели спрямо алелите с пълна мутация в клетките на централната нервна система и мозъка.

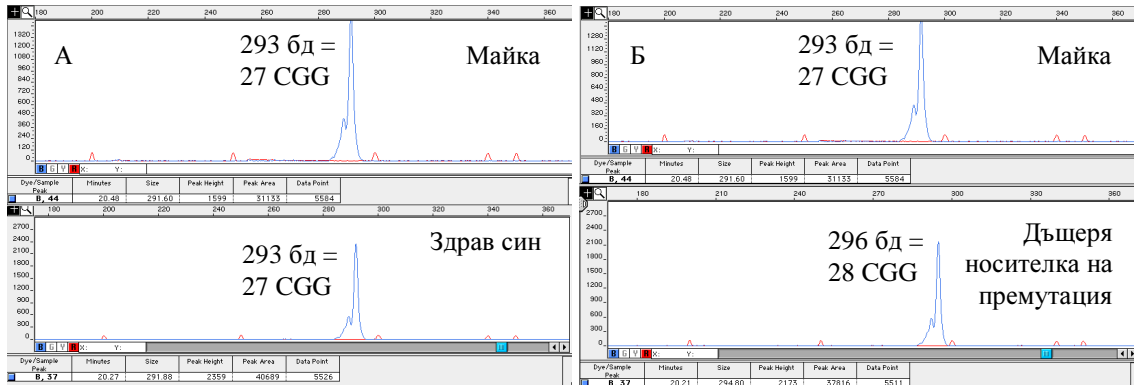
Родословната информация при трите семейства е представена съответно на Фигура 24А, Б и В.



Фигура 24. Родословна информация на пациентите с генетично доказан FXS. (А) родословие на пациент #9; (Б) родословие на пациент #18; (В) родословие на пациент # 31.

В семейството на пациент #18 майката носи един нормален алел с размер 27 CGG повтора и един премутантен алел с размер 70 повтора (виж Фигура 21). В това семейство бяха изследвани и здравите брат и сестра на пробанда. Генетичният анализ показва, че здравото момче е унаследило от майка си нормалния фрагмент с размер 27 CGG повтора. Сестрата на пробанда не носи здравия майчин алел (наблюдава се загуба на майчин алел, Фигура 25), което показва че тя е унаследила

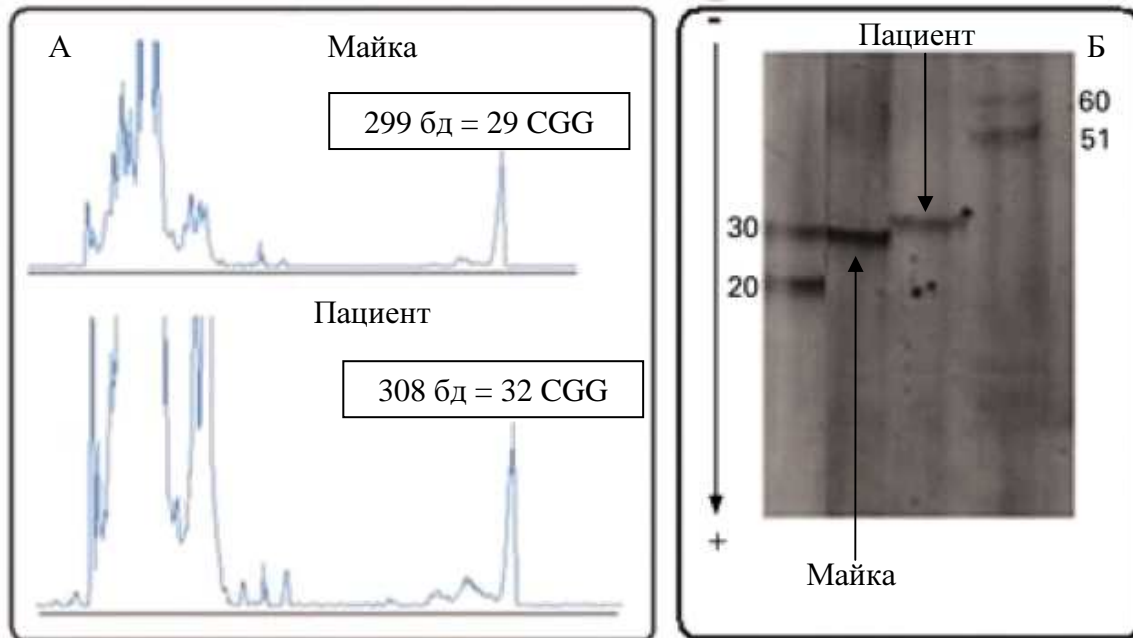
от майка си премутантния алел и има риск 50% да предаде този дефект в поколението си (50% болни момчета и 50% момичета носителки на премутация/пълна мутация).



Фигура 25. Електрофоретичен профил на PCR продукт на CGG повтора в FMR1 гена при майката, здравия брат и сестра носителка в семейството на пациент #18.

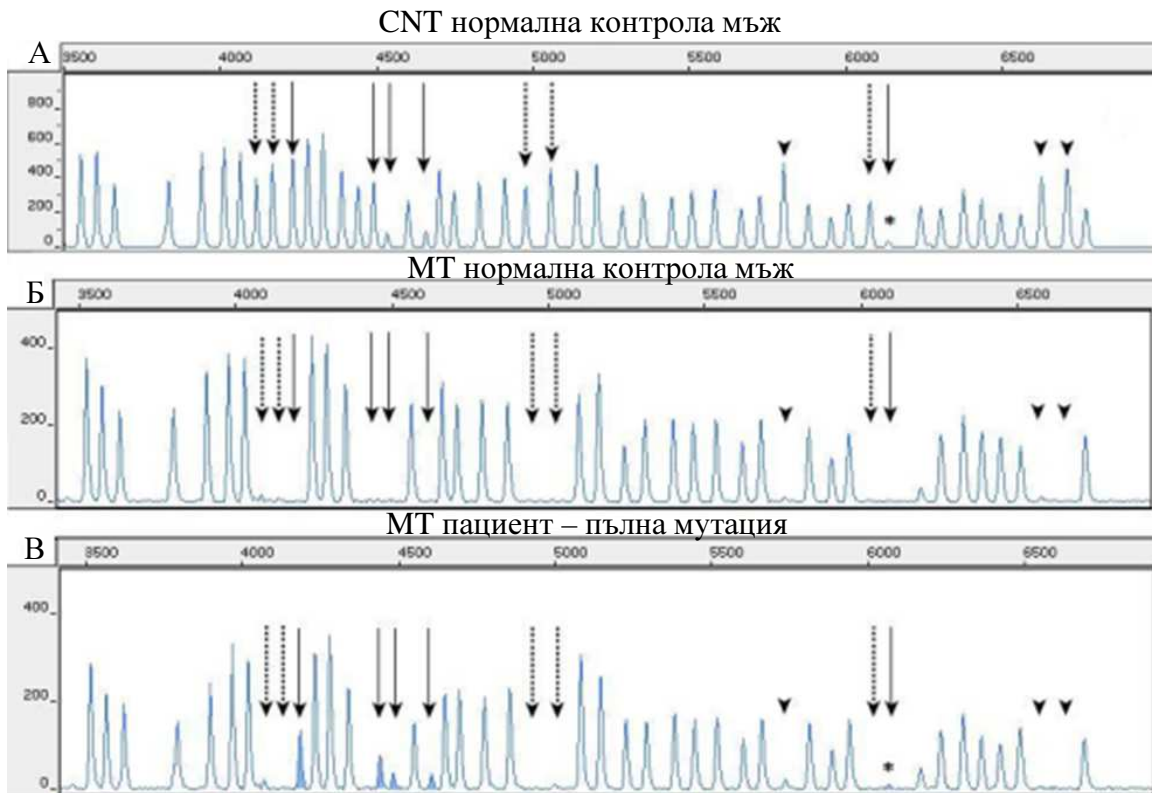
В трите представени по-горе семейства молекулярно-генетичните изследвания потвърдиха клиничната диагноза синдром на чуплива X хромозома.

Интерес представлява пациент #3 в Приложение 1, където резултатът от PCR анализа при майката показва наличието на един нормален алел 29 ± 1 CGG повтора, а при сина показва също наличието на един CGG повтор в зоната на нормалните фрагменти. Прецизното оразмеряване на нормалния фрагмент при болното момче на автоматичен секвенатор показва, че неговият повтор е в зоната на нормата, но с три CGG повтора по-тежък (32 ± 1 CGG) от нормалния фрагмент на майката (Фигура 26А). Резултатът е потвърден чрез PCR/Southern хибридизация (Фигура 26Б).



Фигура 26. (А) Капилярна електрофореза на PCR продукт на CGG повтора в FMR1 гена. (Б) PCR/хибридизация по Southern на CGG повтора в FMR1 гена.

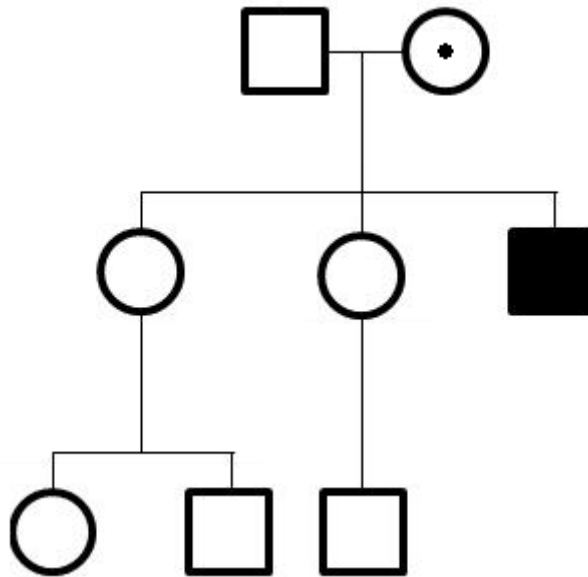
MS-MLPA анализът при пациента показва наличието на хиперметиране в промоторната област на FMR1 гена (Фигура 27). Този резултат потвърди предположението, че се касае за мозайка от нормален фрагмент и пълна мутация при изследвания пациент.



Фигура 27. MS-MLPA профил. Непрекъснатите стрелки посочват специфичните по отношение на метилирането сонди в FMR1 гена. Прекъснатите стрелки посочват специфичните по отношение на метилирането сонди в FMR2 гена. Триъгълниците посочват контролни за рестрикцията фрагменти. (А) Тест на брой копия (CNT) при нормален индивид от мъжки пол. (Б) Тест за метилиране при нормална контрола мъж. (В) Тест за метилиране при пациент с пълна мутация.

Всички специфични по отношение на метилирането фрагменти (посочени с различните стрелки) липсват в резултат на рестрикцията с HhaI при нормална контрола мъж. Петте FMR1 екзон 1, специфични по отношение на метилирането сонди дават амплификационни фрагменти при пациента (пиковете са маркирани в синьо), като резултат от хиперметилиране и не са подложени на рестрикция от HhaI. Останалите, специфични по отношение на метилирането фрагменти за FMR2 и контроли на рестрикцията липсват при пациента, което показва че рестрикцията е успешна и няма хиперметилиране по дължината на FMR2 гена.

Резултатът от молекулярно-генетичния анализ напълно съвпада с наблюдаваната лека клинична симптоматика при този пациент (виж Приложение 1), което най-вероятно се дължи на наличието на нормален CGG алел в клетките на пациента. Родословната информация в това семейство е представена на Фигура 28.



Фигура 28. Родословна информация на пациент #3 с генетично доказан FXS.

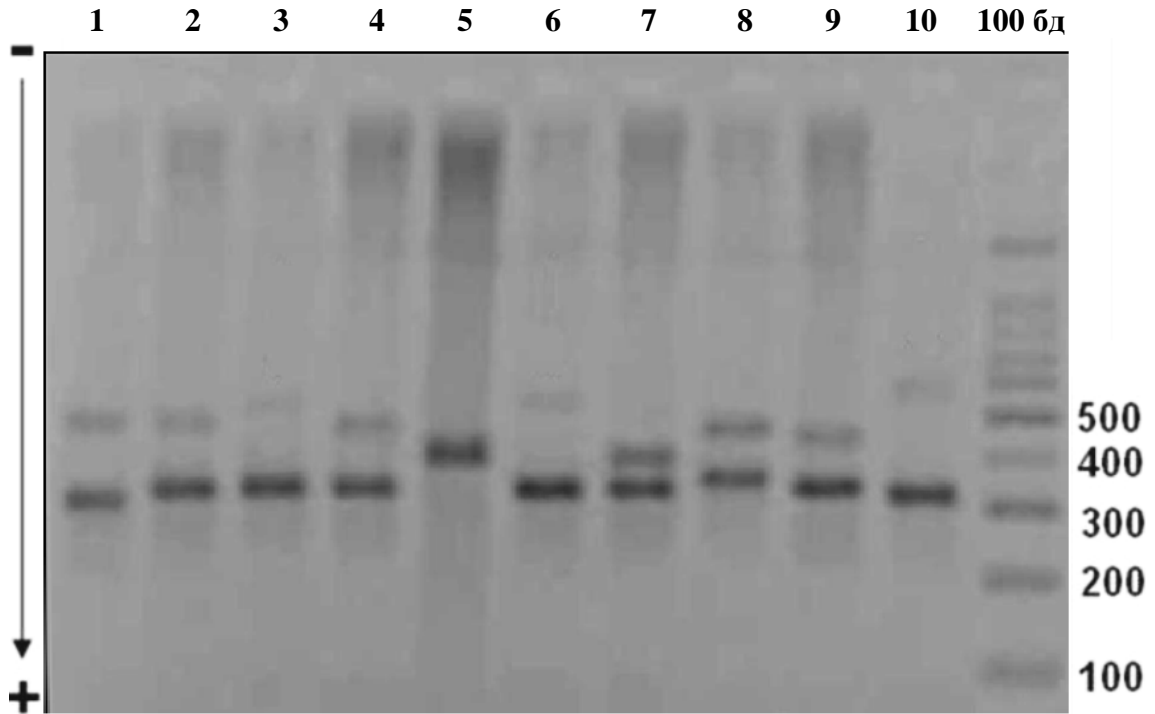
Пробандът към датата на изследването е 23 годишен с интелектуални нарушения от ранна детска възраст, но без физически отклонения и лицев дисморфизъм. Няма забавяне в говора, но речевия състав е доста ограничен. Имал е проблеми с обучението от ранна детска възраст, трудно поддържа очен контакт и се забелязва дефицит на внимание. Завършил е училище за проблемни деца. По отношение на поведенческите отклонения рядко се забелязват хиперактивност и агресия. В момента работи като общ работник на строителни обекти и по думите на майката е самостоятелен и се справя добре.

Този случай на мозайка нормален алел/пълна мутация беше описан подробно в BMJ Case Report [Todorov et al., 2009]. По наше мнение, мозаечният модел на нормален алел с пълна мутация е резултат от унаследяване на майчиния нестабилен премутантен алел, като най-логичният механизъм за възникване на

нормалния алел е делеция (регресия) на пълната мутация в рамките на самия CGG повтор, тъй като използваните от нас PCR праймери бяха дизайнирани във фланкиращите региони на повтора [Nolin et al., 1994; Mila et al., 1996; Schmucker & Seidel, 1999; Grasso et al., 1999]. До момента в световната литература има само един публикуван случай на регресия на майчина премутация до нормален алел без да е мозайка с премутация или пълна мутация, което води до здраво момче [Tabolacci et al., 2007]. Предполага се че тези случаи може да не са толкова редки в природата, но да остават неизвестни поради липса на клинична симптоматика.

Описаният в настоящата работа мозаечен случай е първата публикация за успешното приложение на MS-MLPA анализа за диагностични цели при FXS. В допълнение нашите резултати показаха, че комбинираното приложение на PCR с MS-MLPA дава възможност в няколко стъпки да се диагностицират нормални FMR1 алели, да се предвидят експанзии, да се оцени метилирането на CpG островите в промоторната област на FMR1 гена, както и да се открият големи делеции и дупликации по дължината на FMR1 и FMR2 гените. Освен това, нашият опит с приложението на тези методики при диагностика на FXS пациенти, показва че те могат да се използват успешно и за диагностика на мозаечни случаи, които са доста честа находка при синдром на чуплива X хромозома. Нашият опит в молекулярно-генетичната диагностика на синдром на чуплива X хромозома показва, че не е правилно да се изследва пациент за FXS без неговата майка. В конкретния случай на мозаечен пациент с нормален алел и пълна мутация, ако бяхме изследвали само пациента наличието на нормален алел можеше да доведе до грешна интерпретация на резултатите. Освен това, при всички пациенти задължително се провежда и анализ за метилиране чрез MS-MLPA, независимо от предварителния резултат от амплификацията.

Използването на представения по-горе PCR протокол е подходящо за скринингови цели при жени, интересувани се от носителския си статус, защото нормалните алели и премутациите се детектират успешно с амплификационния анализ и агарозна електрофореза с визуализация – етидиев бромид (Фигура 29).



Фигура 29. Агарозна електрофореза на PCR продукти на CGG повтора в FMR1 гена при жени носителки на премутация. Генотиповете на представените проби, предварително оразмерени с капиларна електрофореза са: 1-21/74 CGG; 2-25/75 CGG; 3-29/~90 CGG; 4-29/70 CGG; 5-50/56 CGG; 6-26/~90 CGG; 7-29/50 CGG; 8-35/67 CGG; 9-29/62 CGG; 10-28/~100 CGG.

В допълнение MS-MLPA анализът е подходящ за скринингови програми при новородени момчета, тъй като открива само пълни мутации, свързани с клинична изява и изпуска премутациите, които нямат клинична симптоматика.

От изследваните 32 семейства с диагноза FXS при 4 семейства (12,5%) диагнозата беше верифицирана на молекулярно ниво. Получените резултати от ДНК анализа при три семейства бяха потвърдени в Leuven, Belgium.

4.1.5. ДОПЪЛНИТЕЛНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ПРИ ГЕНЕТИЧНО НЕИЗЯСНЕНИТЕ ПАЦИЕНТИ

Останалите пациенти са с неясна диагноза. При тях бяха проведени допълнителни молекулярно-генетични изследвания, в зависимост от наблюдаваната

съпътстваща клинична симптоматика. При пациентите с епилептична симптоматика беше изследван ARX генът, мутации в който водят до подобен вид клиника [Stromme et al., 2002b; Mandel and Chelly, 2004].

В литературата бяха описани мутации в MECP2 гена при момчета, като причина за леко умствено изоставане в комбинация със затлъстяване, клинична симптоматика, припокриваща се с PWS (виж по-надолу текста) [Kleefstra et al., 2002]. Пациентите, които бяха скринирани допълнително за мутации в ARX и MECP2 гените са посочени в Приложение 1.

При тази група пациенти не бяха открити мутации в ARX и MECP2 гените.

При тримата пациента със съпътстваща диагноза PWS/AS (Приложение 1, колона 1), бяха проведени и молекулярно-генетични изследвания за PWS/AS (виж по-надолу текста), но и тези тестове не доведоха до изясняване на диагнозата. Пациенти #13 и #23 от Приложение 1 бяха изследвани и с MLPA кита за микроделеционни синдроми (виж по-надолу текста), но не бяха открити патологични изменения.

Въпреки проведеният широк спектър молекулярно-генетични изследвания в групата момчета с умствено изоставане и предполагаема клинична диагноза FXS, голям процент от тях останаха с неизвестен генетичен дефект. Причина за това, от една страна, е смесеният характер на изследваната група, в която попадат и пациенти с чисто аутистично поведение и дискретни синдромни изменения, при които целта на теста е по-скоро изключване на диагноза FXS. От друга страна, става ясно че умственото изоставане при момчета е полигенно детерминирано, като мутации в X-свързани и автозомни гени са отговорни за сходна клинична симптоматика. Нашата група пациенти с все още неизвестен молекулен дефект представляват обект за нови проучвания за търсене на нови гени и локуси, мутации в които водят до умствено изоставане. Тези пре-скринирани пациенти, при които са изключени най-честите възможни генетични причини, са подходящи и за научни проучвания с микрочипов анализ. Имайки предвид високата себестойност на тестовете от нова генерация, анализиращи целия геном, от изключителна важност е пациентите да бъдат предварително скринирани за най-честите известни генетични причини и да се изключат тези, които се дължат на дефекти във вече известни гени.

4.2. RTT

4.2.1. КЛИНИЧНИ СИМПТОМИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНАТА ГРУПА МОМИЧЕТА С ДИАГНОЗА РЕТТ СИНДРОМ

Изследваните момичета с клинична диагноза RTT бяха разпределени в две групи на базата на клиничната симптоматика: с класически Rett синдром и с атипичен Rett синдром. Клиничните симптоми са представени в Приложение 2. Степента на умствено изоставане в тази група пациенти варира от лека (IQ=50-69) до много тежка (IQ<20). Като съпътстваща диагноза в някои от случаите се споменава аутизъм, West синдром (OMIM#308350), симптоматична (криптогенна) епилепсия, PWS/AS и Pitt-Hopkins синдром (OMIM#610954). Заболяването при всички представени случаи има прогресиращ характер. Началото на заболяването варира между първите месеци след раждане и 3 годишна възраст. При всички изследвани случаи липсват говорни умения и се наблюдава загуба на социален контакт. Друга характерна особеност при всички засегнати деца от тази група е наличието на стереотипни движения на ръцете, симптом на „миеци ръце“ и краката. Моторното развитие при тези деца е също тежко засегнато. Наблюдава се мускулна хипотония, забавен растеж на главата, клатещо се нестабилно тяло или ходене на пръсти, сколиоза. В някои случаи самостоятелното придвижване е невъзможно. Гърчове и епилептични припадъци са регистрирани при 15 пациента. Лицев дисморфизъм (микроцефалия) се наблюдава при около 1/4 от изследваните момичета. Всички деца от изследваната група не контролират тазови резервоари.

Появяват се дихателни проблеми, които се задълбочават при стрес, дишането обикновено е нормално в спящо състояние и се появяват проблеми в будно състояние. Губят се нормалните способности за сън. Наблюдават се проблеми в циркулацията, които водят до студени, посиняли крака и ръце. В допълнение се забелязват гастроинтестинални проблеми, включващи тежък гастроезофагеален рефлукс. Налице е обилно слюнкоотделяне.

Десет от изследваните момичета с умствено изоставане (26%) са родени след патологична бременност и операция чрез Цезарово сечение. Редица

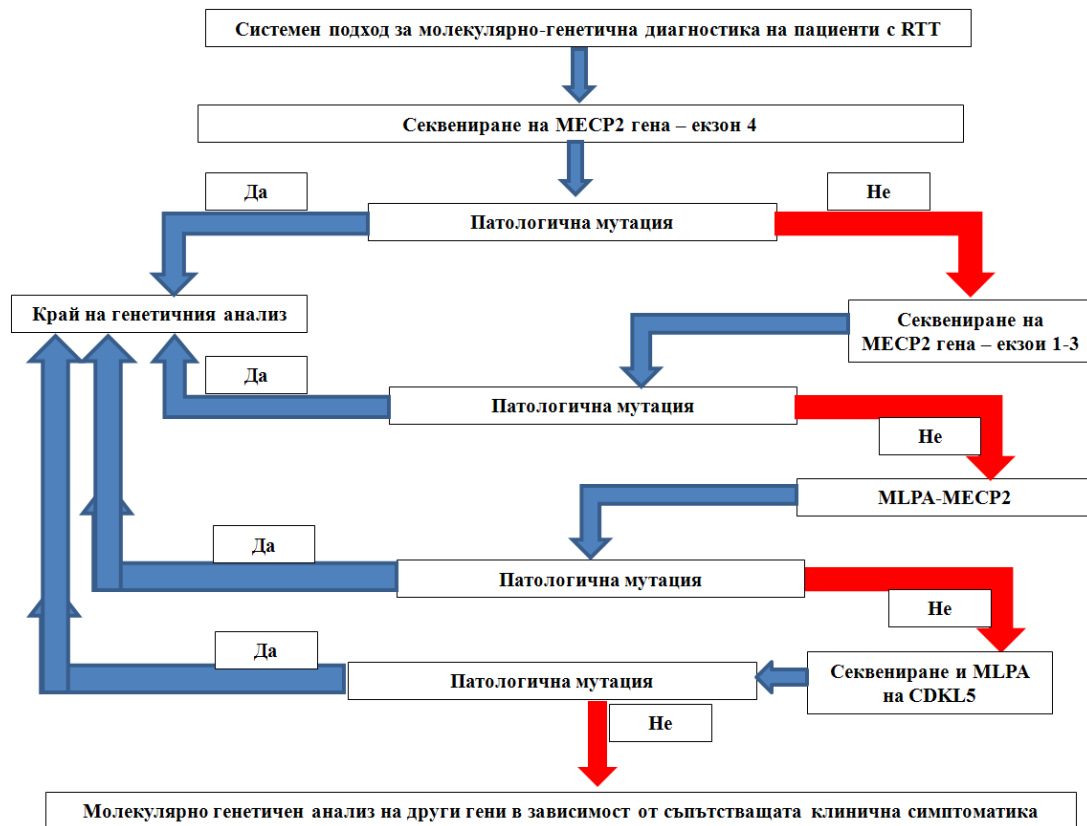
ваксинации или прекарани тежки инфекциозни заболявания се съобщават от родителите като отключващ фактор за поява на първите патологични симптоми.

4.2.2. ЦИТОГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

Като първа стъпка в процеса на изясняване на диагнозата при пациенти с предполагаем Rett синдром се извършва хромозомен анализ (кариотип), с помощта на който могат да бъдат отдиференцирани големи хромозомни преустройства, ангажиращи гени на X хромозомата и по този начин причиняващи симптоматика на Rett синдром. Хромозомният анализ при 37 от изследваните 38 пациента показва нормален резултат. Само при един пациент #6 от Приложение 2 беше установен патологичен кариотип, делеция на късото рамо на X хромозомата 46,XX,del(X)(p1.22).

4.2.3. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

Разработеният от нас системен подход за молекулярно-генетични изследвания на Rett синдром е представен на Фигура 30.



Фигура 30. Системен подход за молекулярно-генетичен анализ на пациенти с RTT.

1. Секвениране на MECP2 гена

Изследванията започват с PCR/секвениране на екзон 4 на MECP2 гена, където попадат 75% от точковите мутации, малки делеции и комбинираната инсерция/делеция при изследваните пациенти (виж по-надолу Таблица 16). Следва секвениране на останалите екзони от MECP2, където до момента беше намерена една инсерция на 4 бд в екзон 3 при български пациент.

След пълното прочитане на кодиращата последователност, екзон/интронните граници и промоторната област на MECP2 гена, се преминава към MLPA анализ за търсене на големи делеции и дупликации по дължината на MECP2 гена. С помощта на този анализ бяха открити две големи делеции на екзон 3 и част от екзон 4 на MECP2 гена.

2. MLPA анализ за търсене на големи делеции и дупликации

Секвенционният анализ на МЕСР2 гена има едно сериозно ограничение - изпуска големи дефекти (делеции и дупликации), обхващащи повече от един екзон. Големите делеции и дупликации на X хромозомата до скоро оставаха неидентифицирани при жени, поради липсата на надежден диагностичен метод разпознаващ нормална от увредена X хромозома.

Този проблем беше преодолян с въвеждането на MLPA анализ [www.mlpa.com]. Първото приложение на тази техника за диагностични цели в България беше направено от нашия екип за диагностика на X хромозомни делеции при мускулна дистрофия тип Дюшен/Бекер [Todorova, Todorov et al., 2008]. В последствие тази разработка беше използвана за въвеждане на други MLPA китове, базиращи се на тест на брой копия за диагностика на други X – свързани заболявания, като разглежданите тук умствени заболявания.

В настоящия дисертационен труд ние използвахме MLPA кит, анализиращ едновременно X хромозомните гени МЕСР2, CDKL5 и ARX, големи делеции или дупликации в които биха могли да са асоциирани с умствено изоставане при момичета. При изследване на момичета за гени от X хромозомата интерпретацията на резултатите е комплицирана, поради наличието на две копия от X хромозомни гени. Делеция при пациент от женски пол се детектира като наполовина намален пик(ове), спрямо този/тези при контролата. Наличието на дупликация се детектира като по-висок пик(ове) от този/тези при контролата.

Прецизната интерпретация на резултатите изисква извършването на математически калкулации за количествена оценка на получените генни фрагменти. За нашите цели най-подходящ се оказа следният математически алгоритъм: всеки фрагмент отчетен като променен (по-нисък или по-висок) спрямо контролата се калкулира самостоятелно и независимо от останалите; пресмята се средно аритметично от площите на двата съседни пика (преди и след анализирания от нас пик); площта на анализирания пик се разделя на средно-аритметичната стойност от двата съседни пика; получената стойност се разделя на аналогичната стойност при контролата; полученото съотношение се интерпретира както следва:

съотношение около 1 – нормален резултат
съотношение <0.6 – делеция
съотношение >1.6 – дупликация

3. Други изследвани гени

В допълнение, в зависимост от клиничната симптоматика при част от засегнатите момичета беше секвениран генът CDKL5, където се съобщават около 5-10% от мутациите асоциирани с Rett синдром. Съпътстваща диагноза PWS/AS също беше проверена със съответните молекулно-генетични тестове (виж по-надолу текста).

4.2.4. РЕЗУЛТАТИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНАТА ГРУПА МОМИЧЕТА С RETT СИНДРОМ

В хода на проведените молекулярно-биологични изследвания бяха открити точкови мутации при 7 пациента (7/38=18.4%). Точковите мутации засягат 5 различни нуклеотидни/аминокиселинни позиции. Резултатите са представени в Таблица 16 (номера 1-5) и Фигури 31 (А до Д). Откритите нуклеотидни замени са от 5 типа и всички те попадат в екзон 4 на MECP2 гена: с.473C→T, p.Thr158Met; с.763C→T, p.Arg255X (открита при две момичета); с.808C→T, p.Arg270X (открита при две момичета); с.880C→T, p.Arg294X и с.916C→T, p.Arg306Cys. Всички точкови мутации в изследваната група представляват транзиции на С към Т. Всички тези транзиции засягат CpG динуклеотид, където 5-метилцитозин лесно се деаминира и преминава в тимин, пропуска се от поправящите системи и остава фиксиран в генома като патологична мутация (model of mutagenesis by methylation-mediated deamination in CpGs) [Kunkel and Alexander, 1986]. В два от случаите се заменя една аминокиселина с друга. Missense мутацията p.Thr158Met засяга неконсервативен остатък в домена на белтъка, отговорен за свързване с метилиран регион (Methylation Binding Domain, MBD). Оказва се, че мутантният протеин свързва само два пъти по-слабо метилирана ДНК в сравнение с дивия тип.

Компютърното моделиране с цел анализ на влиянието на мутацията p.Thr158Met върху структурата на MBD показва почти идентични резултати между дивия и мутантния тип, което означава че MBD запазва нормалните си свойства и функционална специфичност [Ghosh et al., 2008]. Тези резултати съвпадат и с данните от кръговия дихроизъм, които показват, че вторичната структура на

мутантния p.Thr158Met тип е сходна с тази на дивия тип, както в отсъствие, така и в присъствие на ДНК [Ghosh et al., 2008]. От друга страна обаче, температурната стабилност на MBD при мутантния протеин е съществено намалена в сравнение с дивия тип [Ghosh et al., 2008], което най-вероятно обяснява патологичната роля на този протеин.

Таблица 16. Мутации в MECР2 гена при пациенти с диагноза Rett синдром.

№	Екзон	Нуклеотидна замяна	Аминокиселинна замяна
1	4	c.473C→T	p.Thr158Met
2	4	c.763C→T*	p.Arg255X
3	4	c.808C→T*	p.Arg270X
4	4	c.880C→T	p.Arg294X
5	4	c.916C→T	p.Arg306Cys
6	4	c.1157_1200 del44	p.Leu386fs
7	3 и част от екзон 4	c.27-?_*?del*	Делеция на част от белтъка
8**	4	c.[584_624del41insTT; 638delTinsCA]	Indel (frameshift)
9**	3	c.321insGAAG	p.(Lys107fs)

* Тези мутации са открити при двама пациенти

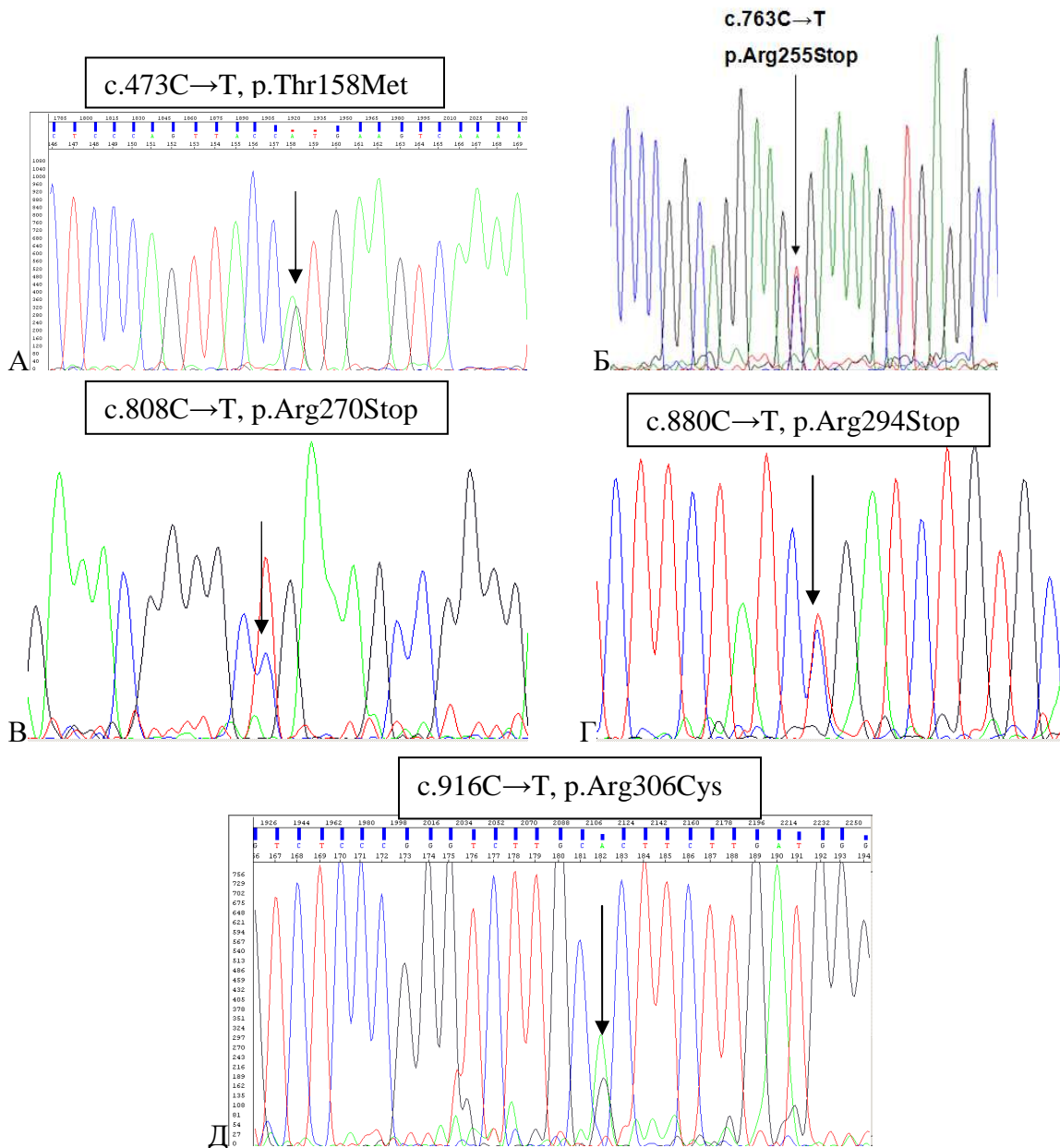
Мутациите са съобщени в мутационната база данни за MECР2 гена, с изключение на №8 и 9, отбелязана със **, които са непубликувани до момента [www.mecp2.chw.edu.au].

Мутациите са открити със секвенционен анализ, с изключение на №7, открита чрез MLPA.

Въпреки че, механизмът на повлияване структурата и/или функцията на протеина при мутацията p.Thr158Met е доста неясен, се установява, че това е една от най-честите мутации в MECР2 гена [Ballestar et al., 2000]. Авторите предполагат, че този аминокиселинен остатък може да играе друга важна роля в белтъчната функция, като например може да участва във взаимодействия с домена, отговорен за подтискане на транскрипцията (transcriptional-repression domain).

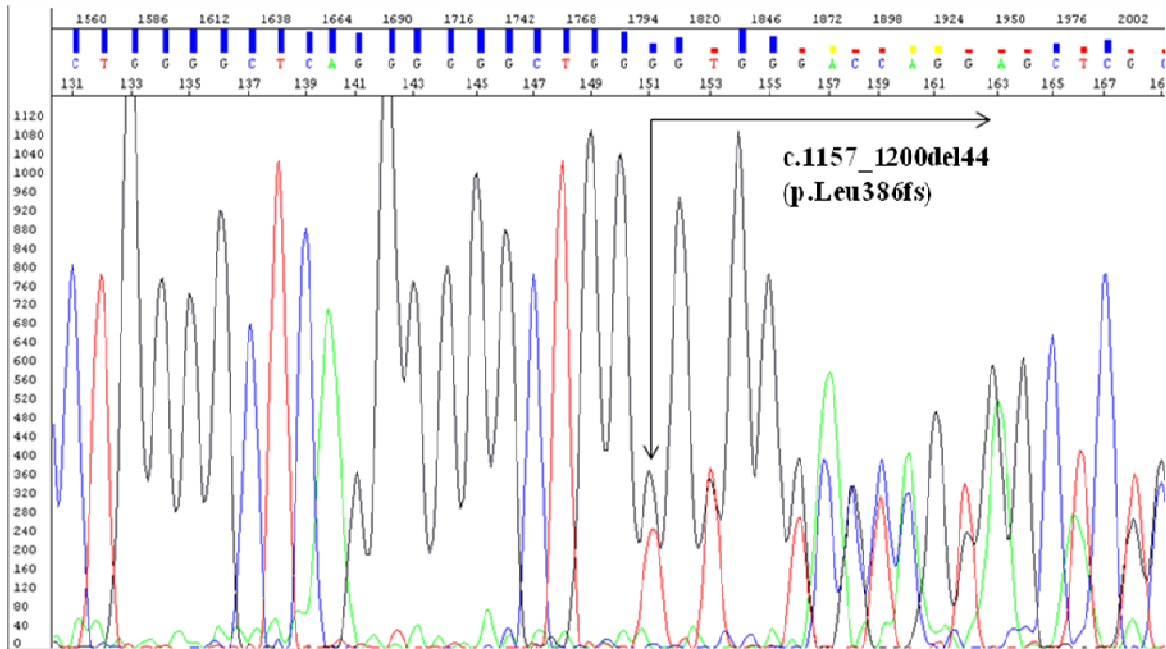
Втората missense мутация p.Arg306Cys се намира в домена, отговорен за подтискане на транскрипцията (transcriptional-repression domain), но за момента

няма доказан ефект върху белтъчната функция, въпреки че патогенната ѝ роля е безпорна, тъй като е отново една от често срещаните мутации при РТТ пациенти. Останалите три точкови мутации генерират стоп кодон (nonsense) и по този начин причиняват преждевременно прекратяване на белтъчната синтеза и тежка клинична изява на заболяването.



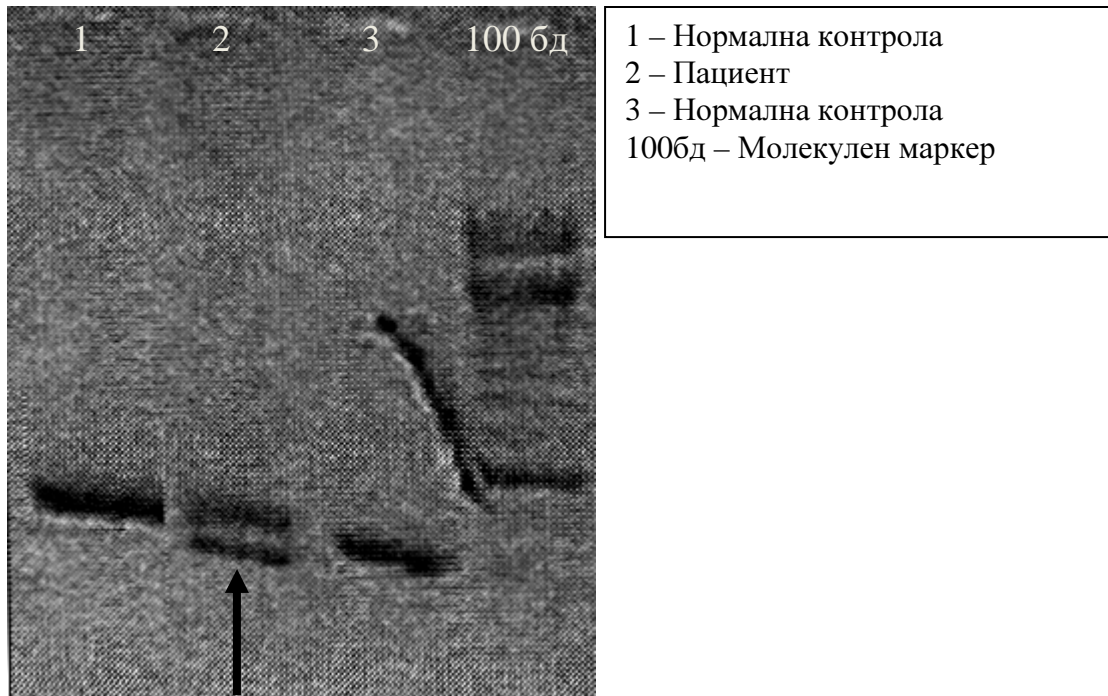
Фигура 31 (А-Д). Секвенционен анализ, показващ точкови мутации в МЕСР2 гена, открити в настоящето проучване

В допълнение секвенционният анализ на екзон 4 от МЕСР2 гена доведе и до откриването на една делеция на 44 бд - c.1157_1200del44, p.Leu386fs (Фигура 32).

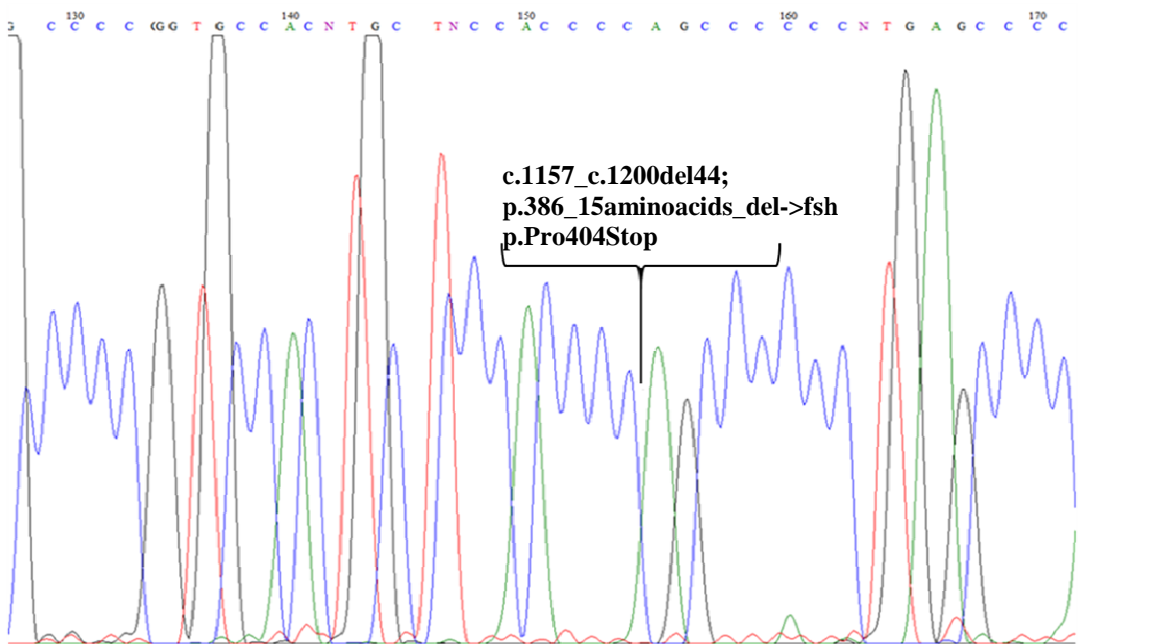


Фигура 32. Секвенционен анализ, показващ мутацията c.1157_c.1200del44; p.386_15aminoacids_del->fsh p.Pro404Stop

За потвърждаване на тази делеция и прецизно определяне на точната 5' и 3' точка на разкъсване (breakpoint) беше използван нов амплификационен продукт, в средата на който попада предполагаемия делетиран регион. Амплификационният продукт беше разделен на 3% агарозен гел и визуализираният по-лек патологичен фрагмент (Фигура 33) беше екстрахиран от гела, ре-амплифициран и секвениран (Фигура 34). По този начин беше доказана делецията на 44 базови двойки в екзон 4 на МЕСР2 гена.

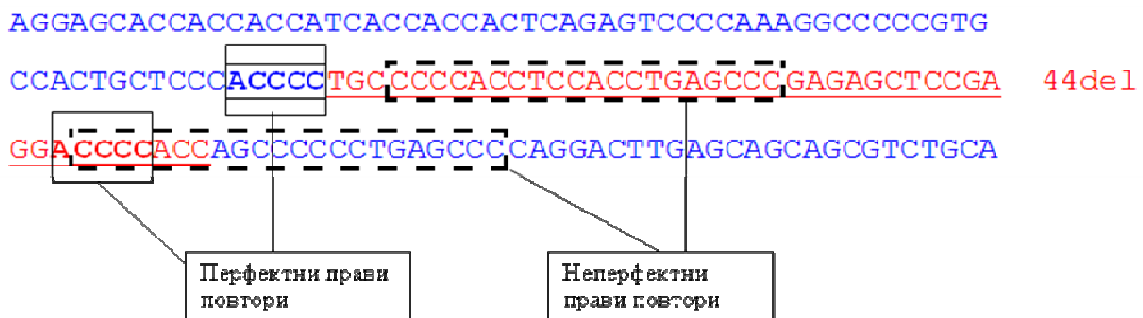


Фигура 33. Агарозна електрофореза, показваща нормален и делетиран фрагмент (посочен със стрелка)



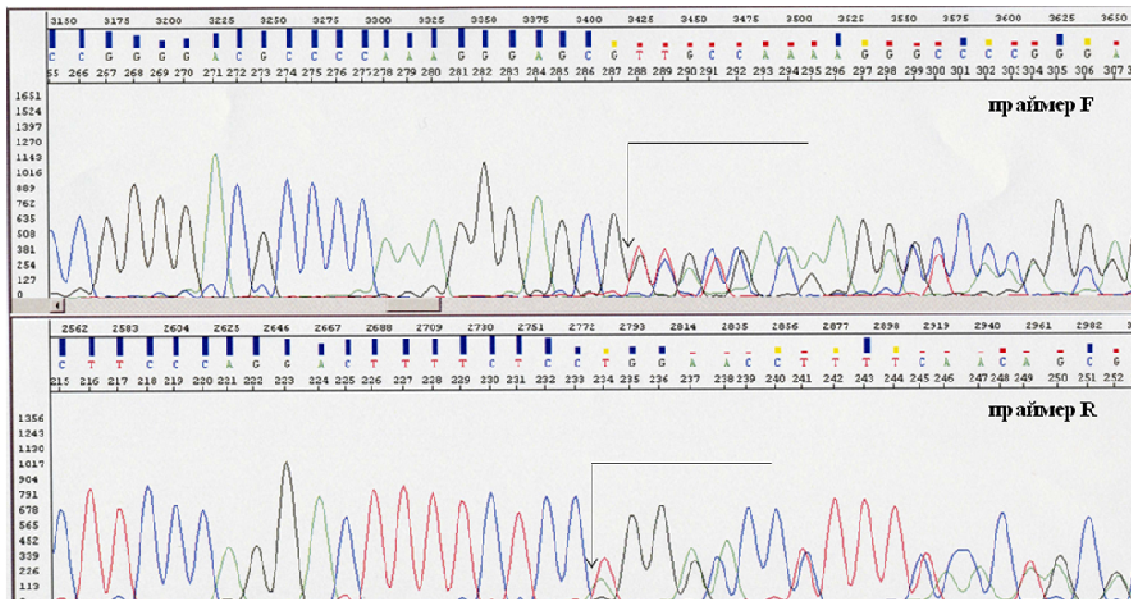
Фигура 34. Секвенционен анализ, показващ мутацията c.1157_c.1200del44; p.386_15aminoacids_del->fsh p.Pro404Stop

Тази делеция причинява разместване на рамката на четене на генетичната информация и по този начин води до преждевременно прекратяване на белтъчната синтеза. Свързана е с тежка клинична изява на заболяването при нашия пациент. Интересно е да се отбележи, че тази делеция попада в един от делеционните „горещи региони” за МЕСР2 гена, като в този регион са докладвани делеции на 41, 44, 46 и 70 нуклеотида, както и комплексни мутационни събития като indels [De Vona et al., 2000; Lee et al., 2001]. По отношение на клиничната изява на тези мутации е важно да се отбележи, че „preserved speech variants” с подобна на RTT клиника също се дължат на делеции на 41 и 44 нуклеотида точно в този регион, което ги определя като алелни форми на класическия RTT [De Vona et al., 2000]. Фактът че в горещия делеционен регион се случват de novo еднотипни мутационни събития, предполага участие на околната секвенция (микросреда) в провокирането на молекулните дефекти. Задълбоченият анализ на околната секвенция, фланкираща делециите в този регион, показва наличието на директни (прави) повтори, които биха могли да провокират приплъзване на полимеразата в хода на репликацията [De Vona et al., 2000]. Микросредата, в която се случва откритата в настоящето проучване делеция на 44 бази е представена на Фигура 35. Наличието на перфектни и неперфектни директни (прави) повтори в двата фланга на делецията предполагат репликационни приплъзвания на полимеразата, последвани от неточни сръзвания и/или снаждания като най-вероятен механизъм за възникване на мутацията.



Фигура 35. Анализ на секвенцията в непосредствена близост до 44бд делеция в МЕСР2 гена. Делетираните бази са представени в червено. Анализираниите прави повтори са оградени.

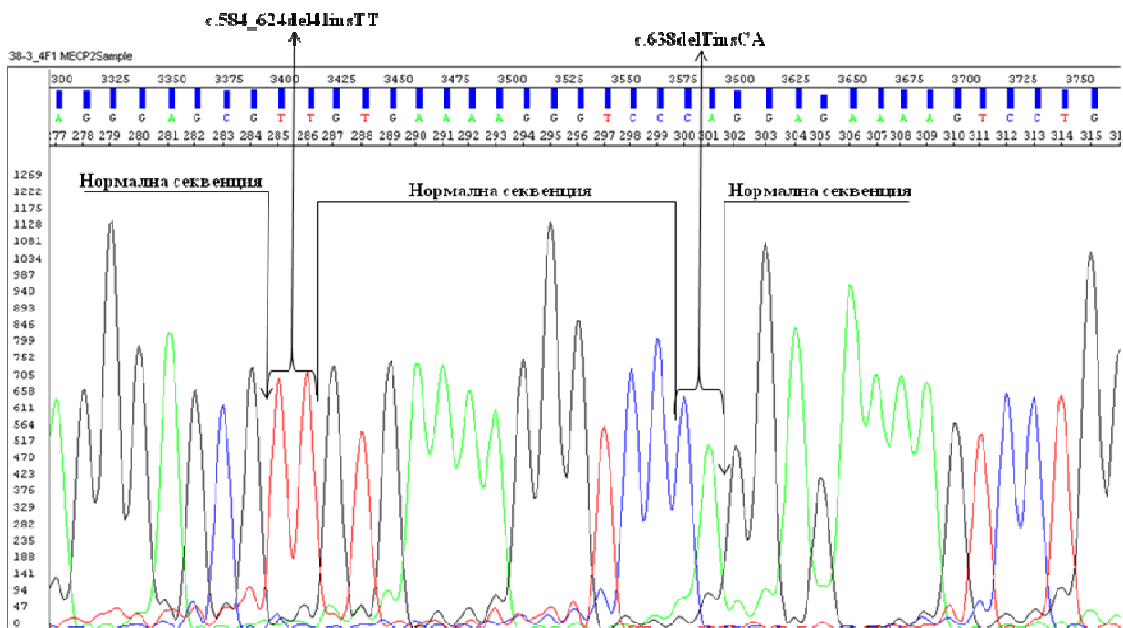
В допълнение при едно дете с диагноза RTT от румънски произход беше открито комплексно мутационно събитие – комбинация от две инсерции/делеции (indels) – с.[584_624del41insTT; 638delTinsCA] (Фигура 36). За потвърждаване на тази мутация и прецизно идентифициране на типа ѝ беше използван аналогичен на описания при горната делеция на 44 базови двойки подход: нов амплификационен продукт беше разделен на 3% агарозен гел и визуализираният по-лек патологичен фрагмент (Фигура 37) беше екстрахиран от гела, ре-амплифициран и секвениран (Фигура 38). По този начин беше доказана комплексна мутация – две независими делеционно/инсерционни мутационни събития (indels) в MECP2 гена (непубликувана до момента).



Фигура 36. Секвенционен анализ, показващ мутацията с.[584_624del41insTT; 638delTinsCA]

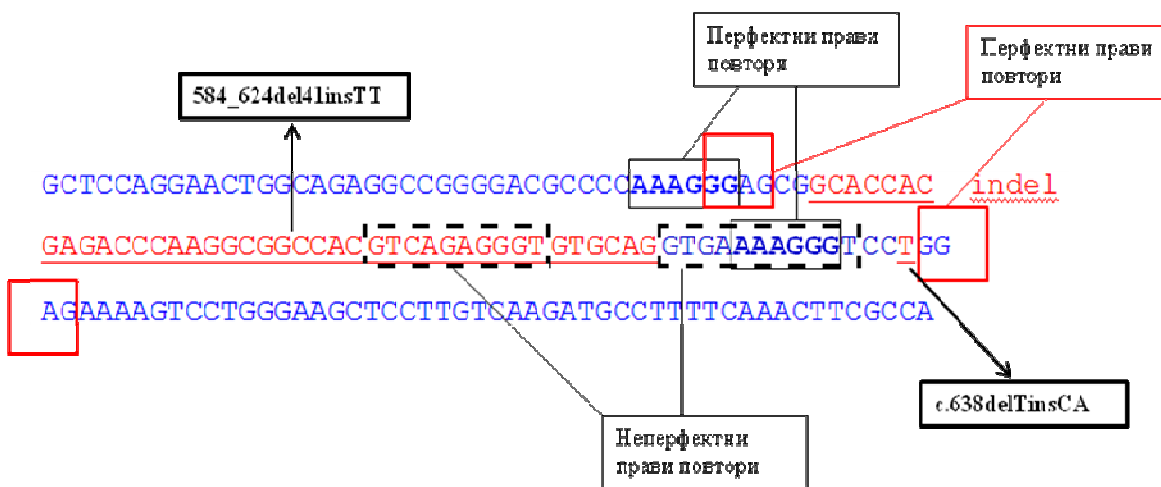


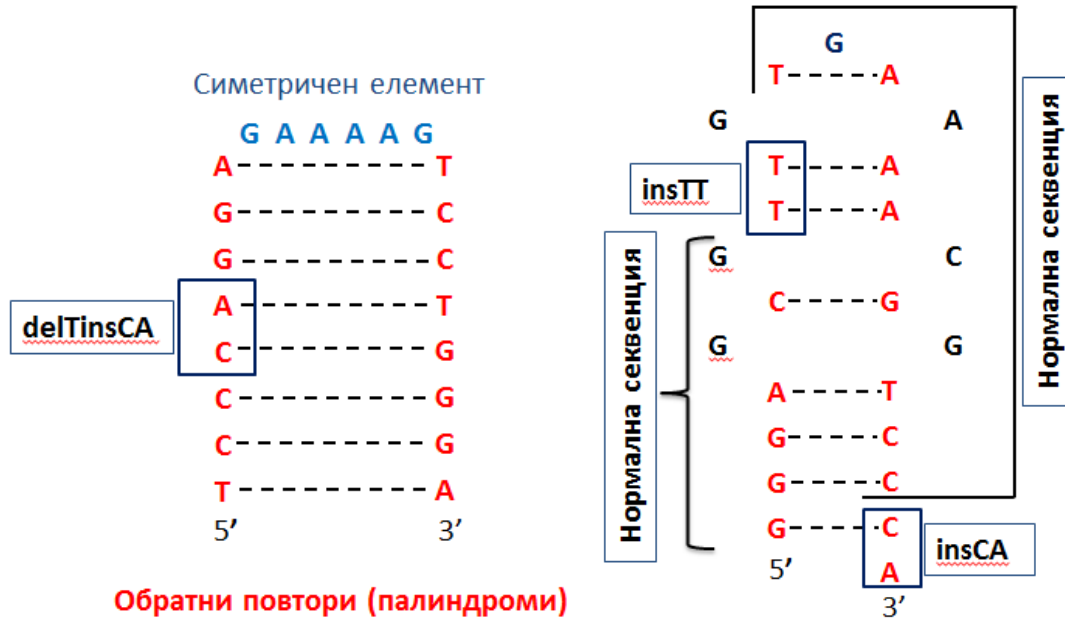
Фигура 37. Агарозна електрофореза, показваща нормален и мутантен фрагмент (посочени със стрелки)



Фигура 38. Секвенционен анализ след екстракция на по-лекия фрагмент от агарозен гел, rePCR и секвениране. Визуализира се комплексен мутационен профил върху един алел: c.[584_624del41insTT; 638delTinsCA]

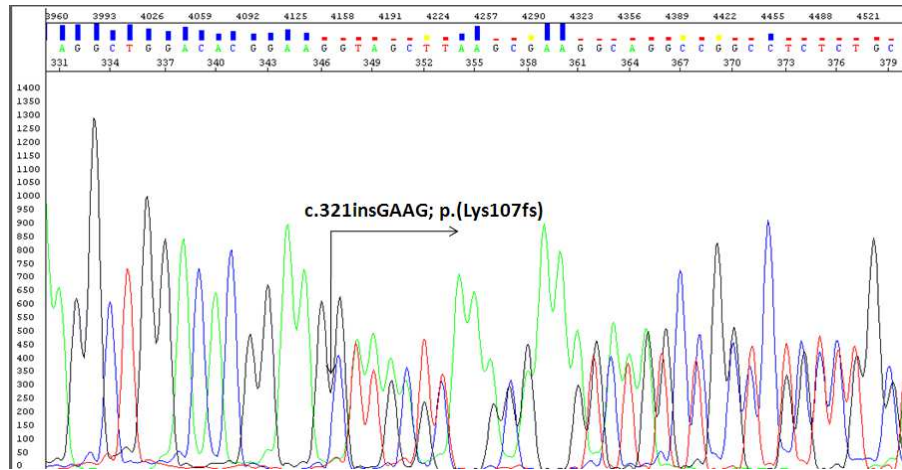
Двете мутационни събития в комплексния indel засягат един алел и най-вероятно са причинени от серия репликационни приплъзвания в права и обратна посока с участието на директни (прави) повтори [Chen et al., 2005]. Такива комплексни генни пренареждания, включващи множество делеционни и инсерционни събития са едни от най-сложните молекулни нарушения, които трудно могат да се обяснят с известните механизми на мутагенеза. Опит за изясняване механизма на възникване на открития в настоящето проучване комплексен indel е представен на Фигура 39. Задълбоченият анализ на околната секвенция показва наличието на перфектни и неперфектни директни (прави) повтори и перфектни и неперфектни палиндромни, заграждащи симетрични елементи, с чието участие се описва генерирането на комплексните мутационни преобразувания.





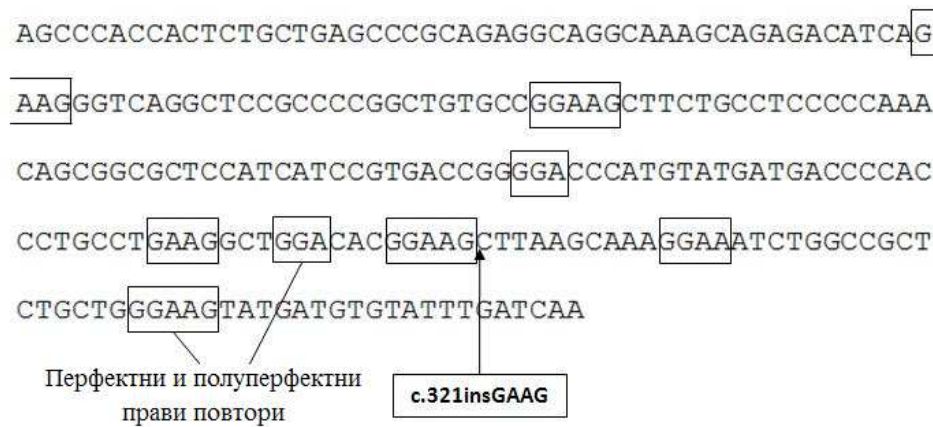
Фигура 39. Анализ на секвенцията в непосредствена близост до района с комплексна делеция/инсерция в MECP2 гена. Делетираните бази са представени в червено и са подчертани. Анализираните прави повтори са оградени. Обърнатите повтори (палиндромии), ангажиращи новоинсерираните нуклеотиди (оградени) са представени на два отделни панела.

Всички представени до тук мутации попадат в екзон 4 на MECP2 гена. Само при един пациент от изследваната група беше открита мутация в екзон 3 на MECP2 гена. Тази мутация представлява непубликувана до момента инсерция на 4 бд с.321insGAAG, p.(Lys107fs) (Фигура 40). Клиничната диагноза при този пациент първоначално е била PWS, поради затлъстяване (с ясно изразена фамилна predisпозиция).



Фигура 40. Секвенционен анализ, показващ мутацията с.321insGAAG; p.(Lys107fs)

Инсерираните 4 нуклеотида представляват интерес от генетична гледна точка, тъй като генерират симетричен елемент GAAGGAAG, чрез повторение на мотива GAAG (Фигура 41). При задълбоченият анализ на околната секвенция беше установено изобилие на (G)GA(AG) перфектни и полу-перфектни директни повтори, които биха могли да участват в неправилното сдвояване на веригите и приплъзване на полимеразата, завършващо с инсериране на GAAG мотив [Chen et al., 2005].

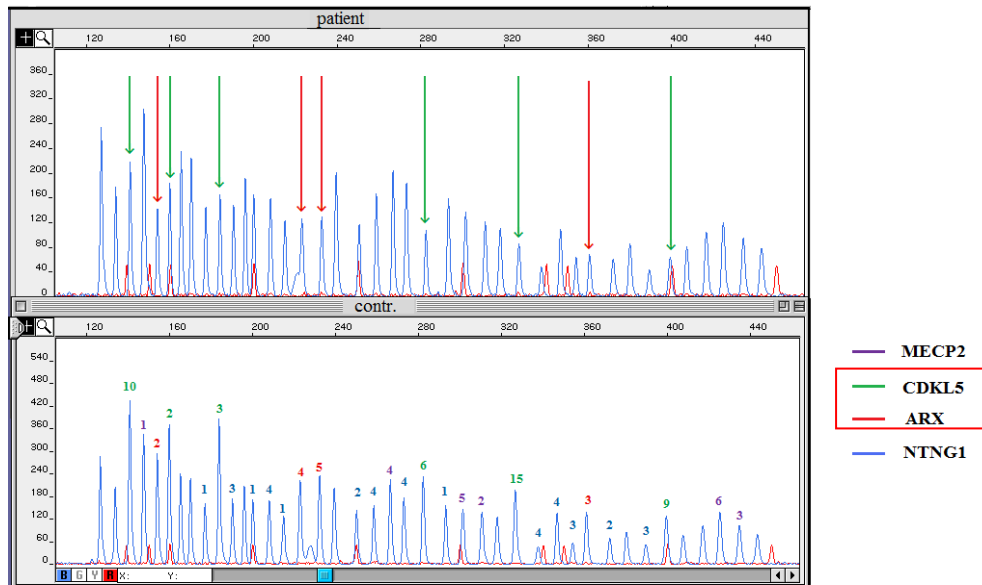


Фигура 41. Секвенция около мястото на инсерция на 4 бд в екзон 3.

Инсерираните нуклеотиди са заградени, както и перфектни и полуперфектни прави повтори (G)GA(AG) в региона.

Всички описани до тук мутации в MECP2 гена са свързани с тежка клинична симптоматика, бърза прогресия на заболяването и тежко засягане както на умственото така и на физическото развитие на засегнатите деца.

Пациентите, при които не бяха открити мутации в MECP2 гена чрез секвенционен анализ бяха подложени на MLPA анализ. Това изследване доведе до откриването на 3 големи делеции. Едната делеция е открита при пациент #6 (Приложение 2) и покрива гените CDKL5 и ARX, разположени на късото рамо на X хромозомата (Фигура 42).



Фигура 42. MLPA електрофоретичният профил при пациент с делеция на гените CDKL5 (зелени стрелки) и ARX (червени стрелки)

Резултатите от математическата обработка на делетираните фрагменти от CDKL5 и ARX гените при пациентката са представени в Таблица 17.

Получените съотношения за всички пикове, съответстващи на екзони на гените CDKL5 и ARX при пациента спрямо контролата показват стойности 0.6 и по-малки от 0.6, което съответства на делеция.

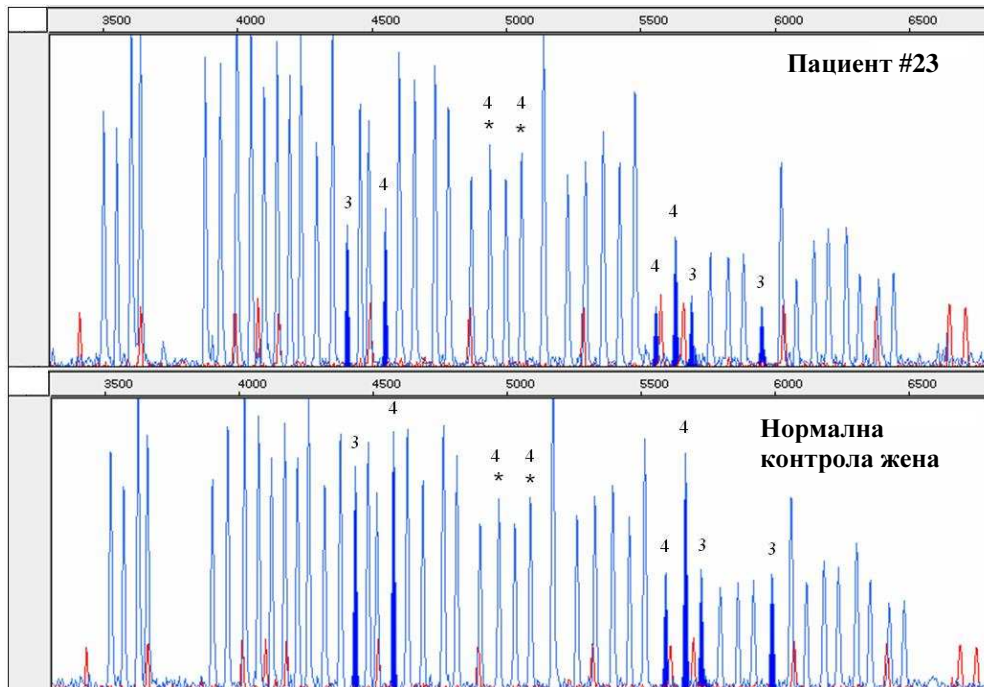
Таблица 17. Математическа обработка на данните от MLPA анализа

ген	екзон	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при пациент	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при контрола	Съотношение на площите на пиковите
CDKL5	10	0.86	1.83	0.47
	2	0.9	1.51	0.60
	3	1.12	1.88	0.60
	6	0.58	1.14	0.51
	15	0.93	1.58	0.59
	9	0.9	1.86	0.48
ARX	2	0.56	1.13	0.50
	4	0.86	1.45	0.59
	5	0.75	1.28	0.59
	3	1.08	1.85	0.58

Този резултат от молекулярно-генетичния анализ напълно потвърждава резултата от цитогенетичния анализ, показващ Хр делеция при тази пациентка. Детето е насочено за молекулярно-генетични изследвания на 2 годишна възраст като първоначалната диагноза е атипичен Rett синдром, но в последствие диагнозата беше променена на аутизъм.

Наличието само на едно копие от гените CDKL5 и ARX при пациентката с атипичен Rett провокира нашия интерес да секвенираме тези гени с цел търсене на мутации, които биха могли да са причина за наблюдаваната клинична симптоматика. Секвенционният анализ на тези гени не доведе до откриване на патологични изменения. В допълнение при тази пациентка бяха проведени и изследвания на гена FMR1, тъй като имаше съобщения за носителство на пълна CGG експанзия при пациентка с Хр делеция и клинична диагноза аутизъм [Vazna et al., 2008]. Резултатите при нашата пациентка показаха нормален генотип за FMR1 гена.

Други големи делеции бяха открити при пациенти #23 и #35 (Приложение 2) като делецията е една и съща при двамата пациента и покрива целия екзон 3 и част от екзон 4 на MECP2 гена (Фигура 43).



Фигура 43. MLPA електрофоретичният профил при пациент с делеция на екзон 3 и част от екзон 4. Делетираните екзони са маркирани в синьо, цифрата над пика показва номера на екзона, в който попада дадената сонда. Двата пика за екзон 4 маркирани със * не са делетирани; това са двата крайни фрагмента от екзон 4 и 3' нетранслируемия регион.

Резултатите от математическата обработка на делетираните фрагменти са представени в Таблица 18. Получените съотношения за всички делетирани пикове показват стойности <0.6.

Таблица 18. Математическа обработка на данните от MLPA анализа

Екзон на МЕСР2 гена	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при пациент	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при контрола	Съотношение на площите на пиковите
3	0.50	0.93	0.54
3	0.28	0.69	0.41
3	0.31	0.83	0.37
4	0.53	1.11	0.48
4	0.26	0.67	0.39
4	0.73	1.27	0.57
4*	1.12	1.08	1.04
4*	0.76	0.81	0.94

Интересно е да се спомене, че докато точковите мутации в екзон 4 на MECP2 гена водят до тежка клинична симптоматика с епилептични прояви, то делецията на екзон 3 и част от екзон 4 не е свързана с епилепсия и EEG профилът е нормален, но все пак трябва да се има предвид, че това са най-малките деца в групата и не се знае в бъдеще как ще прогресира клиничната симптоматика при тези пациенти.

Проверка наличието на откритите генни изменения при родителите на болните деца

Всички открити мутации в изследваната група пациенти бяха проверени при техните родители. Резултатите показаха, че всички мутации са нововъзникнали при болното дете и не са унаследени от родителите. Тези резултати потвърждават патологичния характер на откритите генни изменения.

Сравняване на получените данни със световната база данни

Откритите мутации в настоящето изследване са известни в световната литература, с изключение на комплексното мутационно събитие с.[584_624del41insTT; 638delTinsCA], доказано при румънски пациент и новооткритата инсерция на 4 бд с.321insGAAG, p.(Lys107fs) при български пациент. Повечето открити мутации при нашите пациенти в действителност са едни от най-честите генетични изменения в MECP2 гена, причиняващи класическа форма на Rett синдром. В световната литература се съобщава, че откритите мутации в 94% от пациентите с Rett синдром са точкови мутации, малки екзонни делеции и инсерции и само в около 6% се откриват големи и комплексни генни преобразувания [Philippe et al., 2006]. По отношение на типа мутации открити в нашата група пациенти, нашите резултати се различават от публикуваните, като при нас се установяват 75% точкови мутации, малки делеции и инсерции и 25% големи делеции и комплексни мутационни събития.

От молекулна гледна точка MECP2 гена се характеризира с две особености: 1) мутациите в този ген са de novo, причинени от независими мутационни събития, но са едни и същи делеции, nonsense и missense, засягащи едни и същи нуклеотиди

или региони, което показва наличието на мутационни „горещи точки” [Wan et al., 1999] и прякото участие на околната секвенция в мутационните събития; 2) честа находка в този ген са комплексни мутационни събития върху един алел, които биха могли да се обяснят с геномната архитектура на региона, в който попада MECР2 гена. Този хромозомен сегмент е богат на директни (прави) и обратни повтори в малък брой копия, чието присъствие може да генерира нестабилни ДНК структури, които биха могли да индуцират едноверижни нарушения и прекръстосвания в ДНК, колапс на репликационната вилка и приплъзване на полимеразата [Carvalho et al., 2009].

В настоящето изследване бяха открити мутации при 31.6% от пациентите с диагноза Rett синдром. Този резултат надвишава значително публикуваните данни, където генетично се изясняват едва 10-15% от случаите [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>].

Това показва, че нашите пациенти са много добре клинично изяснени и правилно подбрани.

С настоящето изследване бяха поставени първите молекулярно-генетични диагнози на различни форми X-свързано умствено изоставане, като бяха разработени за диагностично приложение, за първи път в България, както методи за търсене на големи делеции и дупликации, така и методи за търсене на точкови мутации.

Съществено беше увеличен процентът на генетично изяснените форми X-свързано умствено изоставане ($12/38=31.6\%$), което има отношение към планиране на здраво поколение в засегнатите семейства.

4.2.5. ДОПЪЛНИТЕЛНИ ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИТЕ С НЕИЗЯСНЕНИ МУТАЦИИ

Пациентите с неясни молекулни дефекти бяха секвенирани за мутации в CDKL5 гена, като такива не бяха намерени. Случаите, при които се обсъждаше като възможна диагноза PWS/AS не бяха потвърдени с проведените молекулярно-генетични изследвания за PWS/AS (виж по-надолу текста).

Проведените молекулярно-генетични изследвания показаха, че точкови мутации, делеции и инсерции в екзони 3 и 4 на MECP2 гена, както и големи делеции в MECP2 гена са причина за наблюдаваните отклонения в нервно психическото развитие при нашите пациенти с диагноза RTT. Нашите проучвания доведоха до откриване на мутации, в групата пациенти с клинична диагноза класически Rett синдром с изключение на два случая, където като алтернативни диагнози се обсъждаха PWS (пациент #37) и съответно AS и Pitt-Hopkins синдром (пациент #25).

4.3. PWS/AS

4.3.1. КЛИНИЧНИ СИМПТОМИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНАТА ГРУПА ПАЦИЕНТИ С ДИАГНОЗА PWS/AS СИНДРОМ

Изследваните пациенти с клинична диагноза PWS и AS са описани клинично в Приложение 3. Като съпътстваща диагноза при някои пациенти от мъжки пол беше обсъждан и синдром на чуплива X хромозома. При един пациент (#5 Приложение 3) поради тежката мускулна хипотония беше обсъждана като възможна диагноза спинална мускулна атрофия (SMA, OMIM#253300). Умственото изоставане в тази група пациенти е значително по-леко в сравнение с представените до сега групи, като преобладава лека и гранична степен на изоставане в умственото развитие (IQ=50-80). Наблюдават се основно забавяне в говорните умения и комуникативни проблеми. Моторно-двигателните функции при тези пациенти, обаче са съществено нарушени. При пациентите с диагноза PWS не са характерни епилептични пристъпи, с едно изключение (пациент #8 Приложение 3). При този пациент се съобщават гърчови пристъпи, провокирани според родителите от ваксинация. Почти при всички деца от тази група се наблюдава изразена подкожна мастна тъкан, мастна гърбица, мастна престилка, затлъстяване.

При пациентите с AS EEG данните показват средностепенни неспецифични изменения. И при трите описани от нас случая родителите съобщават гърчове по време на прекарани тежки инфекциозни заболявания.

Дисморфични лицеви характеристики се наблюдават при всички пациенти от тази група, като особено характерни са лицевите изменения при пациентите с AS – лица на “happy puppet”.

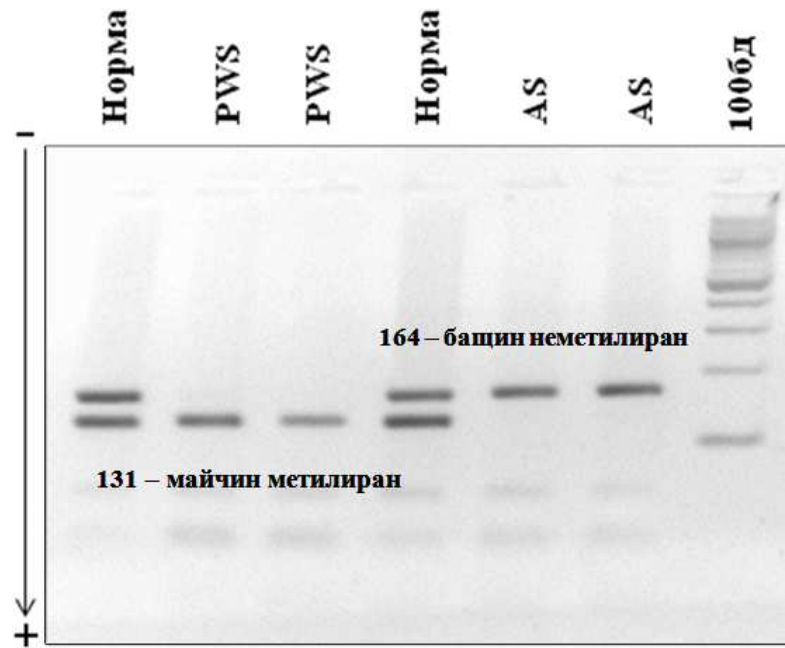
4.3.2. ЦИТОГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

Като първа стъпка в процеса на изясняване на диагнозата при пациенти с предполагаем PWS/AS синдром се извършва хромозомен анализ (кариотип), с помощта на който могат да бъдат отдиференцирани големи делеции и транслокации, засягащи региона 15q11-q12. В някои редки случаи е изпълнен и FISH анализ, с помощта на който могат да се детектират класическите делеции при PWS/AS синдром. Хромозомният анализ при всички изследвани пациенти от тази група показва нормален резултат. Проведеният FISH анализ при една пациентка с диагноза AS #16 от Приложение 3 показва патологичен резултат, делеция на локуса за синдром на Ангелман:

46,XX,ish del(15)(q11.2q11.2)(D15S10x1),15q11.2(D15Z1x2),15q22(PMLx2).

4.3.3. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

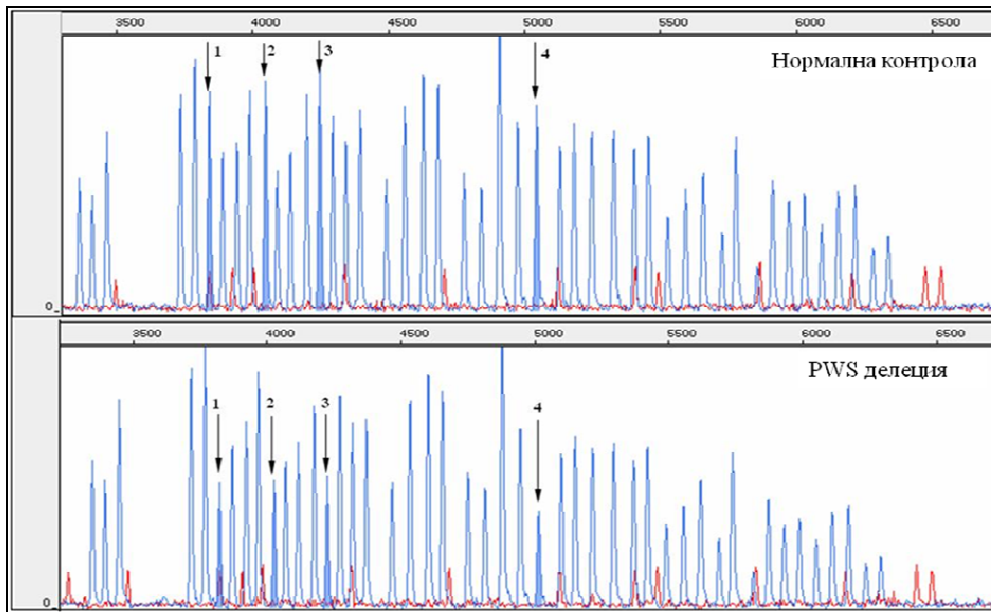
В настоящето проучване беше въведен за първи път в България, метод за специфичен по отношение на метилирането PCR, в резултат на който е възможно разграничаване на бащино неметилирано (функционално активно) копие от майчино метилирано (функционално неактивно) копие. За целта е необходимо ДНК да се третира предварително с натриев бисулфит за конвертиране на неметилирания цитозин до урацил, докато 5-метил цитозин остава непроменен. В резултат на този специфичен тест на анализ и последваща амплификация при нормални индивиди се получават два амплификационни продукта: 164 бд – бащин неметилиран фрагмент и 131 бд – майчин метилиран фрагмент (Фигура 44). Липсата на по-тежкия фрагмент при наличие на майчин метилиран определя диагноза PWS, докато липса на по-лекия фрагмент при наличие на бащин неметилиран отговаря на диагноза AS. По този начин във всяка реакция винаги е налице вътрешна контрола, което прави теста изключително надежден за диагностични цели.



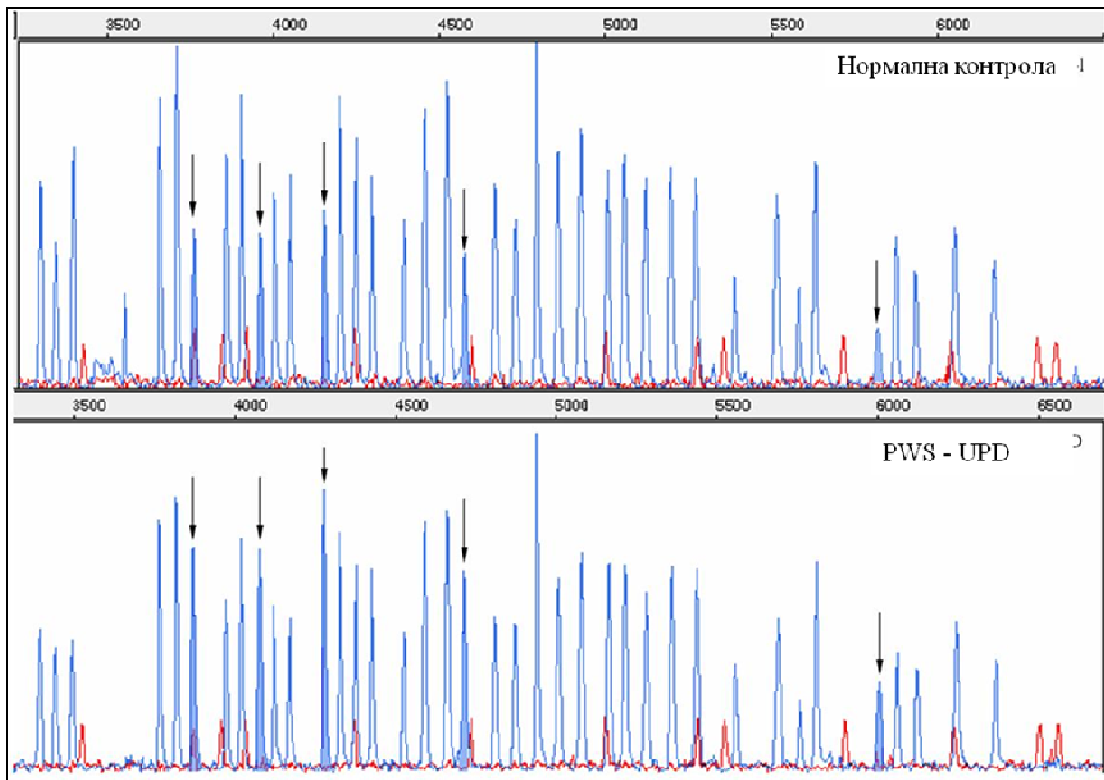
Фигура 44. Електрофоретичен профил на амплификационните продукти на майчин метилиран и бащин неметилиран фрагмент в района на 15q11-q12.

В случай че, изследваните пациенти с предполагаема клинична диагноза PWS/AS покажат наличието на два нормални фрагмента с теста за метилиране, то диагноза PWS/AS, дължаща се на дефект в 15q региона се изключва. Ако се потвърди един от двата патологични варианта – липса на майчин метилиран или бащин неметилиран фрагмент, се преминава към MLPA анализ в изпълнение на CNT – тест на брой копия и MT – тест за метилиране. Целта е да се изясни точно типът патологичен дефект – делеция (чрез тест на брой копия) или унипарентна дизомия - UPD (чрез теста за метилиране). Определянето на точния тип дефект има значение за прогнозиране до известна степен хода на заболяването. При пациентите с делеция, независимо дали диагнозата е PWS или AS, тестът за брой копия показва наполовина намален сигнал (Фигура 45), докато тестът за метилиране показва профил идентичен с този при нормална контрола (резултат не е показан). Нормалният профил се дължи на наличието на едно метилирано и едно неметилирано копие, в резултат на което неметилираното копие се срязва от HhaI

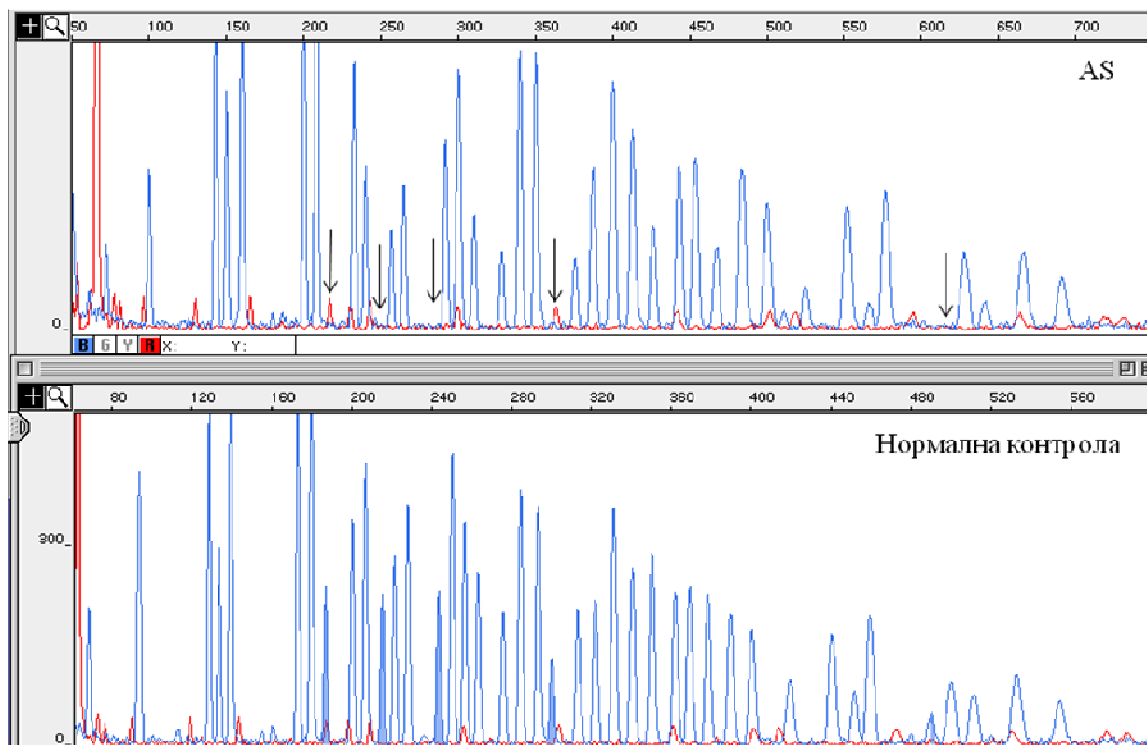
рестриктазата и остава наполовина намален сигнал, съответстващ само на метилираното копие. При PWS унипарентна дизомия, наличните две майчини метилирани копия се отразяват на теста за метилиране като двойно увеличен фрагмент спрямо контролата (несрязан наполовина от HhaI рестриктазата, Фигура 46). При AS теста за метилиране показва липсващи фрагменти за метилиране (посочени със стрелки на Фигура 47), поради наличието само на бащино(и) неметилирано(и) копие, които се срязват от HhaI рестриктазата.



Фигура 45. MLPA електрофоретичен профил - тест за брой копия.



Фигура 46. MLPA електрофоретичен профил - тест за метилиране при PWS.



Фигура 47. MLPA електрофоретичен профил - тест за метилиране при AS.

4.3.4. РЕЗУЛТАТИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНАТА ГРУПА ПАЦИЕНТИ С ДИАГНОЗА PWS/AS СИНДРОМ

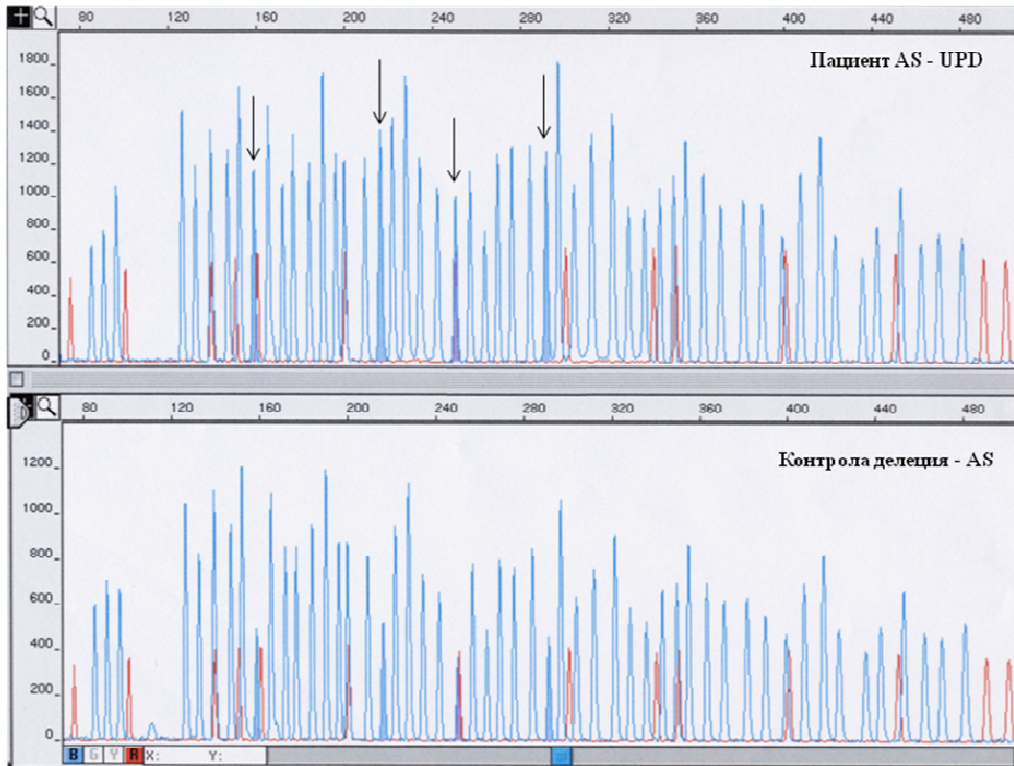
Получените резултати от PCR теста, специфичен по отношение на метилирането са представени на Фигура 42. От изследваните 16 пациента с диагноза PWS/AS, 9 бяха верифицирани на молекулно ниво – 7 PWS и 2 AS. Получените резултати показаха 56.25 % генетично верифицирани деагнози, което е доста висок процент, на фона на наблюдаваната комплексна клинична симптоматика.

Проведеният в последствие MLPA анализ при пациентите с установена диагноза PWS/AS показва, че 5 от пациентите с PWS се дължат на делеции в 15q региона и 2 от случаите са причинени от унипарентна дизомия (Фигура 45 и Фигура 46). Резултатите от математическата обработка на делетираните фрагменти са представени в Таблица 19. Получените съотношения за всички делетирани пикове показват стойности <0.6.

Таблица 19. Математическа обработка на данните от MLPA анализа

PWS/AS регион	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при пациент	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при контрола	Съотношение на площите на пиковите
SNRPN (CpG остров)	0.53	1.06	0.50
SNRPN екзон 1	0.60	1.21	0.50
SNRPN (CpG остров)	0.63	1.18	0.53
SNRPN екзон 3	0.55	1.23	0.45

При доказаните пациенти с диагноза AS два от случаите са резултат от делеции в 15q региона (Фигура 48), делетираните фрагменти са намалени на половина. Клиниката при един от пациентите с AS е резултат от UPD (Фигура 48), удвоените пикове са двойно по-високи, отколкото при делетираната контрола.



Фигура 48. MLPA електрофоретичен профил - тест за брой копия при AS.

Математическата обработка на резултатите при AS с делеция и UPD са представени в Таблица 20.

Таблица 20. Математическа обработка на данните от MLPA анализа.

PWS/AS регион	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при пациент	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при контрола (пациент с UPD, неразличим от контролата)*	Съотношение на площите на пиковите
UBE3A (15q12)	0.40	0.70	0.57
NDN (15q11.2)	0.57	1.04	0.55
SNRPN (15q12)	0.46	0.88	0.52
SNRPN (15q12)	0.46	0.82	0.56

* Пиковите при пациент с UPD са двойно по-високи (две копия) от тези при пациент с делеция и са неразличими от пиковите при нормална контрола.

Диагнозата при UPD се поставя на базата на липсващ майчин метилиран фрагмент в хода на PCR анализа и наличието на две копия от бащин неметилиран фрагмент, детектирани чрез теста за брой копия.

Проверка наличието на откритите генни изменения при родителите на болните деца

При нашите пациенти с генетично верифицирана диагноза PWS/AS не се налагат допълнителни генетични изследвания при техните родители, тъй като нито един от доказаните молекулни дефекти не може да е унаследен от незасегнатите родители. Тези мутации са нововъзникнали в засегнатите деца.

Сравняване на получените български данни със световната база данни

Получените резултати при нашата извадка пациенти с диагноза PWS/AS, макар и малка, слабо се различават от публикуваните честоти на делециите спрямо случаите, дължащи се на унипарентна дизомия: 67% делеции спрямо 33% унипарентна дизомия (Таблица 21) [<http://www.genetics.ie>].

Таблица 21. Честота на генетичния дефект при PWS (по литературни данни)

Генетичен дефект	Процентно съотношение
De novo делеция на 15q11-q13 върху бащината хромозома	75 - 80%
Майчина (UPD) на хромозома 15	20 - 25%

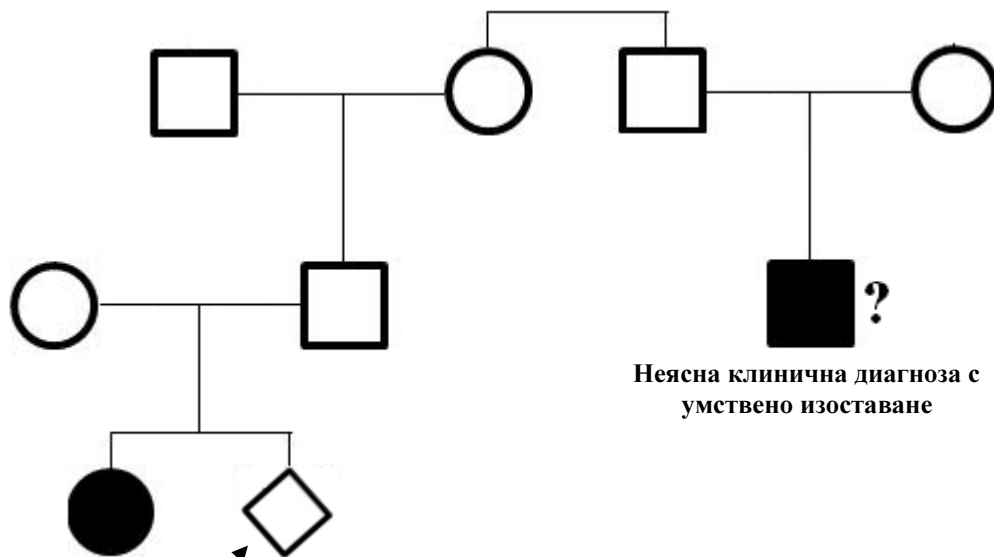
[National Center for Medical Genetics, Ireland - <http://www.genetics.ie>]

Важно е да се отбележи високият процент на молекулно верифицирани диагнози при изследваната група пациенти 56.25%, което показва добра клинична подготовка и прецизно клинично представяне на пациентите преди да се предприеме молекулярно-генетично изследване.

Пренатална диагностика при семейство с диагноза AS при предишно дете

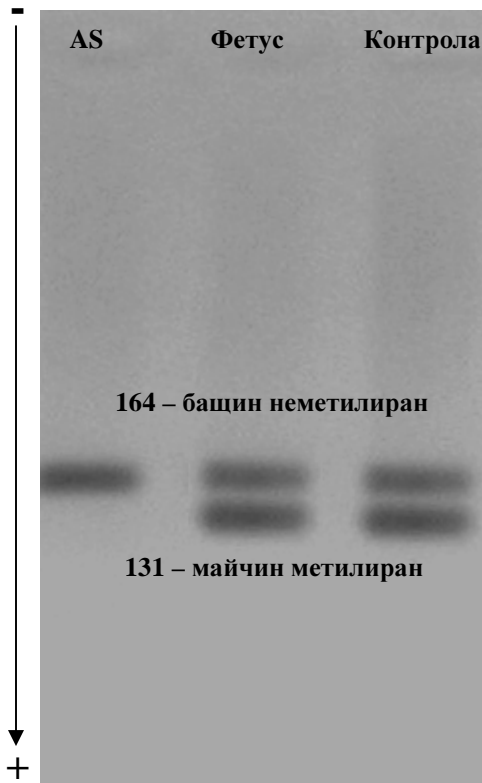
Въпреки че молекулните дефекти, които се откриват при пациенти с диагноза AS не са унаследени от родителите, се смята че когато се касае за грешки в метилирането и променена експресия на импринтовани гени е възможно тези грешки да са провокирани от генетичните характеристики на двамата родители. Публикувани са редица семейства с PWS, при които бащата е мозайка в спермалните клетки по отношение на делецията, открита в болното дете [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed]. По тази причина, на семейства, които вече имат болно дете с такава диагноза се препоръчва специализирано ехографско изследване с цел оценка на мускулния тонус на плода (при пациенти с PWS/AS се наблюдава вътреутробно забавяне на движенията на плода, поради мускулна хипотония) и пренатална диагностика.

За периода на настоящия дисертационен труд беше направена една пренатална диагностика на семейство, при което предишното дете е с генетично верифицирана диагноза AS. Родословното дърво е представено на Фигура 49.



Фигура 49. Родословно дърво на семейство с генетично верифицирана диагноза AS.

Пренаталната диагностика беше извършена върху хорионни вѐси (~10 mg), получени чрез хорионна биопсия в 12+5 гестационна седмица. Изолираната ДНК от хорионните вѐси беше подложена на бисулфитно конвертиране и последваща амплификация за оценка наличието на бащин неметиран и майчин метилиран фрагмент в рисковия регион на хромозома 15q – SNRPN гена. Заедно с фетуса беше изследвано повторно болното дете и нормална контрола. Получените резултати са представени на Фигура 50. При фетуса се установява наличието на бащин неметиран и майчин метилиран фрагмент, което съвпада с генетичния профил при нормалната контрола и се различава от наблюдавания профил при болното дете с диагноза AS, където липсва майчин метилиран фрагмент. Заключение е незасегнат фетус по отношение на диагноза AS.



Фигура 50. Пренатална диагностика при семейство с AS.

4.3.5. ДОПЪЛНИТЕЛНИ ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИТЕ С НЕИЗЯСНЕНИ МУТАЦИИ

Пациентите от мъжки пол с неясни молекулни дефекти (5 пациента) бяха изследвани допълнително за мутации в FMR1 гена, тъй като при тях като диференциална диагноза се обсъждаше и синдром на чуплива X хромозома. В допълнение при 3 от момчетата (#1, #4 и #6 от Приложение 3) беше изследван и ARX гена. Пациент #1 от Приложение 3 беше секвениран за мутации в MECP2 гена и беше изследван чрез MLPA анализ за микроделеционни синдроми, поради неясна клинична диагноза. Нито едно от проведените допълнителни изследвания не доведе до откриване на молекулярно-генетичен дефект и диагнозата при тези пациенти остава неизяснена.

Един от пациентите с предварителна клинична диагноза AS остана с неизяснен молекулен дефект. При този пациент са необходими допълнителни изследвания например в гените UBE3A и MECP2, които за момента са невъзможни поради липса на генетичен материал от този пациент

4.4. MDS

4.4.1. КЛИНИЧНИ СИМПТОМИ

Терминът микроделеционни синдроми (Microdeletion syndromes, MDS) обединява група заболявания с изоставане в развитието от неясен произход и/или умствено изоставане, дължащи се на делеции или дупликации на региони от различни човешки хромозоми. В тази група попадат 4 пациента от настоящето изследване, описани клинично в Приложение 4. Предварителната клинична диагноза при две от децата е била Williams-Beuren syndrome (WBS), едно с диагноза Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) и едно с диагноза DiGeorge syndrome. Основната клинична характеристика е умствено изоставане от по-слабо изразено до по-тежка симптоматика. Кардиологични проблеми се наблюдават при 4^{-те} деца. Дисморфичният фациес е силно изразен.

4.4.2. ЦИТОГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

Проведеният хромозомен анализ (кариотип) при четирите пациента показва нормален резултат. FISH тест не е правен при нито един от изследваните пациенти.

4.4.3. МОЛЕКУЛЯРНО ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

За откриване на големи делеции и дупликации, покриващи цели региони от човешките хромозоми ние избрахме MLPA анализ. Този метод има редица предимства – отличава се с висока степен на надежност в диагностиката на трудни за откриване делеции и дупликации, евтин е и е лесно изпълним (в рамките на два дни се получава резултат), използва се малко количество ДНК и е приложим за пренатална диагностика.

В използвания от нас кит са включени следните синдроми:

- 1p36 микроделеционен синдром
- 2p16 микроделеционен синдром
- 3p29 микроделеционен синдром
- 9q22.3 микроделеционен синдром
- 15q24 микроделеционен синдром
- 17q21 микроделеционен синдром
- 22q13 Phelan-Mcdermid
- Cri du Chat синдром, 5p15
- DiGeorge синдром, 22q11
- DiGeorge регион 2, 10p15
- Langer-Giedion синдром, 8q
- Miller-Dieker синдром, 17p
- NF1 микроделеционен синдром
- Prader-Willi/Angelman
- MECP2/Xq28 дупликация
- Rubinstein-Taybi синдром
- Smith-Magenis синдром
- Sotos синдром, 5q35.3
- Wagr синдром
- Williams синдром
- Wolf-Hirschhorn, 4p16.3

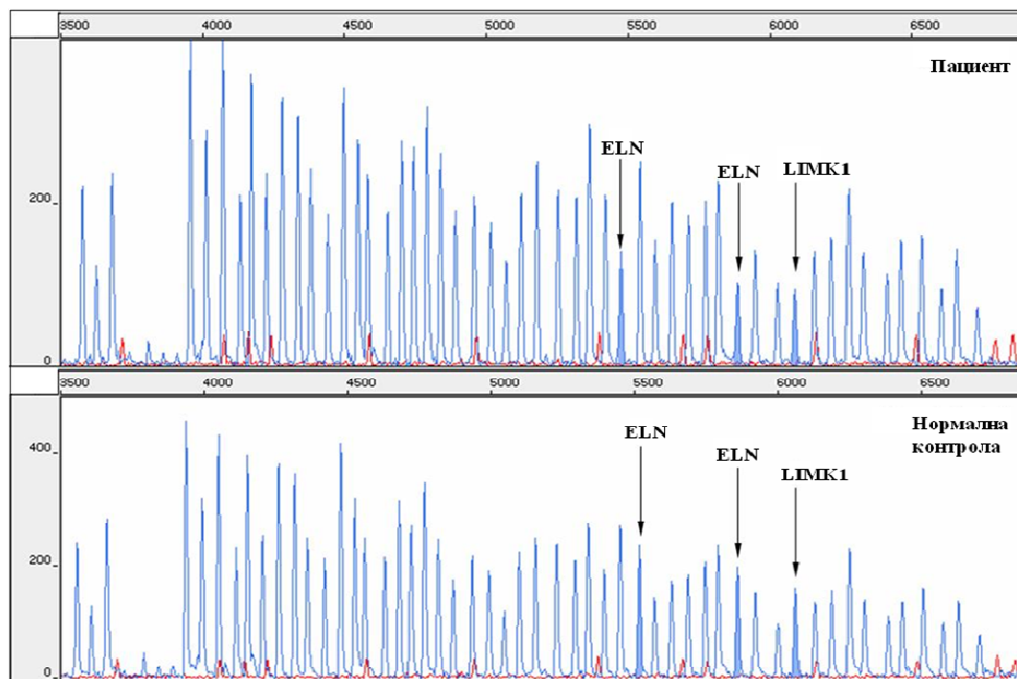
Интерпретацията на резултатите става след математическа обработка, при което се получава математически израз на делетиран или дуплициран генен фрагмент.

Важно условие за успешното изпълнение и интерпретиране на резултатите от MLPA анализа е качеството на геномната ДНК от пациента и контролите. За целта всички ДНК проби бяха подложени на ре-фенолизиране с цел пречистване преди изпълнението на анализа.

Друга важна особеност на този анализ е необходимостта от едновременно изследване на поне 3 нормални контроли успоредно с анализираната проба. Спрямо тези контролни проби се извършва интерпретацията и математическата обработка на резултатите.

4.4.4. РЕЗУЛТАТИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПАЦИЕНТИ С ПРЕДПОЛАГАЕМА ДИАГНОЗА МИКРОДЕЛЕЦИОННИ СИНДРОМИ

Използваният набор от сонди, включен в MLPA кита доведе до доказване на диагнозата WBS и при двете изследвани деца (Фигура 51).



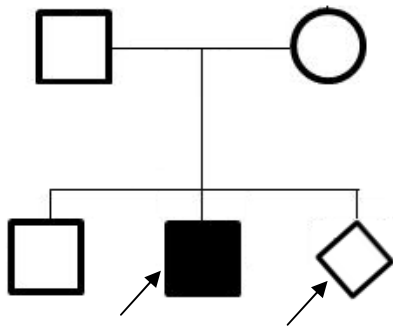
Фигура 51. MLPA електрофоретичен профил при пациент с WBS спрямо нормална контрола.

И в двата случая специфичните генетични локуси ELN и LIMK1, разположени в региона 7q11.23, показаха наполовина намален сигнал, съответстващ на делеция в хетерозиготно състояние. Резултатите от математическата обработка са представени в Таблица 22.

Таблица 22. Математическа обработка на данните от MLPA анализа

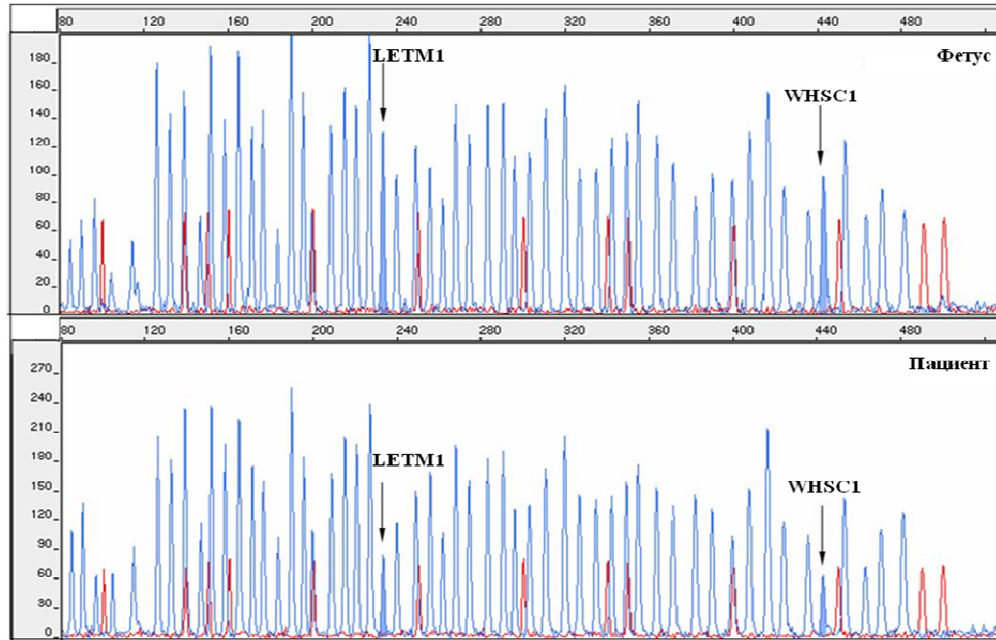
Регион	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при пациент	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при контрола	Съотношение на площите на пиковете
ELN – 7q11.23	0.62	1.30	0.48
ELN – 7q11.23	0.55	0.95	0.58
LIMK1 – 7q11.23	0.85	1.43	0.59

Пациентът с предполагаема клинична диагноза WHS също беше верифициран на молекулно ниво. Родословното дърво е представено на Фигура 52.



Фигура 52. Родословно дърво на семейство с генетично верифицирана диагноза WHS.

В конкретното семейството беше извършена и пренатална диагностика. ДНК от плода беше изолирана от амниотична течност, взета чрез амниоцентеза в 17 гестационна седмица. Получените резултати от MLPA анализа при болното дете и при фетуса са показани на Фигура 53.



Фигура 53. MLPA електрофоретичен профил при пациент с WHS спрямо нормална контрола.

При пациента се установи делеция на специфичните генетични локуси LETM1 и WHSC1, разположени в региона 4p16.3, докато фетусът не носи тази делеция. Математическата обработка на резултатите е представена в Таблица 23 (А и Б) На базата на тези изследвания е родено здраво дете във фамилия със засегнат индивид с WHS.

Таблица 23. Математическа обработка на данните от MLPA анализа

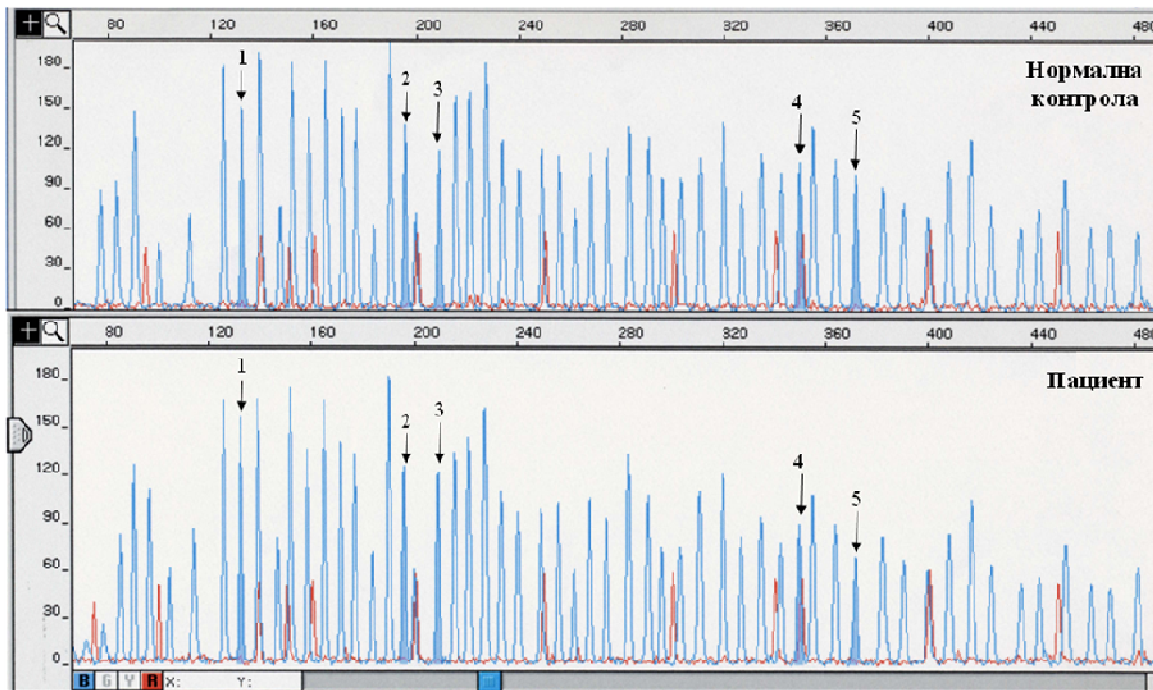
А – При пациента

Регион	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при пациент	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при контрола	Съотношение на площите на пиковите
LETM1 – 4p16.3	0.81	1.95	0.42
WHSC1 – 4p16.3	0.56	1.15	0.49

Б – При фетуса

Регион	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при фетуса	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при контрола	Съотношение на площите на пиковите
LETM1 – 4p16.3	2.40	1.95	1.23
WHSC1 – 4p16.3	1	1.15	0.87

Пациентът с предполагаема клинична диагноза DGS не беше потвърден с молекулярно генетичния тест (Фигура 54). Наличните 5 сонди, локализирани в двата рискови DGS региона - 22q11 (3 сонди – 2, 3 и 5 от Фигура 54) и 10p15 (2 сонди – 1 и 4 от Фигура 54) показаха нормален профил в сравнение със тези при здрава контрола.



Фигура 54. MLPA електрофоретичен профил при пациент с DGS спрямо нормална контрола.

Клиничната диагноза при този пациент подлежи на ревизиране.

5. ЗАКЛУЧЕНИЕ

Наличните до момента данни върху български пациенти с умствено изоставане бяха много оскъдни, като едно от добрите проучвания в тази област е от 1994 г, базирано на цитогенетичен анализ [Доц. Л. Ангелова, МБАЛ „Св. Марина” гр. Варна, 1994, дисертационен труд]. Молекулярно-генетични изследвания при пациенти с умствено изоставане не бяха налични у нас до преди четири години, когато започна разработването на настоящия дисертационен труд.

Проведените молекулярно-генетични тестове при изследваната група пациенти с умствено изоставане доведоха до изясняване на молекулния дефект при 28 от 90 пациента (31%).

В изследваната група момчета с диагноза FXS бяха открити 4 генетични дефекта в FMR1 гена: две пълни мутации и два случая - мозайки пълна мутация/нормален алел и пълна мутация/премутация/нормален алел. Процентът на генетично верифицирани случаи в тази група е 12,5%. Разработените протоколи в настоящия дисертационен труд са подходящи за скринингови цели при жени с цел изясняване на носителския им статус и оценка на риска да имат болно дете с FXS. Проведените MLPA тестове за делеции по дължината на FMR1 гена не доведоха до откриване на такъв тип мутации. MLPA анализът за мутации в FMR2 гена (синдром на чуплива X хромозома тип E), който се изследва успоредно с FMR1 гена, също не доведе до откриване на молекулни дефекти. Останалите 28 пациента от тази група с неизвестен молекулен дефект бяха подложени на допълнителни молекулярни изследвания, базирайки се на наблюдаваната клинична симптоматика при всеки един от тях, но мутации не бяха открити. Въпреки проведеният широк спектър молекулярно-генетични изследвания в групата момчета с умствено изоставане и предполагаема клинична диагноза FXS, голям процент от тях останаха с неизвестен генетичен дефект. Причина за това, от една страна, е смесеният характер на изследваната група, в която попадат и пациенти с чисто аутистично поведение и дискретни синдромни изменения, при които целта на теста е по-скоро изключване на диагноза FXS. От друга страна, става ясно че умственото

изоставане при момчета е полигенно детерминирано, като мутации в X-свързани и автозомни гени са отговорни за сходна клинична симптоматика.

Проведените молекулярно-генетични изследвания при групата момичета с диагноза RTT синдром доведоха до откриване на 12 мутации в MECP2 гена (12/38 =31.6%). Откритите мутации са 5 типа. Освен точкови мутации в нашата група открихме и една вътреекзонна делеция, едно комплексно мутационно събитие indel, една инсерция на 4 бд и две еднакви големи делеции, покриващи един екзон и част от следващия. Откритото комплексно мутационно събитие представлява двоен indel и е непубликувана мутация до момента, описана е за първи път в настоящето проучване. Непубликувана е и инсерцията на 4 бд, която попада в екзон 3 на MECP2 гена. Беше проведен задълбочен анализ на околната секвенция по отношение на повторените мотиви в близост до намерените мутационни събития с оглед изясняване на механизмите на мутагенеза. По отношение на типа мутации открити в нашата група пациенти, нашите резултати се различават от публикуваните, като при нас се установяват 75% точкови мутации, малки делеции и инсерции и 25% големи делеции и комплексни мутационни събития.

От молекулярна гледна точка MECP2 гена се характеризира с две особености: 1) мутациите в този ген са de novo, причинени от независими мутационни събития, но са едни и същи, което показва наличието на мутационни „горещи точки” и предполага прякото участие на околната секвенция в мутационните събития; 2) честа находка в този ген са комплексни мутационни събития върху един алел, които биха могли да се обяснят с геномната архитектура на региона, в който попада MECP2 гена.

В допълнение при някои пациенти с подходяща клиника беше изследван и CDKL5 генът, но мутации не бяха открити.

Молекулярно-генетичните изследвания при пациентите с диагноза PWS/AS доказаха диагнозата при 7 PWS пациента (54%) и при 2 AS пациента (67%). Откритите патологични изменения в 15q11-q13 региона бяха разпределени както следва: 5 делеции PWS, 2 унипарентна дизомия PWS, 1 делеция AS и 1 унипарентна дизомия AS.

Проведеният MLPA анализ при пациенти с клинична диагноза, отговаряща на WBS (двама пациента), WHS (един пациент) и DGS (един пациент) доведе до изясняване на молекулния дефект и на тази база верифициране на клиничната диагноза при първите три случая (75%). Диагноза DGS не беше потвърдена на молекулно ниво. Трябва да се отбележи, че високият процент доказани микроделеционни синдроми може да се дължи на изключително малката група изследвани пациенти.

В заключение на проведените молекулно-генетични изследвания може да се каже, че процентът генетично верифицирани диагнози в групата на пациентите с RTT синдром (31.6%), PWS/AS (56.25%) и MDS (75%) е сравнително висок. Публикуваните данни за генетично верифицирани пациенти с X-свързано умствено изоставане са около 15% [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]. Високият процент у нас говори за много добро клинично разпознаване и охарактеризиране на тези заболявания, благодарение на което става възможно прецизирано назначаване на генетичните тестове.

От друга страна, процентът на генетично доказани FXS случаи (12,5%) е доста нисък. По литературни данни FXS е втората по честота причина за умствено изоставане след синдром на Даун (OMIM # 190685) [Rousseau et al., 1995]. Възможно е причина за този нисък процент да е подборът на момчетата в изследваната група, където са включени и някои чисто аутистични случаи без допълнителни синдромни изменения.

Нашата група пациенти с все още неизвестен молекулен дефект представлява обект за нови проучвания за търсене на нови гени и локуси, мутации в които водят до умствено изоставане. Тези пре-скринирани пациенти, при които са изключени най-честите възможни генетични причини, са подходящи и за научни проучвания с микрочипов анализ. Имайки предвид високата себестойност на тестовете от нова генерация, анализиращи целия геном, от изключителна важност е пациентите да бъдат предварително скринирани за най-честите известни генетични причини и да се изключат тези, които се дължат на дефекти във вече известни гени.

6. ИЗВОДИ

1. Разработените методики за молекулярно-генетична диагностика на FXS позволяват разграничаване на нормални от премутантни и експандирани до пълна мутация алели; дават възможност за оценка на метилиране и позволяват детекция на мозайки; могат да се прилагат за скринингови цели.
2. В изследваната група момчета с диагноза FXS, нисък процент (12.5%) бяха охарактеризирани на молекулно ниво, което се различава от публикуваните данни. Вероятна причина е смесеният характер на изследваната група, както и възможното наличие на мутации в други гени, отговорни за сходна клинична симптоматика.
3. Разработеният системен подход за анализ на пациенти с RTT позволи охарактеризирането на около 1/3 от случаите, което е по-висок процент в сравнение с публикуваните данни.
4. Мутациите, открити в нашата група пациенти с RTT се различават от публикуваните данни по високия процент (25%) големи делеции и комплексни мутационни събития и 75% точкови мутации, малки делеции и инсерции. Две от откритите мутации са докладвани за първи път от нашия екип.
5. От молекулна гледна точка MECР2 генът се характеризира с *de novo* мутации, причинени от независими мутационни събития, попадащи в „горещи точки” и комплексни мутационни събития върху един алел, което предполага прякото участие на околната секвенция и геномната архитектура на региона в мутагенезата.
6. Разработените методики за молекулярно-генетична диагностика на PWS/AS позволяват оценка на метилиране и промяна в брой копия, което

дава възможност за охарактеризиране на делеции и унипарентна дизомия, основните дефекти причиняващи тези синдроми.

7. Разработените методики за молекулярно-генетична диагностика на микроделеционни синдроми дават възможност за прецизно охарактеризиране на диагнозата и пренатална диагностика в засегнатите семейства.
8. В изследваната група пациенти с умствено изоставане 31% бяха охарактеризирани на молекулно ниво, като този процент надвишава съществено публикуваните данни.

7. БИБЛИОГРАФИЯ

7.1. БЪЛГАРСКА ЛИТЕРАТУРА:

1. Ангелова Л. (1994) Генетико-диагностично проучване при лица с умствено изоставане в училищна възраст, дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”.

7.2. ЧУЖДОЕЗИЧНА ЛИТЕРАТУРА:

1. Adler DA, Quaderi NA, Brown SD, Chapman VM, Moore J, Tate P. (1995) Distechе CM. The X-linked methylated DNA binding protein, Mecp2, is subject to X inactivation in the mouse. *Mamm Genome* 6(8):491-2.
2. Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran ChO, Francke U, Zoghbi HY. (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nature Genet* 23:185-188.
3. Amir RE, Van den Veyver IB, Schultz R, Malicki DM, Tran CQ, Dahle EJ, Philippi A, Timar L, Percy AK, Motil KJ, Lichtarge O, Smith EO, Glaze DG, Zoghbi HY. (2000) Influence of mutation type and X chromosome inactivation on Rett syndrome phenotypes. *Ann Neurol* 47:670–679.
4. Anvret M, Nordenskjold M, Stolpe L, Johansson L, Brondum-Nielsen K. (1991) Molecular analysis of 4p deletion associated with Wolf-Hirschhorn syndrome moving the 'critical segment' towards the telomere. *Hum Genet* 86: 481-483.
5. Archer HL, Evans J, Edwards S, Colley J, Newbury-Ecob R, O'Callaghan F, Huyton M,

- O'Regan M, Tolmie J, Sampson J, Clarke A, Osborne J. (2006a) CDKL5 mutations cause infantile spasms, early onset seizures, and severe mental retardation in female patients. *J Med Genet* 43:729-734.
6. Archer HL, Evans JC, Millar DS, Thompson PW, Kerr AM, Leonard H, Christodoulou J, Ravine D, Lazarou L, Grove L, Verity C, Whatley SD, Pilz DT, Sampson JR, Clarke AJ. (2006b) NTNG1 mutations are a rare cause of Rett syndrome. *Am J Med Genet A* 140(7):691-4.
 7. Ariani F, Hayek G, Rondinella D, Artuso R, Mencarelli MA, Spanhol-Rosseto A, Pollazzon M, Buoni S, Spiga O, Ricciardi S, Meloni I, Longo I, Mari F, Broccoli V, Zappella M, Renieri A. (2008) FOXP1 is responsible for the congenital variant of Rett syndrome. *Am J Hum Genet* 83:89-93.
 8. Arocena GD, de Diego Y, Oostra BA, Willemsen R, Mirta Rodriguez M. (2000) A fragile X case with an amplification/deletion mosaic pattern. *Hum Genet* 106(3):366-9.
 9. Ballestar E, Yusufzai TM, Wolffe AP. (2000) Effects of Rett syndrome mutations of the methyl-CpG binding domain of the transcriptional repressor MeCP2 on selectivity for association with methylated DNA. *Biochemistry* 39(24):7100-6.
 10. Barnicoat A J, Wang Q, Turk J, Green E, Mathew CG, Flynn G, Buckle V, Hirst M, Davies K, Bobrow M. (1997) Clinical, cytogenetic, and molecular analysis of three families with FRAXE. *J Med Genet* 34:13-17.
 11. Battaglia A, Carey JC, Cederholm P, Viskochil DH, Brothman AR, Galasso C. (1999) Natural history of Wolf-Hirschhorn syndrome: experience with 15 cases. *Pediatrics* 103: 830-6.
 12. Baumer A, Dutly F, Balmer D, Riegel M, Tükel T, Krajewska-Walasek M, Schinzel AA. (1998) High level of unequal meiotic crossovers at the origin of the 22q11.2 and 7q11.23 deletions. *Hum Molec Genet* 7:887-894.

13. Brown WT, Gross AC, Chan CB, Jenkins EC. (1985) Genetic linkage heterogeneity in the fragile X syndrome. *Hum Genet* 71:11-18.
14. Camerino G, Mattei MG, Mattei JF, Jaye M, Mandel JL. (1983) Close linkage of fragile X-linked mental retardation syndrome to haemophilia B and transmission through a normal male. *Nature* 306: 701-707.
15. Carvalho CM, Zhang F, Liu P, Patel A, Sahoo T, Bacino CA, Shaw C, Peacock S, Pursley A, Tavyev YJ, Ramocki MB, Nawara M, Obersztyn E, Vianna-Morgante AM, Stankiewicz P, Zoghbi HY, Cheung SW, Lupski JR. (2009) Complex rearrangements in patients with duplications of MECP2 can occur by fork stalling and template switching. *Hum Mol Genet* 18(12):2188-203.
16. Chaste P, Nygren G, Anckarsäter H, Råstam M, Coleman M, Leboyer M, Gillberg Ch, Betancur C. (2007) Mutation screening of the ARX gene in patients with autism. *Am J Med Genet Part B* 144B:228-230.
17. Chen J-M, Chuzhanova N, Stenson PD, Ferec C, Cooper DN. (2005) Complex gene rearrangements caused by serial replication spippage. *Hum Mut* 26(2):125-134.
18. Chitayat D, Davis EB, McGillivray BC, Hayden MR, Hall JG. (1989) Perinatal and first year follow-up of patients with Prader-Willi syndrome: normal size of hands and feet. *Clin Genet.* 35(3):161-6.
19. Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 22:2990-2997.
20. Coy JF, Sedlacek Z, Bächner D, Delius H, Poustka A. (1999) A complex pattern of evolutionary conservation and alternative polyadenylation within the long 3'-untranslated region of the methyl-CpG-binding protein 2 gene (MeCP2) suggests a regulatory role in gene expression. *Hum Mol Genet* 8(7):1253-62.

21. Crawford DC, Meadows KL, Newman JL, Taft LF, Scott E, Leslie M, Shubek L, Holmgreen P, Yeargin-Allsopp M, Boyle C, Sherman SL. (2002) Prevalence of the fragile X syndrome in African-Americans. *Am. J. Med. Genet.* 110: 226-233.
22. Curfs LMG, Verhulst FC, Fryns JP. (1991) Behavioral and emotional problems in youngsters with Prader-Willi syndrome. *Genetic Counseling* 2:33-41.
23. Davids JR, Hagerman RJ, Eilert RE. (1990) Orthopaedic aspects of fragile-X syndrome. *J. Bone Joint Surg.* 72A: 889-896.
24. De Bona C, Zappella M, Hayek G, Meloni I, Vitelli F, Bruttini M, Cusano R, Loffredo P, Longo I, Renieri A. (2000) Preserved speech variant is allelic of classic Rett syndrome. *Eur J Hum Genet* 8(5):325-30.
25. D'Esposito M, Ciccodicola A, Gianfrancesco F, Esposito T, Flagiello L, Mazzarella R, Schlessinger D, D'Urso M. (1996) A synaptobrevin-like gene in the Xq28 pseudoautosomal region undergoes X inactivation. *Nat Genet* 13(2):227-9.
26. Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP, Mandel JL. (1993) The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nat Genet* 4(4):335-40.
27. Dikow N, Nygren AO, Schouten JP, Hartmann C, Krämer N, Janssen B, Zschocke J. (2007) Quantification of the methylation status of the PWS/AS imprinted region: comparison of two approaches based on bisulfite sequencing and methylation-sensitive MLPA. *Mol Cell Probes* 21(3):208-15.
28. Dittrich B, Robinson WP, Knoblauch H, Buiting K, Schmidt K, Gillissen-Kaesbach G, Horsthemke B. (1992) Molecular diagnosis of the Prader-Willi and Angelman syndromes by detection of parent-of-origin specific DNA methylation in 15q11-13. *Hum Genet* 90(3):313-5.
29. Duba HC, Doll A, Neyer M, Erdel M, Mann C, Hammerer I, Utermann G, Grzeschik KH. (2002) The elastin gene is disrupted in a family with a balanced translocation

- t(7;16)(q11.23;q13) associated with a variable expression of the Williams-Beuren syndrome. *Eur J Hum Genet* 10(6):351-61.
30. Estabrooks LL, Lamb AN, Kirkman HN, Callanan NP, Rao KW. (1992) A molecular deletion of distal chromosome 4p in two families with a satellited chromosome 4 lacking the Wolf-Hirschhorn syndrome phenotype. *Am J Hum Genet* 51:971-978.
 31. Ewart AK, Morris CA, Atkinson D, Jin W, Sternes K, Spallone P, Stock AD, Leppert M, Keating MT. (1993) Hemizyosity at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nature Genet* 5:11-16.
 32. Fang P, Lev-Lehman E, Tsai T-F, Matsuura T, Benton CS, Sutcliffe JS, Christian SL, Kubota T, Halley DJ, Meijers-Heijboer H, Langlois S, Graham JMJr, Beuten J, Willems PJ, Ledbetter DH, Beaudet AL. (1999) The spectrum of mutations in UBE3A causing Angelman syndrome. *Hum Mol Genet* 8: 129-135.
 33. Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe J, Richards S, Verkerk A, Holden J, Fenwick R, Warren S, Oostra B, Nelson D, Caskey C. (1991) Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 67:1047-1058.
 34. Gandelman K-Y, Gibson L, Meyn MS, Yang-Feng TL. (1992) Molecular definition of the smallest region of deletion overlap in the Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Hum Genet* 51: 571-578.
 35. Ghosh RP, Horowitz-Scherer RA, Nikitina T, Gierasch LM, Woodcock CL. (2008) Rett-syndrome causing mutations in human MeCP2 result in diverse structural changes that impact folding and DNA interactions. *J Biol Chem* 283(29):20523-20534.
 36. Glenn CC, Saitoh S, Jong MT, Filbrandt MM, Surti U, Driscoll DJ, Nicholls RD. (1996) Gene structure, DNA methylation, and imprinted expression of the human SNRPN gene. *Am J Hum Genet.* 58(2):335-46.

37. Goodship J, Curtis A, Cross I, Brown J, Emslie J, Wolstenholme J, Bhattacharya S, Burn J. (1992) A submicroscopic translocation, t(4;10), responsible for recurrent Wolf-Hirschhorn syndrome identified by allele loss and fluorescent in situ hybridisation. *J Med Genet* 29:451-454.
38. Gosch A, Stading G, Pankau R. (1994) Linguistic abilities in children with Williams-Beuren syndrome. *Am J Med Genet* 52:291-296.
39. Grasso, M, Faravelli, F, Lo Nigro, C, et al.(1999) Mosaicism for the full mutation and a microdeletion involving the CGG repeat and flanking sequences in the FMR1 gene in eight fragile X patients. *Am J Med Genet* 85: 311–16.
40. Grimm T, Wesselhoeft H. (1980) The genetic aspects of Williams-Beuren syndrome and the isolated form of the supravalvular aortic stenosis. Investigation of 128 families (author's transl). *Z Kardiol* 69(3):168-72.
41. Guideri F, Acampa M, Hayek G, Zappella M, Di Perri T. (1999) Reduced heart rate variability in patients affected with Rett syndrome. A possible explanation for sudden death. *Neuropediatrics* 30(3):146-8.
42. Hagberg B and Hadberg G. (1997) Rett syndrome: epidemiology and geographical variability. *Eur Child Adolesc Psych* 1:5-7.
43. Hagerman RJ, Van Housen K, Smith AC, McGavran L. (1984a) Consideration of connective tissue dysfunction in the fragile X syndrome. *American Journal of Medical Genetics* 17(1): 111-21.
44. Hagerman R J and Synhorst D P. (1984b) Mitral valve prolapse and aortic dilatation in the fragile X syndrome. *American Journal of Medical Genetics* 17(1): 123-31.
45. Hannaleena Kokkonen. (2003) Genetic changes of chromosome region 15q11-q13 in Prader-Willi and Angelman syndromes in Finland. Oulu University Library, p.34.
46. Hardwick SA, Reuter K, Williamson SL, Vasudevan V, Donald J, Slater K, Bennetts

- B, Bebbington A, Leonard H, Williams SR, Smith RL, Cloosterman D, Christodoulou J. (2007) Delineation of large deletions of the MECP2 gene in Rett syndrome patients, including a familial case with a male proband. *Eur J Hum Genet* 15:1218-1229.
47. Henke W, Herdel K, Jung K, Schnorr D and Loening SA. (1997) Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 25(19):3957-3958.
48. Hirschhorn K, Cooper HL, Firschein IL. (1965) Deletion of short arms of chromosome 4-5 in a child with defects of midline fusion. *Humangenetik* 1(5):479-82.
49. Hung CC, Chen CP, Lin SP, Chien SC, Lee CN, Cheng WF, Hsieh WS, Liu MS, Su YN, Lin WL. (2006) Quantitative assay of deletion or duplication genotype by capillary electrophoresis system: Application in Prader-Willi syndrome and Duchenne muscular dystrophy. *Clin Chem* 52(12):2203-10.
50. Jacky PB, Dill FJ. (1980) Expression in fibroblast culture of the satellited-X chromosome associated with familial sex-linked mental retardation. *Hum Genet* 53(2):267-9.
51. Jin P, Warren ST. (2000) Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 9:901-908.
52. Kato M, Das S, Petras K, Kitamura K, Morohashi K, Abuelo DN, Barr M, Bonneau D, Brady AF, Carpenter NJ, Ciperio KL, Frisone F, Fukuda T, Guerrini R, Iida E, Itoh M, Lewanda AF, Nanba Y, Oka A, Proud VK, Saugier-veber P, Schelley SL, Selicorni A, Shaner R, Silengo M, Stewart F, Sugiyama N, Toyama J, Toutain A, Vargas AL, Yanazawa M, Zackai EH, Dobyns WB. (2004) Mutations of ARX are associated with striking pleiotropy and consistent genotype-phenotype correlation. *Hum Mut* 23:147-159.
53. Kerr AM, Armstrong DD, Prescott RJ, Doyle D, Kearney DL. (1997) Rett syndrome: analysis of deaths in the British survey. *Europ Child Adolesc Psychiat* 6 (suppl. 1): 71-74.
54. Khaniani MS, Kalitsis P, Burgess T, Slater HR. (2008) An improved diagnostic PCR assay for identification of cryptic heterozygosity for CGG triplet repeat alleles in the Fragile X gene (FMR1). *Mol Cytogenet* 8:1-6.

55. Kirkilionis AJ, Gregory CA, Hamerton JL. (1991) Long-range restriction mapping and linkage analysis of the Prader-Willi chromosome region (PWCR). *Genomics* 9: 524-535.
56. Kishino T, Lalonde M, Wagstaff J. (1997) UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nature Genet* 15:70-73. Note: Erratum: *Nature Genet.* 15: 411.
57. Kleefstra T, Yntema HG, Oudakker AR, Romein T, Sistermans E, Nillessen W, van Bokhoven H, de Vries BBA, Hamel BCJ. (2002) De novo MECP2 frameshift mutations in a boy with moderate mental retardation, obesity and gynaecomastia. *Clin Genet* 61:359-362.
58. Koekkoek SK, Yamaguchi K, Milojkovic BA, Dortland BR, Ruigrok TJ, Maex R, De Graaf W, Smit AE, VanderWerf F, Bakker CE, Willemsen R, Ikeda T, Kakizawa S, Onodera K, Nelson DL, Mientjes E, Joosten M, De Schutter E, Oostra BA, Ito M, De Zeeuw CI. (2005) Deletion of FMR1 in Purkinje cells enhances parallel fiber LTD, enlarges spines, and attenuates cerebellar eyelid conditioning in Fragile X syndrome. *Neuron* 47(3):339-52.
59. Kosaki K, McGinniss MJ, Veraksa AN, McGinnis WJ, Jones KL. (1997) Prader-Willi and Angelman syndromes: diagnosis with a bisulfate-treated methylation-specific PCR method. *Am J Med Genet* 73:308-313.
60. Kubota T, Das S, Christian SL, Baylin SB, Herman JG, Ledbetter DH. (1997) Methylation-specific PCR simplifies imprinting analysis. *Nat Genet* 16(1):16-7.
61. Kunkel TA, Alexander PS. (1986) The base substitution fidelity of eucaryotic DNA polymerases. Mismatching frequencies, site preferences, insertion preferences, and base substitution by dislocation. *J Biol Chem* 261(1):160-6.
62. Lee SSJ, Wan M, Francke U. (2001) Spectrum of MECP2 mutations in Rett syndrome. *Brain and Development* 23:S138-S143.
63. Lehrke R. (1972) A theory of X-linkage of major intellectual traits. *Am J Ment Defic* 76:611-619.

64. Lehrke R. (1974) X-linked mental retardation and verbal disability. *Birth Defects Orig Artic Ser* 10:1-100.
65. Leonard H & Wen X. (2002) The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 8:117-134.
66. Lin SY, Lin CH, Su YN. (2008) Laboratory progress in molecular diagnosis of Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome – a new strategy by methylation-specific competitive multiplex PCR. *Eur J Hum Genet* 16; Suppl. 2:133 (P02.056). ESHG Conference, May 31 - June 3, 2008, Barcelona, Spain.
67. Lubs HA. (1969) A marker X chromosome. *Am J Hum Genet* 21(3):231-44.
68. Lugtenberg D, Kleefstra T, Oudakker AR, Nillesen WM, Yntema HG, Tzschach A, Raynaud M, Rating D, Journel H, Chelly J, Goizet C, Lacombe D, Pedespan JM, Echenne B, Tariverdian G, O'Rourke D, King MD, Green A, van Kogelenberg M, Van Esch H, Gecz J, Hamel BC, van Bokhoven H, de Brouwer AP. (2009) Structural variation in Xq28: MECP2 duplications in 1% of patients with unexplained XLMR and in 2% of male patients with severe encephalopathy. *Eur J Hum Genet* 17(4):444-53. Erratum in: *Eur J Hum Genet*. (2009) 17(5):697.
69. Lurie I W, Lazjuk GI, Ussova YI, Presman EB, Gurevich DB. (1980) The Wolf-Hirschhorn syndrome. *J Genetics Clin Genet*. 17: 375-384.
70. Maas NMC, Van Buggenhout G, Hannes F, Thienpont B, Sanlaville D, Kok K, Midro A, Andrieux J, Anderlid B-M, Schoumans J, Hordijk R, Devriendt K, Fryns J-P, Vermeesch JR. (2008) Genotype-phenotype correlation in 21 patients with Wolf-Hirschhorn syndrome using high resolution array comparative genome hybridisation (CGH). *J Med Genet* 45:71-80.
71. Malzac P, Webber H, Moncla A, Graham JMJr, Kukulich M, Williams C, Pagon RA, Ramsdell LA, Kishino T, Wagstaff J. (1998) Mutation analysis of UBE3A in Angelman syndrome patients. *Am J Hum Genet* 62: 1353-1360.

72. Mandel J-L and Chelly J. (2004) Monogenic X-linked mental retardation: Is it as frequent as currently estimated? The paradox of the ARX (Aristaless X) mutations. *Eur J Hum Genet* 12:689-693.
73. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. (2002) Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal.* 16(1):47-51. Review.
74. Martínez F, León AM, Monfort S, Oltra S, Roselló M, Orellana C. (2006) Robust, easy, and dose-sensitive methylation test for the diagnosis of Prader-Willi and Angelman syndromes. *Genet Test* 10(3):174-7.
75. Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P, Galjaard R-J, Jiang Y, Benton CS, Rommens JM, Beaudet AL. (1997) De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. *Nature Genet* 15:74-77.
76. Mattei JF, Mattei MG, Aumeras C, Auger M, Giraud F. (1981) X-linked mental retardation with the fragile X: a study of 15 families. *Hum Genet* 59:281-289.
77. Meehan RR, Lewis JD, Bird A. (1992) Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. *Nucleic Acids Res* 20:5085-5092.
78. Metcalfe K, Simeonov E, Beckett W, Donnai D, Tassabehji M. (2005) Autosomal dominant inheritance of Williams-Beuren syndrome in a father and son with haploinsufficiency for FKBP6. *Clin Dysmorph* 14: 61-65.
79. Milà M, Castellví-Bel S, Sánchez A, Lázaro C, Villa M, Estivill X. (1996) Mosaicism for the fragile X syndrome full mutation and deletions within the CGG repeat of the FMR1 gene. *J Med Genet* 33: 338–40.
80. Mingroni-Netto RC, Haddad LA, Vianna-Morgante AM. (1996) The number of CGG repeats of the FMR1 locus in premutated and fully mutated heterozygotes and their offspring: implications for the origin of mosaicism. *Am J Med Genet* 64: 270–3.

81. Mutirangura A, Greenberg F, Butler MG, Malcolm S, Nicholls RD, Chakravarti A, Ledbetter DH. (1993) Multiplex PCR of three dinucleotide repeats in the Prader-Willi/Angelman critical region (15q11-q13): molecular diagnosis and mechanism of uniparental disomy. *Hum Molec Genet* 2: 143-151.
82. Nakao M, Sutcliffe JS, Durtschi B, Mutirangura A, Ledbetter DH, Beaudet AL.(1994) Imprinting analysis of three genes in the Prader-Willi/Angelman region: SNRPN, E6-associated protein, and PAR-2 (D15S225E). *Hum Mol Genet* 3(2):309-15.
83. Nicholls RD, Knoll JHM, Butler MG, Korum S, Shook D, Glatt K, Lalande M. (1989) Uniparental disomy for chromosome 15 in the Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* 45 (suppl.):A209-only.
84. Nickerson E, Greenberg F, Keating MT, McCaskill C, Shaffer LG. (1995) Deletions of the elastin gene at 7q11.23 occur in approximately 90% of patients with Williams syndrome. *Am J Hum Genet* 56(5):1156-61.
85. Nieminen P, Kotilainen J, Aalto Y, Knuutila S, Pirinen S, Thesleff I. (2003) MSX1 gene is deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome patients with oligodontia. *J Dent Res* 82(12):1013-7.
86. Nolin SL, Glicksman A, Houck GE Jr, Brown WT, Dobkin CS. (1994) Mosaicism in fragile X affected males. *Am J Med Genet* 51: 509–12.
87. Nolin SL, Brown WT, Glicksman A, Houck GE Jr, Gargano AD, Sullivan A, Biancalana V, Brøndum-Nielsen K, Hjalgrim H, Holinski-Feder E, Kooy F, Longshore J, Macpherson J, Mandel JL, Matthijs G, Rousseau F, Steinbach P, Väisänen ML, von Koskull H, Sherman SL. (2003) Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am J Hum Genet* 72(2):454-64.
88. Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, Schouten JP, Errami A. (2005) Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of

- CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res* 33(14):e128.
89. Nygren A, Lens S, Carvalho R. (2008) Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification enables a rapid and reliable distinction between male FMR1 premutation and full mutation alleles. *J Mol Diagn* 10: 496–501.
90. Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boue J, Bertheas M, Mandel J. (1991) Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 252(5009):1097-1102.
91. O'Connell CD, Atha DH, Jakupciak JP, Amos JA, Richie K. (2002) Standardization of PCR amplification for fragile X trinucleotide repeat measurements. *Clin Genet* 61(1):13-20.
92. Opitz JM, Westphal JM, Daniel A. (1984) Discovery of a connective tissue dysplasia in the Martin-Bell syndrome. *Am J Med Genet* 17(1):101-9.
93. Osborne LR, Martindale D, Scherer SW, Shi XM, Huizenga J, Heng HH, Costa T, Pober B, Lew L, Brinkman J, Rommens J, Koop B, Tsui LC. (1996) Identification of genes from a 500-kb region at 7q11.23 that is commonly deleted in Williams syndrome patients. *Genomics* 36(2):328-36.
94. Osborne LR. (1999) Williams-Beuren syndrome: unraveling the mysteries of a microdeletion disorder. *Molec Genet Metab* 67: 1-10.
95. Ozcelik T, Leff S, Robinson W, Donlon T, Lalande M, Sanjines E, Schinzel A, Francke U. (1992) Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N (SNRPN), an expressed gene in the Prader-Willi syndrome critical region. *Nature Genet* 2: 265-269.
96. Pankau R, Partsch CJ, Gosch A, Oppermann HC, Wessel A. (1992) Statural growth in Williams-Beuren syndrome. *Eur J Pediatr* 151(10):751-5.

97. Penrose LS (1938) A clinical and genetic study of 1280 cases of mental defect. HMSO, London, Vol.229
98. Peoples R, Perez-Jurado L, Wang YK, Kaplan P, Francke U. (1996) The gene for replication factor C subunit 2 (RFC2) is within the 7q11.23 Williams syndrome deletion. *Am J Hum Genet* 58(6):1370-3.
99. Petersen MB, Brøndum-Nielsen K, Hansen LK, Wulff K. (1995) Clinical, cytogenetic, and molecular diagnosis of Angelman syndrome: estimated prevalence rate in a Danish county; the disorder predominantly affects Anglo-Saxons. *Am J Med Genet* 60 (3): 261–2.
100. Philippe C, Villard L, De Roux N, Raynaud M, Bonnefond JP, Pasquier L, Lesca G, Mancini J, Jonveaux P, Moncla A, Chelly J, Bienvenu T. (2006) Spectrum and distribution of MECP2 mutations in 424 Rett syndrome patients: a molecular update. *Eur J Med Genet* 49(1):9-18.
101. Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, Nelson DL. (1991) Absence of expression of the FMR1 gene in fragile X syndrome. *Cell* 66:817-822.
102. Pober BR, Lacro RV, Rice C, Mandell V, Teele RL. (1993) Renal findings in 40 individuals with Williams syndrome. *Am J Med Genet* 46(3):271-4.
103. Polder JJ, Meerding WJ, Koopmanshap MA, Bonneux L, van der Maas PJ. (1998) The cost of sickness in the Netherlands in 1994. *Ned Tijdschr Geneesk*, 142:1607-1611.
104. Prader A, Labhart A, Willi H. (1956) Ein Syndrom von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie nach Myatonieartigem Zustand im Neugeborenenalter. *Schweiz Med Wschr* 86: 1260-1261.
105. Priest JH, Thuline HC, Laveck GD, Jarvis DB. (1961) An approach to genetic factors in mental retardation. Studies of families containing at least two siblings admitted to a state institution for the retarded. *Am J Ment Defic*, 66:42-50.

106. Procter M, Chou LS, Tang W, Jama M, Mao R. (2006) Molecular diagnosis of Prader-Willi and Angelman syndromes by methylation-specific melting analysis and methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin Chem* 52(7):1276-83.
107. Pyeritz RE, Stamberg J, Thomas GH, Bell BB, Zahka KG, Bernhardt BA. (1982) The marker Xq28 syndrome ("Fragile-X SYndrome") in a retarded man with mitral valve prolapse. *Johns Hopkins Med J* 151(5):231-7.
108. Rapakko K, Kokkonen H, Leisti J. (2004) UBE3A gene mutations in Finnish Angelman syndrome patients detected by conformation sensitive gel electrophoresis. *Am J Med Genet* 126A: 248-252.
109. Ravn K, Nielsen JB, Skjeldal OH, Kerr A, Hulten M, Schwartz M. (2005) Large genomic rearrangements in MECP2. *Hum Mut* 25(3):324-329.
110. Reiss AL, Freund L, Tseng JE, Joshi PK. (1991a) Neuroanatomy in fragile X females: the posterior fossa. *Am J Hum Genet* 49(2):279-88.
111. Reiss AL, Aylward E, Freund LS, Joshi PK, Bryan RN. (1991b) Neuroanatomy of fragile X syndrome: the posterior fossa. *Ann Neurol* 29(1):26-32.
112. Rett A. (1966) On a unusual brain atrophy syndrome in hyperammonemia in childhood. *Wien Med Wochenschr* 116(37):723-6.
113. Rett A. (1977) Social and preventive measures for mentally handicapped children (author's transl). *Ther Umsch* 34(1):49-51.
114. Richards RI, Holman K, Kozman H, Kremer E, Lynch M, Pritchard M, Yu S, Mulley J, Sutherland GR. (1991) Fragile X syndrome: genetic localisation by linkage mapping of two microsatellite repeats FRAXAC1 and FRAXAC2 which immediately flank the fragile site. *J Med Genet* 28: 818-823.

115. Ropers H-H. (2006) X-linked mental retardation: many genes for a complex disorder. *Current Opinion in Genetics & Development* 16:260-269.
116. Rosales-Reynoso MA, Vilatela EA, Ojeda RM, Arce-Rivas A, Sandoval L, Troyo-Sanromán R, Barros-Núñez P. (2007) PCR approach for detection of Fragile X syndrome and Huntington disease based on modified DNA: limits and utility. *Genet Test* 11(2):153-9.
117. Rousseau F, Rouillard P, Morel M-L, Khandjian EW, Morgan K. (1995) Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMRI gene – and implications for the population genetics of the Fragile X syndrome. *Am J Hum Genet* 57:1006-1018.
118. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(12): 5463–7.
119. Scala E, Ariani F, Mari F, Caselli R, Pescucci C, Longo I, Meloni I, Giachino D, Bruttini M, Hayek G, Zappella M, Renieri A. (2005) CDKL5/STK9 is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms. *J Med Genet* 42:103-107.
120. Schmucker B, Seidel J. (1999) Mosaicism for a full mutation and a normal size allele in two fragile X males. *Am J Med Genet* 84:221–5.
121. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acid Res* 30:57.
122. Sherman SL, Marsteller F, Abramowitz AJ, Scott E, Leslie M, Bregman J. (2002) Cognitive and behavioral performance among FMR1 high-repeat allele carriers surveyed from special education classes. *Am J Med Genet* 114(4):458-65.
123. Steffenburg S, Gillberg CL, Steffenburg U, Kyllerman M. (1996) Autism in Angelman syndrome: a population-based study. *Pediatr Neurol* 14 (2): 131–6. doi:10.1016/0887-8994(96)00011-2.

124. Stephenson JBP. (1980) Prader-Willi syndrome: neonatal presentation and later development. *Dev. Med. Child Neurol.* 22: 792-795.
125. Stromme P, Bjornstad PG, Ramstad K. (2002a) Prevalence estimation of Williams syndrome. *J Child Neurol.* 17: 269-271.
126. Stromme P, Mangelsdorf ME, Shaw MA, Lower KM, Lewis SME, Bruyere H, Lütcherath V, Gedeon AK, Wallace RH, Scheffer IE, Turner G, Partington M, Frints SGM, Fryns J-P, Sutherland GR, Mulley JC, Gécz J. (2002b) Mutations in the human ortholog of *Aristaless* cause X-linked mental retardation and epilepsy. *Nature Genet* 30:441-445.
127. Sullivan AK, Crawford DC, Scott EH, Leslie ML, Sherman SL. (2002) Paternally transmitted FMR1 alleles are less stable than maternally transmitted alleles in the common and intermediate size range. *Am J Hum Genet* 70(6):1532-44.
128. Szabo P, Purrello M, Rocchi M, Archidiacono N, Alhadeff B, Filippi G, Toniolo D, Martini G, Luzzatto L, Siniscalco M. (1984) Cytological mapping of the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene distal to the fragile-X site suggests a high rate of meiotic recombination across this site. *Proc Nat Acad Sci* 81: 7855-7859.
129. Tabolacci E, Pomponi MG, Pietrobono R, Chiurazzi P, Neri G. (2007) A unique case of reversion to normal size of a maternal premutation FMR1 allele in a normal boy. *Eur J Hum Genet* 16: 209–14.
130. Tassabehji M, Metcalfe K, Fergusson WD, Carette MJ, Dore JK, Donnai D, Read AP, Pröschel C, Gutowski NJ, Mao X, Sheer D. (1996) LIM-kinase deleted in Williams syndrome. *Nat Genet* 13(3):272-3.
131. Tassabehji M, Hammond P, Karmiloff-Smith A, Thompson P, Thorgeirsson SS, Durkin ME, Popescu NC, Hutton T, Metcalfe K, Rucka A, Stewart H, Read AP, Maconochie M, Donnai D. (2005) GTF2IRD1 in craniofacial development of humans and mice. *Science* 310: 1184-1187.

132. Tassone F, Pan R, Amiri K, Taylor AK, Hagerman PJ. (2008) A rapid polymerase chain reaction-based screening method for identification of all expanded alleles of the fragile X (FMR1) gene in newborn and high-risk populations. *J Mol Diagn* 10:43-49.
133. Thies U, Back E, Wolff G, Schroeder-Kurth T, Hager H-D, Schroder K. (1992) Clinical, cytogenetic and molecular investigations in three patients with Wolf-Hirschhorn syndrome. *Clin Genet* 42: 201-205.
134. Todorov T, Todorova A, Kirov A, Dimitrov B, Carvalho R, Nygren AOH, Boneva I, Mitev V. (2009) Fragile X mosaic male full mutation/normal allele detected by PCR/MS-MLPA. *BMJ Case Reports* [doi:10.1136/bcr.06.2008.0139].
135. Todorov T, Todorova A, Avdjieva D, Dimova P, Angelova L, Tincheva R, Mitev V. (2010a) Molecular basis of mental retardation in a sample from Bulgaria. *Genet Counseling* 21(2): 257-262.
136. Todorov T, Todorova A, Avdjieva D, Dimova P, Angelova L, Tincheva R, Mitev V. (2010b) Clinical and molecular data on mental retardation in Bulgaria. *Balkan J Med Genet* 13(2): 11-25.
137. Todorov T, Todorova A, Georgieva B, Mitev V. (2010c) A unified rapid PCR method for detection of normal and expanded trinucleotide alleles of CAG repeats in Huntington chorea and CGG repeats in Fragile X syndrome. *Mol Biotechnol* 45:150-154.
138. Todorova A, Todorov T, Georgieva B, Lukova M, Guerguelcheva V, Kremensky I, Mitev V. (2008) MLPA analysis/complete sequencing of the DMD gene in a group of Bulgarian Duchenne/Becker muscular dystrophy patients. *Neuromusc Disorders* 18(8):667-670.
139. Turner G, Webb T, Wake S, Robinson H. (1996) The prevalence of the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 64:196-197.
140. Urban Z, Helms C, Fekete G, Csiszar K, Bonnet D, Munnich A, Donis-Keller H, Boyd C D. (1996) 7q11.23 deletions in Williams syndrome arise as a consequence of unequal meiotic crossover. *Am. J. Hum. Genet.* 59: 958-962, 1996.

141. Valente KD, Koiffmann CP., Fridman C, Varella M, Kok F, Andrade JQ, Grossmann RM, Marques-Dias M J. (2006) Epilepsy in patients with Angelman syndrome caused by deletion of the chromosome 15q11-13. *Arch Neurol* 63:122-128.
142. Van Buggenhout G, Melotte C, Dutta B, Froyen G, Van Hummelen P, Marynen P, Matthijs G, de Ravel T, Devriendt K, Fryns JP, Vermeesch JR. (2004) Mild Wolf-Hirschhorn syndrome: micro-array CGH analysis of atypical 4p16.3 deletions enables refinement of the genotype-phenotype map. *J Med Genet* 41(9):691-8.
143. van den Ouweland AM, de Vries BB, Bakker PL, Deelen WH, de Graaff E, van Hemel JO, Oostra BA, Niermeijer MF, Halley DJ. (1994) DNA diagnosis of the fragile X syndrome in a series of 236 mentally retarded subjects and evidence for a reversal mutation in the FMR1 gene. *Am J Med Genet* 51: 482–5.
144. Vazna A, Musova Z, Novotna D, Vlckova M, Havlovicova M, Sedlacek Z. (2008) Fragile X syndrome and Xp deletion in a girl with autism and mental retardation, *Eur J Hum Genet* 16 (suppl 2) P01.089, ESHG Conference, May 31 - June 3, 2008, Barcelona, Spain.
145. Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP. (1991) Identification of a gene (FMR1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 65:905-914.
146. Vilain A, Apiou F, Vogt N, Dutrillaux B, Malfoy B. (1996) Assignment of the gene for methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2) to human chromosome band Xq28 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 74(4):293-4.
147. Wan M, Lee SSJ, Zhang X, Houwink-Manville I, Song HR, Amir RE, Budden S, Naidu S, Pereira JL, Lo IF, Zoghbi HY, Schanen NC, Francke U. (1999) Rett syndrome and beyond: recurrent spontaneous and familial MECP2 mutations at CpG hotspots. *Am J Hum Genet* 65:1520-1529.

148. Werle E, Schneider C, Renner M, Völker M, Fiehn W. (1994) Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucleic Acids Res* 22(20):4354-5.
149. Williamson SL and Christodoulou J. (2006) Rett syndrome: new clinical and molecular insights. *Eur J Hum Genet* 14:896-903.
150. Winter M, Pankau R, Amm M, Gosch A, Wessel A. (1996) The spectrum of ocular features in the Williams-Beuren syndrome. *Clin Genet* 49:28-31.
151. Wolf U, Reinwein H, Porsch R, Schroter R, Baitsch H. (1965) Defizienz an den kurzen Armen eines Chromosoms Nr. 4. *Humangenetik* 1: 397-413, 1965.
152. Wright SW, Tarjan G, Eyer L. (1959) Investigation of families of two or more mentally defective siblings: clinical observations. *Am J Dis Child* 97:445-456.
153. Wright TJ, Ricke DO, Denison K, Abmayr S, Cotter PD, Hirschhorn K, Keinanen M, McDonald-McGinn D, Somer M, Spinner N, Yang-Feng T, Zackai E, Altherr MR. (1997) A transcript map of the newly defined 165 kb Wolf-Hirschhorn syndrome critical region. *Hum Molec Genet* 6: 317-324.
154. Wu Y-Q, Sutton VR, Nickerson E, Lupski JR, Potocki L, Korenberg JR, Greenberg F, Tassabehji M, Shaffer L G. (1998) Delineation of the common critical region in Williams syndrome and clinical correlation of growth, heart defects, ethnicity, and parental origin. *Am J Med Genet* 78: 82-89.
155. Xiang F, Zhang Z, Clarke A, Joseluiz P, Sakkubai N, Sarojini B, Delozier-Blanchet CD, Hansmann I, Edstrom L, Anvret M. (1998) Chromosome mapping of Rett syndrome: a likely candidate region on the telomere of Xq. *J Med Genet* 35: 297-3.
156. Yim SY, Jeon BH, Yang JA, Kim HJ. (2008) Fragile X syndrome in Korea: a case series and a review of the literature. *J Korean Med Sci Jun*;23(3):470-6.

157. Yu F, Zingler N, Schumann G, Strätling WH. (2001) Methyl-CpG-binding protein 2 represses LINE-1 expression and retrotransposition but not Alu transcription. *Nucleic Acids Research* 29(21):4493-4501.
158. Zappella M, Meloni I, Longo I, Hayek G, Renieri A. (2001) Preserved speech variants of the Rett syndrome: molecular and clinical analysis. *Am J Med Genet* 104(1):14-22.
159. Zeschnick M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B, Doerfler W. (1997) Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. *Hum Mol Genet* 6(3):387-395.
160. Zhou, Y, Law, HY, Boehm, CD, et al. Robust fragile X (CGG)_n genotype classification using a methylation specific triple PCR assay. *J Med Genet* 2004; 41: e45.
161. Zieve GW, Sauterer RA. (1990) Cell biology of the snRNP particles. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 25(1):1-46.
162. Zollino M, Di Stefano C, Zampino G, Mastroiacovo P, Wright T J, Sorge G, Selicorni A, Tenconi R, Zappala A, Battaglia A, Di Rocco M, Palka G, Pallotta R, Altherr M R, Neri G. (2000) Genotype-phenotype correlations and clinical diagnostic criteria in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet* 94:254-261.
163. Zollino M, Lecce R, Fischetto R, Murdolo M, Faravelli F, Selicorni A, Butte C, Memo L, Capovilla G, Neri G. (2003) Mapping the Wolf-Hirschhorn syndrome phenotype outside the currently accepted WHS critical region and defining a new critical region, WHSCR-2. *Am J Hum Genet* 72:590-597.

7.3. ИНТЕРНЕТ САЙТОВЕ:

1. http://en.wikipedia.org/wiki/FRAXA_syndrome
2. <http://genome.ucsc.edu>

3. <http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/cdk15.jpeg>
4. <http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/mecp2.jpeg>
5. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene=arx>
6. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene=foxg1>
7. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene=snrpn>
8. <http://www.biology.iupui.edu/biocourses/n100/2k2humancsomaldisorders.html>
9. http://www.cytocell.com/images/products/aquarius_wolf_diag.jpg
10. <http://www.fragilex.org/html/pcr.htm>
11. <http://www.fragilex.org/html/southern.htm>
12. <http://www.genetics.ie>
13. http://www.lakeforest.edu/images/userImages/eukaryon/Page_7093/valtierra%201.bmp
14. <http://www.scielo.br/img/revistas/anp/v63n3a/a02fig01.gif>
15. <http://www.mecp2.chw.edu.au>
16. <http://www.mlpa.com>
17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=309550>
18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>
19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

8. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

● Публикации във връзка с дисертационния труд

1. Todorova A, **Todorov T**, Georgieva B, Lukova M, Guerguelcheva V, Kremensky I, Mitev V. (2008) MLPA analysis/complete sequencing of the DMD gene in a group of Bulgarian Duchenne/Becker muscular dystrophy patients. **Neuromusc Disorders** 18(8):667-670 (**Impact Factor 2.977**).
2. **Todorov T**, Todorova A, Kirov A, Dimitrov B, Carvalho R, Nygren AOH, Boneva I, Mitev V. (2009) Fragile X mosaic male full mutation/normal allele detected by PCR/MS-MLPA. **BMJ Case Reports** (doi:10.1136/bcr.06.2008.0139)
3. **Todorov T**, Todorova A, Georgieva B, Mitev V. (2010) A unified rapid PCR method for detection of normal and expanded trinucleotide alleles of CAG repeats in Huntington chorea and CGG repeats in Fragile X syndrome. **Molecular Biotechnology** 45:150-154 (**Impact Factor 2.091**).
4. **Todorov T**, Todorova A, Avdjieva D, Dimova P, Angelova L, Tincheva R, Mitev V. (2010) Molecular Basis of mental retardation in a sample from Bulgaria. **Genet Counseling** 21(2):257-262 (**Impact Factor 0.543**).
5. **Todorov T**, Todorova A, Avdjieva D, Dimova P, Angelova L, Tincheva R and Mitev V(2010) Clinical/molecular data of mental retardation in Bulgaria. **Balkan Journal of Medical Genetics** 13(2): 11-25.

ОБЩ ИМПАКТ ФАКТОР: 5.611

● **Научни прояви във връзка с дисертационния труд**

- 1). **Todorov T**, Todorova A, Kirov A, Carvalho R, Boneva I, Mitev V (2008). Fragile X mosaic male detected by PCR/MS-MLPA, Eur J Hum Genet, 2008, 16 (suppl 2) P01.090, ESHG Conference, May 31 - June 3, 2008, Barcelona, Spain.
- 2). Todorova A, **Todorov T**, Tincheva R, Avdjieva D, Boneva I, Mitev V (2008). Rett syndrome in two years old girl with Xp deletion – case report, Eur J Hum Genet, 2008, 16 (suppl 2) P01.108, ESHG Conference, May 31 - June 3, 2008, Barcelona, Spain.
- 3). Kirov A, **Todorov T**, Todorova A, Mitev V. (2009), MLPA analysis for microdeletion syndromes diagnosed in Bulgaria. Williams-Beuren syndrome – case report, Paediatrica Croatica, 2009, 53 (suppl 2) MBB-70, 67
- 4). **Todorov T**, Todorova A, Tincheva R, Avdjieva D, Mitev V. (2009). Molecular diagnostics of mental retardations in Bulgarian patients, Paediatrica Croatica, 2009, 53 (suppl 2) MBB-58, 78
- 5). Todorova A, **Todorov T**, Tincheva R, Avdjieva D, Mitev V. (2009). Molecular diagnostics for Prader-Willi/Angelman syndrome (PWS/AS) in Bulgarian patients, Paediatrica Croatica, 2009, 53 (suppl 2) MBB-69, 78
- 6). **Todorov T**, Todorova A, Tincheva R, Avdjieva D, Mitev V. (2009). MECP2 mutations in Bulgarian Rett syndrome patients, Eur J Hum Genet, 2009, 17 (suppl 2) 97, P02.190, ESHG Conference, May 23 - 26, 2009, Vienna, Austria.
- 7). Kirov A, **Todorov T**, Todorova A, Kalenderova S, Mitev V. (2009). Williams-Beuren syndrome in a Bulgarian patients diagnosed by MLPA kit for microdeletion syndromes, Eur J Hum Genet, 2009, 17 (suppl 2) 346, P12.165, ESHG Conference, May 23 - 26, 2009, Vienna, Austria.
- 8). **Todorov T**, Todorova A, Avdjieva D, Dimova P, Tincheva R, Mitev V. (2010). Molecular genetic testing of mental retardation in Bulgaria, Eur J Hum Genet, 2010, 18 (suppl 1) 328, P12.128, ESHG Conference, June 12 - 15, 2010, Gothenburg, Sweden.
- 9). **T. Todorov**, A. Todorova, C. Motoescu, V. Bojinova, D. Iancu, D. Craiu, D. Stoian, L. Barbarii, P. Dimova, V. Mitev. (2011). Novel, recurrent mutations and a complex rearrangement in the MECP2 gene, Eur J Hum Genet, 2011, pp.420, P12.138, ESHG Conference, May 28 - 31, 2011, Amsterdam, The Netherlands.
- 10). **Todorov T**, Todorova A, Motoescu C, Bojinova V, Iancu D, Craiu D, Stoian D, Barbarii L, Dimova P, Mitev V. (2011) MECP2 gene mutations in Bulgarian and Romanian Rett syndrome patients. Balkan Journal of Medical Genetics 14 (suppl):74; P61; 9th Balkan Meeting of Human Genetics, 15-17 September, Timisoara, Romania. **POSTER AWARD**

ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТАТИ

1. Todorova A, **Todorov T**, Georgieva B, Lukova M, Guerguelcheva V, Kremensky I, Mitev V. (2008) MLPA analysis/complete sequencing of the DMD gene in a group of Bulgarian Duchenne/Becker muscular dystrophy patients. **Neuromusc Disorders** 18(8):667-670. (ЦИТИРАНИЯ 4)
 - Proceeding of the 10th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology – AOCCN, 2009, pp. 37-42
 - Pediatrics, 2009, 123(3):e471-475
 - Genetic Testing and Molecular Biomarkers, 2009, 13(3):427-431
 - Journal of Neurology, 2011, 258(9):1610-1623

2. **Todorov T**, Todorova A, Georgieva B, Mitev V. (2010) A unified rapid PCR method for detection of normal and expanded trinucleotide alleles of CAG repeats in Huntington chorea and CGG repeats in Fragile X syndrome. **Molecular Biotechnology** 45:150-154. (ЦИТИРАНИЯ 1)
 - Current Opinion in Psychiatry, 2011, 24(5):419-424

3. **Todorov T**, Todorova A, Avdjieva D, Dimova P, Angelova L, Tincheva R, Mitev V. (2010) Molecular Basis of mental retardation in a sample from Bulgaria. **Genet Counseling** 21(2):257-262. (ЦИТИРАНИЯ 1)
 - Current Opinion in Psychiatry, 2011, 24(5):419-424

4. **Todorov T**, Todorova A, Avdjieva D, Dimova P, Angelova L, Tincheva R and Mitev V(2010) Clinical/molecular data of mental retardation in Bulgaria. **Balkan Journal of Medical Genetics** 13(2): 11-25. (ЦИТИРАНИЯ 1)
 - Current Opinion in Psychiatry, 2011, 24(5):419-424

9. ПРИНОСИ

1. С настоящето проучване беше поставено началото на молекулярно-генетичната диагностика на синдроми с умствено изоставане в България.
2. Бяха оптимизирани методи за молекулярно-генетичен анализ на синдроми с умствено изоставане, като бяха разработени и публикувани в международни списания собствени методики.
3. Беше открито уникално комплексно мутационно събитие – двоен indel и непубликувана до момента инсерция на 4 бд в МЕСР2 гена.
4. Пациентите с все още неизяснен молекулен дефект, представляват добре подбрана и охарактеризирана група за анализи от нова генерация, като микрочипов анализ, секвениране от ново поколение и т.н.

Приложение 1. Клинични и молекулярно-генетични данни на пациенти със синдром на чуплива X хромозома.

№/диагноза/година на раждане	Симптоми Степен на умствено изоставане (СУИ)*	Физическо развитие	Епилепсия	ЕЕГ	Дисморфични белези	Генетични тестове/мутации
1. FXS 2002	Липса на говорни умения СУИ - гранична	Нормално	Не	Нормално	Широко лице, големи уши	FMR1, ARX, MECP2 Няма мутации
2. FXS/Епилепсия 2001	Липса на говорни умения, поведенчески нарушения, хиперактивност, автоагресия СУИ - средна	Нормално	да	Слабо дезорганизирана базална активност	Широко лице, големи уши	FMR1, ARX, MECP2 Няма мутации
3. FXS 1984	Интелектуален дефицит, поведенчески нарушения, частично избягва очен контакт, дефицит на внимание, хиперактивност, автоагресия, частични говорни умения СУИ - умерена	Нормално	Не	Няма данни	Не	FMR1 – мозайка пълна CGG експанзия /нормален алел
4. FXS 2003	Късно проговаряне, хиперактивност СУИ - средна	Забавяне в моторното развитие, контрол на главата – на 4м, прохожда на 1г6м., хипертрофия на прасците	Не	Дифузни проблеми в базалната активност	Широко лице, кривогледство, микроглюсия	FMR1, ARX, MECP2 Няма мутации
5. FXS/AS 2003	Дефицит на внимание, частични говорни умения и способност за комуникация СУИ - лека	Нормално	Не	Няма данни	Дискретен лицев дисморфизъм	FMR1, ARX, MECP2 Няма мутации
6. FXS 2001	No speech СУИ - средна	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	FMR1, ARX, MECP2 Няма мутации
7. FXS/Аутизъм	Изоставане при	Изоставане в	Не	Няма данни	Широко лице,	FMR1, ARX, MECP2

2005	проговаряне, изоставане в говорните умения с беден речник, хиперактивност, автоагресия, липса на стабилен очен контакт СУИ - средна	развитието – прохода на 1г7м само с помощ			ниско разположени, обратно ротирани ушни миди	Няма мутации
8. FXS 2001	No speech СУИ - средна	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	FMR1, ARX Няма мутации
9. FXS 1993	Интелектуален дефицит, частични езикови умения, проблеми с поведението, дефицит на внимание, избягване на очен контакт. СУИ - средна	Висок ръст, дълги ръце и крака	Не	Няма данни	Дисморфично лице, големи уши	FMR1 – пълна CGG експанзия
10. FXS 2003	Липса на говорни умения, хиперактивност СУИ - тежка	Забавено развитие	Единичен епилептичен епизод	Дифузна дезориентация	Микроцефалия	FMR1, ARX Няма мутации
11. FXS/Аутизъм 2003	Липса на говорни умения, хиперактивност, липса на очен контакт СУИ - средна	Стереотипни движения	Не	Няма данни	Лицев дисморфизъм, прогнатия, къса носна основа, голямо разстояние между зъбите.	FMR1, ARX, MECP2 SNRPN Няма мутации
12. FXS/PWS 2004	Липса на говорни умения СУИ - лека	Мускулна хипотония, забавяне в развитието – сяда на 12м, прохода на 37м, тремор, атаксия	Не	Няма данни	Няма данни	FMR1, ARX, SNRPN Няма мутации
13. FXS/PWS 2001	Липса на говорни умения, първа степен затлъстяване СУИ - лека	Нормално	Не	normal	Лицев дисморфизъм, Микрогениталии	FMR1, ARX, SNRPN, MDS-MLPA Няма мутации
14. FXS/ Аутизъм 2003	Липса на говорни умения СУИ - средна	Нормално	Не	Няма данни	Високо чело, големи уши,	FMR1, ARX Няма мутации

					долихоцефалия	
15. FXS 2004	Липса на говорни умения СУИ - средна	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	FMR1, ARX Няма мутации
16. FXS 2002	Липса на говорни умения, когнитивни и поведенчески проблеми СУИ - лека	Нормално	Не	Няма данни	Широко лице, високо небце	FMR1, ARX Няма мутации
17. FXS/ Аутизъм 2002	Интелектуален дефицит, липса на говорни умения, липса на очен контакт СУИ - средна	Нормално	Единичен фебрилен гърч	Дифузно силен абнормален запис от недиференцирана по области бърза активност	Високо небце, ниско разположени уши, стеснени очни цепки, Микрогениталии	FMR1, ARX, SNRPN Няма мутации
18. FXS/ Аутизъм 2004	Автоагресия, поведенчески проблеми, забавено проговаряне, интелектуален дефицит СУИ - средна	Нормално	Не	Няма данни	Малък нос, ниско разположени уши, скафоцефалия.	FMR1 – пълна CGG експанзия
19. FXS/ Аутизъм 2003	Забавено проговаряне, аутистично поведение СУИ - средна	Стереотипни движения на ръцете	Не	Няма данни	Стърчащи уши, монголоиден тип очни цепки	FMR1 Няма мутации
20. FXS/ Атипичен аутизъм 2005	Липса на говорни умения СУИ - средна	Автоматични движения на ръцете	Не	Няма данни	Хипертелоризъм, ниско разположени уши, монголоиден тип очни цепки, високо небце, голямо разстояние между зъбите, екстравертирани ноздри	FMR1 Няма мутации
21. FXS 2004	Липса на говорни умения, хиперактивност, вероятно влошаване след прекарано инфекционно заболяване СУИ - средна	Автоматични движения на ръцете	Не	Нормално	Няма данни	FMR1 Няма мутации

22. FXS 2006	Липса на говорни умения СУИ - средна	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	FMR1 Няма мутации .
23. FXS 2005	Забавено проговаряне, хиперактивност, липса на концентрация, агресия СУИ - средна	Забавено развитие – завъртане в легло на 6м, сядане – 12м, прохожда на 1г6м	Не	Няма данни	Долихоцефалия, късогледство	FMR1, MDS-MLPA Няма мутации
24. FXS 1994	Липса на говорни умения СУИ - средна	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	FMR1 Няма мутации
25. FXS 1996	Липса на говорни умения, хиперактивност, агресия, аутистично поведение СУИ - средна	Забавено развитие – прохожда на 2г8м.	Единичен епилептичен епизод	Няма данни	Хипертелоризъм, монголоиден тип очни цепки, високо небце, екстравертирани ноздри, късогледство, хипертрихоза Макроорхидизъм	FMR1 Няма мутации
26. FXS 2004	Липса на говорни умения, хиперактивност, аутистично поведение СУИ - средна	Изоставане в развитието	Не	Нормално	Лицев дисморфизъм, големи стърчащи уши	FMR1 Няма мутации
27. FXS 2006	Липса на говорни умения, хиперактивност, аутистично поведение СУИ - средна	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	FMR1 Няма мутации
28. FXS 1984	Интелектуален дефицит СУИ - гранична	Нормално	Не	Нормално	Дисморфични уши	FMR1 Няма мутации
29. FXS 2003	Липса на говорни умения , СУИ - средна	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	FMR1 Няма мутации
30. FXS 2001	Забавено проговаряне, когнитивни и поведенчески проблеми, интелектуален	Нормално	Не	Нормално	Дискретен лицев дисморфизъм	FMR1 Няма мутации

	дефицит СУИ – лека/гранична					
31. FXS 1998	Автоагресия, поведенчески проблеми, забавено проговаряне, интелектуален дефицит СУИ - средна	Нормално	Няма данни	Няма данни	Малък нос, ниско разположени уши, скафоцефалия,	FMR1 – мозайка пълна CGG експанзия /нормален алел
32. FXS 2008	Липса на говорни умения, аутистично поведение СУИ - средна	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	FMR1 Няма мутации

* Степен на умствено изоставане – степени на умствено изоставане: мн. тежка (IQ<20), тежка (IQ=20-34), средна (IQ=35-49), лека (IQ=50-69) и гранична (IQ=70-80).

Приложение 2. Клинични и молекулярно-генетични данни за пациенти с РТТ.

№/диагноза/ година на раждане	Първи симптоми Възраст на поява: г/м Степен на умствено изоставане (СУИ)*	Атипични движения	Моторно- двигателно развитие	Епилепсия	ЕЕГ	Лицев дисморфизъм	Генетични изследвания/ Мутации
1. Rett 2004	След 1 г лигави се, липса на говорни умения СУИ - средна	Стереотипни движения на ръцете	Не може да се изправя, не може да ходи с чужда помощ, атаксия	Не	Излишък от бързи ритми в ЕЕГ	Да	MECP2, CDKL5, MLPA Няма открити мутации
2. Rett 2001	6 м лигави се, липса на говорни умения СУИ - мн. тежка	Стереотипни движения на ръцете, липса на целенасочено използване на ръцете	Не може да ходи	Пристъпи	Няма данни	Няма данни	MECP2 с.473С→Т р.Thr158Met
3. Rett 1999	След 1г8м Липса на очен контакт, аутистично поведение СУИ - средна	Стереотипни движения на ръцете	Повишена разтегливост на ставните връзки, мускулна хипотония	Не	Нормално	Да	MECP2, CDKL5, MLPA Няма открити мутации
4. Атипичен Rett 2001	Няма данни Проблеми с комуникацията СУИ - лека	Стереотипни движения на ръцете	Трудности при тичане и изправяне	Епилепсия	Огнищен тип промени	Не	MECP2, CDKL5, MLPA Няма открити мутации
5. Атипичен Rett/AS 2003	Няма данни СУИ - средна	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	MECP2, CDKL5, MLPA SNRPN Няма открити мутации
6. Autism 2006	Няма данни Липса на говорни умения, хиперактивност, агресия СУИ - средна	Няма данни	Ходи самостоятелно	Не	Генерализирана бавновълнова абнормалност в съня	Дискретен лицев дисморфизъм	MECP2, CDKL5, ARX, FMR1, MLPA Няма открити мутации 46,XX,del(X) (p1.22)
7. Rett 2001	6м Лигави се, липса на	Стереотипни движения на	Не може да ходи	Пристъпи	Няма данни	Няма данни	MECP2 с.808С→Т

	говорни умения СУИ - тежка	ръцете, липса на целенасочено използване на ръцете					p.Arg270Stop
8. Autism? 2001	1г8м Минимални говорни умения, автоагресия СУИ - средна	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Излишък на бързи тирми в ЕЕГ	Няма данни	MECP2, CDKL5, MLPA Няма открити мутации
9. Rett/West 2007	5м Липса на очен контакт СУИ - лека	Стереотипни движения на ръцете	Минимални движения на 5м	Инфантилни спазми	Hypsarhythmia	Микроцефалия	MECP2, CDKL5, MLPA Няма открити мутации
10. Rett 2005	Няма данни Липса на говорни умения, избягва очен контакт с деца СУИ - средна	Няма данни	Прохожда на 1г6м	Инфантилни спазми	Дифузни бавновълнови промени	Не	MECP2, CDKL5, MLPA Няма открити мутации
11. Rett 2003	Няма данни Липса на говорни умения СУИ - средна	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	MECP2, CDKL5, MLPA Няма открити мутации
12. Rett 2003	Няма данни Липса на говорни умения СУИ - средна	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	MECP2, CDKL5, MLPA Няма открити мутации
13. Rett 2000	2г Липса на говорни умения, автоагресия СУИ - мн. тежка	Стереотипни движения на ръцете	Прохожда на 1г8м, не ходи самостоятелно, мускулна хипотония на долните крайници, локомоторна атаксия	Фокална епилепсия	Фокални аномалии в дясна хемисфера	Няма данни	MECP2 c.1157_1200 del44 p.Leu386fs
14. Rett/AS 2002	2г Липса на говорни умения	Стереотипни движения на ръцете	Няма данни	Няма данни	Генерализирана бавновълнова абнормалност	Да	MECP2, CDKL5, MLPA SNRPN Няма открити мутации

	СУИ - средна						
15. Rett 2006	3м Липса на говорни умения СУИ - средна	Стереотипни движения на пръстите	Стереотипни движения на тялото (“поклащане”), хипертония стастичност	Инфантилни спазми, фокални пристъпи, повръщане	Генерализирана пароксизомална активност	Няма данни	MECP2, CDKL5, MLPA Няма открити мутации
16. Rett 2003	Няма данни Поведенчески проблеми, умствено изоставане СУИ - средна	Няма данни	Изоставане в развитието	Няма данни	Няма данни	Няма данни	MECP2, CDKL5, MLPA Няма открити мутации
17. Rett 2006	Няма данни Забавяне и регресия на говорните умения СУИ - лека	Автоматизъм на ръцете и стереотипни движения	Прохожда на 1г6м, стереотипни движения на тялото и долните крайници локомоторна атаксия, мускулна хипотония	Епизодична апнея	Нормално	Кривогледство	MECP2 с.808С→Т р.Arg270Stop
18. Rett 2003	Няма данни Регрес на говорните умения СУИ - мн. тежка	Стереотипни движения на ръцете	Нормално	Генерализирани тонично-клонични пристъпи	Дифузна дисритмия в умерена степен	Няма данни	MECP2 с.880С→Т р.Arg294Stop
19. Rett 2001	Няма данни Изговаря отделни думи, аутистично поведение СУИ - средна	Стереотипни движения на ръцете	Няма данни	Няма данни	Дифузно неспецифични промени в умерена степен	Долихоцефалия, хипопластична средна част на лицето, екстравертирани ноздри	MECP2, CDKL5, MLPA Няма открити мутации
20. Autism 1990	3-4г Аутистично поведение, липса на очен контакт, липса	Стереотипни движения на ръцете	Стереотипни движения на тялото	Няма данни	Няма данни	Да	MECP2, CDKL5, MLPA Няма открити мутации

	на говорни умения СУИ - лека						
21. Autism/ AS 2005	Няма данни Липса на говорни умения, аутистично поведение СУИ - лека	Стереотипни движения на ръцете	Стереотипни движения на тялото	Няма данни	Нормално	Няма данни	MECP2, CDKL5, MLPA SNRPN Няма открити мутации
22. Rett 1999	След раждане Липса на говорни умения СУИ - средна	Екстрапирамидна симптоматика – хореични и балистични хиперкинези	Забавяне в ранното развитие, не ходи, мускулна атрофия, кифосколиоза	Фебрилни гърчове, епилепсия от неясен тип	Забавена основна активност с умерени дифузни промени	Микроцефалия, хипертрихоза	MECP2, CDKL5, MLPA Няма открити мутации
23. Rett 2005	1г Липса на говорни умения СУИ - средна	Стереотипни движения на ръцете	Забавяне в моторното развитие – сядане, прохождане на 2г, двигателна регресия (не може да става от леглото, локомоторна атаксия)	Не	Нормално	Микроцефалия, приплеснатост в тилната област	MECP2, MLPA с.27-?_*?del (делеция на екзон 3 и част от екзон 4)
24. Rett/PWS 2007	3м СУИ - средна	Стереотипни движения на ръцете	Изоставане в контрола на главата и завъртането в леклото, мускулна дистрофия, атаксия, мускулна хипотония	Няма данни	Абнормален α - ритъм	Микроцефалия	MECP2, CDKL5, MLPA SNRPN Няма открити мутации
25. Rett/AS/ Pitt-Hopkins 1998	След раждането, агресия, автоагресия СУИ - тежка	Стереотипни движения на ръцете,	Изоставане в завъртане в леглото – 1г2м,	Епилепсия	Фокални ЕЕГ абнормалности	Микроцефалия, лицев дисморфизъм,	MECP2 с.916C→T, p.Arg306Cys

		стереотипно изражение на лицето	прохождане – 2г4м, лумбална хиперлордоза, контрактури			хипертрихоза	
26. Rett 1994	Няма данни СУИ - лека	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	MECP2, CDKL5, MLPA Няма открити мутации
27. Rett 2005	След раждането, Изоставане в развитието, липса на говорни умения СУИ - средна	Стереотипни движения на ръцете	Не може да ходи самостоятелно	Епилепсия с миоклонични и астатични пристъпи	Генерализирана пароксизмална активност от комплекси – бавна вълна с честота 2 сек	Микрогнатия, високо небце, големи уши	MECP2, CDKL5, MLPA Няма открити мутации
28. Rett 2002	Няма данни СУИ - тежка	Стереотипни движения на ръцете	Изоставане в контрола на главата и завъртането в леглото, мускулна дистрофия, атаксия, мускулна хипотония	Епилепсия	Няма данни	Микроцефалия	MECP2, CDKL5, MLPA Няма открити мутации
29. Autism 2006	2г Липса на говорни умения	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	MECP2, CDKL5, MLPA Няма открити мутации
30. Rett nd	След раждането, Изоставане в развитието, липса на говорни умения СУИ - тежка	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	MECP2, CDKL5, MLPA Няма открити мутации
31. Rett 2006	Няма данни СУИ - тежка	Стереотипни движения на ръцете	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Микроцефалия	MECP2 с.763C→T p.Arg255Stop
32. Rett 2005	Няма данни Регрес на говорните	Стереотипни движения на	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	MECP2 с.763C→T

	умения СУИ - мн. тежка	ръцете					p.Arg255Stop
33. Autism 2006	Няма данни Липса на говорни умения	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	MECP2, CDKL5, MLPA Няма открити мутации
34. Rett/AS 2007	След раждането, Агресия, автоагресия СУИ - тежка	Стереотипни движения на ръцете, стереотипно изражение на лицето	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	MECP2, CDKL5, MLPA Няма открити мутации
35. Rett 2008	След раждането, Изооставане в развитието, липса на говорни умения СУИ - тежка	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	MECP2, CDKL5, MLPA Няма открити мутации MECP2, MLPA с.27-?_*?del (делеция на екзон 3 и част от екзон 4)
36. Rett/AS 2000	Няма данни СУИ - средна	Стереотипни движения на ръцете	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Микроцефалия	MECP2, CDKL5, MLPA, SNRPN Няма открити мутации
37. PWS/Rett 2008	Няма данни СУИ - гранична	Стереотипни движения на ръцете	Затлъстяване	Епилепсия	Няма данни	Няма данни	SNRPN, MECP2 с.321insGAAG; p.(Lys107fs)
38. Rett 2008	бм. Липса на очен контакт СУИ - тежка	Стереотипни движения на ръцете	Изооставане в контрола на главата, седане, въртене и изправяне, мускулна хипотония	Епилепсия	Симетрично забавена основна активност	Микроцефалия	MECP2 с.[584_624del41insTT; 638delTinsCA]

* Степен на умствени изоставане (СУИ): мн. тежка (IQ<20), тежка (IQ=20-34), средна (IQ=35-49), лека (IQ=50-69) и гранична (IQ=70-80).

Приложение 3. Клинични и молекулярно-генетични данни за пациенти с PWS/AS.

№/диагноза/година на раждане	Първи симптоми Възраст на поява: г/м Степен на умствено изоставане (СУИ)*	Физическо развитие	Епилепсия/ЕЕГ	Затлъстяване	Лицев дисморфизъм	Генетични изследвания/ Мутации
1. PWS/FXS 2002	1г Изоставане в говорното развитие СУИ - лека	Няма данни	Няма данни	Да	Няма данни	SNRPN, FMR1, ARX, MECP2, Няма открити мутации
2. PWS 2000	5м Говорни проблеми и проблеми с общуването СУИ - лека	Мускулна хипотония, лумбална хиперлордоза	Не	Да	Битемпорално стеснение на главата, високо небце, конвергентно късогледство	15q11-13 делеция на бащин неметиран фрагмент
3. PWS 2006	5-6м Липса на говорни умения, агресивно поведение СУИ - лека	Мускулна хипотония, кифосколиоза на крайниците, не може да ходи самостоятелно	Не	Не	Къси и извити на горе клепачо, високо небце, големи, ниско разположени ушни миди	15q11-13 делеция на бащин неметиран фрагмент
4. PWS/FXS 1999	3г Лека форма на умствено изоставане, проблеми с общуването СУИ - гранична	Торакална кифоза, мускулна хипотония, тремор на ръцете	Не	Да	Големи, ниско разположени ушни миди, дебела долна устна, микрогениталия	SNRPN, FMR1, ARX Няма открити мутации
5. PWS/SMA? 2003	2м Лека форма на умствено изоставане СУИ - гранична	Мускулна хипотония, лумбална хиперлордоза	Не	Да	Долихоцефалия, ниско разположени ушни миди, високо небце, обърнати надолу ръбове на устата, микрогениталия	15q11-13 делеция на бащин неметиран фрагмент
6. PWS 1999	6г Лека форма на умствено изоставане СУИ - лека	Нормално	Не	Да	Ниско разположени ушни миди, микрогнатия	SNRPN, FMR1, ARX Няма открити мутации

7. PWS 2007	От раждането Умствено изоставане СУИ - средна	Изоставане в моторното развитие: контрол на главата – 5м, сядане – 10м, прохожда – 1г5м, мускулна хипотония	Не	Да	Микроцефалия, широко лице, отворена уста, крипторхизъм	15q11-13 UPD **
8. PWS 2003	От раждането Лека форма на умствено изоставане СУИ - гранична	Мускулна хипотония	Пристъпи след ваксинация	Да	Долихоцефалия, тънки устни с повдигнати краища	15q11-13 делеция на бащин неметилиран фрагмент
9. PWS 2008	От раждането СУИ - лека	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	15q11-13 делеция на бащин неметилиран фрагмент
10. PWS 2006	Няма данни СУИ - гранична	Няма данни	Няма данни	Няма данни	Няма данни	SNRPN, Няма открити мутации
11. PWS 2005	Няма данни СУИ - лека	Няма данни	Няма данни	Да	Няма данни	SNRPN, FMR1, Няма открити мутации
12. PWS 2009	От раждането СУИ - лека	Мускулна хипотония	Няма данни	Да	Долихоцефалия, тънки устни с повдигнати краища	15q11-13 UPD
13. PWS 2007	От раждането СУИ - лека	normal	Не	Не	normal	SNRPN, Няма открити мутации
14. AS 2000	2у Умствено изоставане, агресия, автоагресия, изражение тип „happy puppet” СУИ - тежка	Няма данни	Умерено абнормен запис от бавновълнов тип	Няма данни	Прогнатия, повдигнати краища на устата, големи, ниско разположени ушни миди	SNRPN, FMR1, Няма открити мутации
15. AS 2004	3у Умствено изоставане,	Изоставане в развитието –	Единичен епилептичен	Не	Брахицефалия, хипертелоризъм, ,	15q11-13 UPD липса на

	изговаря отделни думи СУИ - тежка	сядане – 12м, прохожда – 1г5м	епизод с фебрилни пристъпи по време на инфекция, дисритмия в умерена степен		голям език	майчино метирано копие
16. AS 2006	От раждането изражение тип „happy puppet” СУИ - средна	Изоставане в развитието – сядане – 10м, прохожда – 1г6м, мускулна хипотония, стереотипни движения на ръцете	Епилепсия	Не	Микроцефалия	15q11-13 делеция на майчин метиран фрагмент

* Степен на умствени изоставане (СУИ): мн. тежка (IQ<20), тежка (IQ=20-34), средна (IQ=35-49), лека (IQ=50-69) и гранична (IQ=70-80).

** UPD – Uniparental disomy

Приложение 4. Клинични и молекулярно-генетични данни за пациенти с микроделеционни синдроми.

№/диагноза/година на раждане	Първи симптоми Възраст на поява: г/м	Физическо развитие	ЕЕГ	Сърдечни проблеми	Дисморфични белези	MDS-MLPA/ мутации
1. WBS 1997	3м Слабо изоставане в психомоторното развитие, дефицит на внимание, хиперактивност	Нормално; Повишена разтегливост на ставните връзки	Подчертана лабилност на основната активност, зависимост от функционалното състояние в момента	Периферна пулмонална стеноза, суправалвуларна стеноза	Дебели устни, големи, ниско разположени ушни миди, чип нос, микрогнатия	Делетирани сонди за гените ELN и LIMK1 (7q11.23)
2. WBS 2008	От раждането Слабо изоставане в психомоторното развитие, стереотипно движение на ръцете	Изоставане в развитието, мускулна хипотония на долните крайници	Нормално	Пулмонална стеноза, абнормална пулмонална клапа – груба, диселастична с оформящ се купол при систола	Високо чело, малко топчесто носле с висок филтрум, микрогнатия, къдрава светла коса	Делетирани сонди за гените ELN и LIMK1 (7q11.23)
3. DGS 2007	От раждането Слабо изоставане в психомоторното развитие	Няма данни	Няма данни	Сърдечна операция	Дисморфични лицеви белези	Нормално
4. WHS 2003	Тежко умствено изоставане, изоставане в говорното развитие	Къс врат, Short neck, тънки пръсти, дълги крака, тежка мускулна хипотония	Няма данни	Умерен шънт на предсърдечно ниво	Скафоцефалия, антимоноголоидни очни цепки, хипертелоризъм, двустранен епикант, дивергентно късогледство, сплескана основа на носа, микроретрогнатия, ниско разположени завъртяни на обратно и деформирани ушни миди, двустранен крипторхизъм	Делетирани сонди за гените LETM1 и WHSC1 (4p16.3)