

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

СЛАВЕНА ХРИСТОВА АТЕМИН

**Молекулна диагностика на редки неврологични и офталмологични
заболявания в контекста на съвременните гени и геномни технологии**

АВТОРЕФЕРАТ

**На дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен
„ДОКТОР“**

**Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и
информатика**

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Докторска програма: Молекулярна биология

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:

Акад. проф. д-р Ваньо Иванов Митев, дм, дбн

Проф. Албена Първанова Годорова – Георгиева, дбн

София, 2022

Дисертационният труд съдържа 144 страници, 90 фигури и 10 таблици.

Цитирани са 98 литературни източника и 11 електронни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Катедра по медицинска химия и биохимия на Медицински факултет, Медицински университет – София.

Включените в дисертацията изследвания са извършени в:

- Катедра по медицинска химия и биохимия на Медицински факултет, Медицински университет – София
- Генетична Медико-Диагностична Лаборатория „Геника“, гр. София

Настоящото изследване е финансирано частично от Съвета по медицинска наука на Медицински университет – София по договори Д-58/02.05.2017г., Д-116/03.05.2018г. и Д-120/23.04.2019г.

Дисертационният труд е представен на заседание на катедрен съвет на Катедра по медицинска химия и биохимия, Медицински университет - София, на 15.03.2022г. и насрочен за защита към 31.10.2022г.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 31.10.2022г. в Катедра по медицинска химия и биохимия, Медицински университет – София, ул. Здраве 2, гр. София, пред научно жури в състав:

1. Проф. Алексей Славков Савов, дб (рецензия)
2. Доц. д-р Даниела Мирчева Авджиева-Тзавелла, дм (становище)
3. Доц. Анастас Георгиев Господинов, дб (становище)
4. Доц. Стойно Стефанов Стойнов, дб (рецензия)
5. Доц. Мария Борисова Иванова, дм (становище)

Материалите по защитата са на разположение в Катедра по медицинска химия и биохимия, Медицински университет – София.

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения	1
Резюме	2
Summary	3
Въведение	4
1. Цел и задачи	5
1.1. Цел	5
1.2. Задачи	5
2. Материали и методи.....	6
2.1. Материали	6
2.1.1. Клиничен материал	6
2.1.2. Биологичен материал	6
2.2. Методи.....	6
3. Резултати и обсъждане	7
3.1. Неврологични заболявания	7
3.1.1. Неврологични заболявания с гърчова симптоматика	8
3.1.1.1. <i>IRF2BPL</i> -свързани заболявания.....	8
3.1.1.2. <i>NARS1</i> -свързани заболявания.....	10
3.1.1.3. <i>TPP1</i> -свързани заболявания	12
3.1.1.4. <i>ARG1</i> -свързани заболявания.....	14
3.1.1.5. <i>FH</i> -свързани заболявания	19
3.1.1.6. <i>PEX1</i> и <i>PEX6</i> -свързани заболявания	21
3.1.2. Невромускулни заболявания	24
3.1.2.1. <i>MYH7</i> -свързани заболявания	24
3.1.2.2. <i>TWNK</i> -свързани заболявания.....	28
3.1.2.3. <i>UNC80</i> -свързани заболявания	30
3.1.2.4. <i>SCO2</i> -свързани заболявания.....	32
3.2. Офталмологични заболявания	33
3.2.1. <i>CRB1</i> -свързани заболявания.....	34
3.2.2. <i>CEP290</i> -свързани заболявания.....	36
3.2.3. <i>USH2A</i> -свързани заболявания	38
3.2.4. Наследствена оптична невропатия на Leber	39
3.3. Обобщение на резултатите и заключение.....	43

4.	Изводи	44
5.	Приноси	45
6.	Публикации и научни прояви във връзка с дисертационния труд	46
6.1.	Публикации във връзка с дисертационния труд	46
6.2.	Научни прояви във връзка с дисертационния труд.....	47
7.	Библиография	48
7.1.	Чуждоезична литература	48
7.2.	Електронни източници.....	49

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

NGS – next generation sequencing/секвениране от ново поколение

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

РНК – рибонуклеинова киселина

тРНК – транспортна РНК

иРНК – информационна РНК

мтДНК – митохондриална ДНК

ПВР/PCR – полимеразна верижна реакция/polymerase chain reaction

LHON - наследствената оптична невропатия на Leber

NMD - nonsense-mediated decay

ACMG – Американски колеж по медицинска генетика и геномика/American College of Medical Genetics and Genomics

AMP – Асоциация за молекулярни патологии/Association for Molecular Pathology

АТФ/АТР - аденозинтрифосфат

РЕЗЮМЕ

Настоящият дисертационен труд е фокусиран върху молекулярно-генетичната диагностика и прилагането на различни технологични подходи при две основни групи заболявания: неврологични (към които спадаха пациенти с гърчова симптоматика или невромускулно засягане) и офталмологични.

Използвайки съвременните методи за диагностика (секвениране по Sanger и NGS), беше установена генетичната причина за наблюдаваните клинични симптоми при 43% от насочените пациенти.

От групата на неврологичните заболявания, генетично верифицирахме 39% от изследваните пациенти. При пациентите с неврологични заболявания с гърчова симптоматика бяха установени разнообразни генетични варианти, които водят до нарушения в различни клетъчни процеси, като натрупване на неразградени белтъчни агрегати в клетката, лизозомни и пероксизомни увреждания, метаболитни нарушения в цикъла на Кребс и уреен цикъл, както и нарушения в аминоксил-тРНК-синтезните функции и транспорта на аминокиселини в процеса на белтъчната синтеза. При пациентите с невромускулно засягане бяха детектирани генетични варианти, които водят до нарушаване на белтъци от мускулното съкращение, йонни невронални канали, регулиращи невромускулната сигнализация, както и митохондриални ензими или регулатори, повлияващи експресията на митохондриалния геном или електронния транспорт и производството на АТФ.

При 57% от пациентите с редки офталмологични заболявания установихме генетичната причина, която води до нарушена експресия на важни белтъци в ретината или до увреждане на нормалните функции на митохондриите.

В допълнение представихме предимствата и недостатъците на всеки един от използваните методи за анализ. С описаните клинични случаи, демонстрирахме кой е най-правилният подход при избора на молекулярно-генетичен анализ с цел верифициране на диагнозата на молекулярно ниво.

На база на проведените молекулярно-генетични изследвания бяха открити редица непубликувани в световната литература генетични варианти, което показва високата хетерогенност на пациентите от български произход. Обособихме ендемичен ромски регион (региона на с.Осиковица) за заболяването аргиназен дефицит в България. Доказахме честота от 1% на хетерозиготно носителство на варианта с.329+1G>A в *ARG1* гена при роми от региона на с.Осиковица.

Настоящият дисертационен труд представи необходимостта от прилагане на индивидуализиран подход за генетично верифициране на диагнозата при таргетните пациенти. Това от своя страна подпомага подготвянето на засегнатите пациенти за нови терапевтични подходи на молекулярно ниво. В допълнение определяне на носителския статус и идентифициране на рисковите родственици е от основно значение за провеждане на адекватна медико-генетична консултация и семейно планиране.

SUMMARY

The current PhD thesis is focused on molecular-genetic diagnostics based on different technological approaches in two main groups: neurological (consisting of patients experiencing seizures or exhibiting neuromuscular involvement) and ophthalmological diseases (eye diseases). Using modern diagnostic methods (Sanger sequencing and NGS), the genetic cause of the observed clinical symptoms was established in 43% of the tested patients.

From the group of neurological diseases, we genetically verified 39% of the tested patients. Diverse genetic variants that lead to abnormalities in different cellular processes, such as the accumulation of undegraded protein aggregates in the cell, lysosomal and peroxisome disorders, metabolic abnormalities in the Krebs cycle and urea cycle, as well as disorders in the aminoacyl-tRNA synthetase functions and amino acid transport in the process of protein synthesis, were found in patients with neurological diseases with seizure symptoms. Genetic variants that lead to disruption of muscle contraction proteins, neuronal ion channels regulating neuromuscular signaling, as well as mitochondrial enzymes or regulators affecting mitochondrial genome expression or electron transport and ATP production were detected in patients with neuromuscular involvement.

In 57% of the patients with rare eye diseases, we identified the genetic cause leading to the observed clinical features, which arise as a result of impaired expression of important proteins in the retina or from damage to the normal functions of their mitochondria.

Additionally, we have presented the advantages and disadvantages of each of the used molecular-genetic techniques. The described clinical cases have demonstrated which is the most appropriate method in choosing a molecular-genetic analysis in order to verify the diagnosis at the molecular level.

Based on the performed analyses, a number of unpublished genetic variants were found. This demonstrates the high heterogeneity of the patients from Bulgarian origin. An endemic Roma region (region of the village of Osikovitsa) in Bulgaria for the disease arginase deficiency was established. We proved significant carrier frequency (1% of heterozygous carrier) of the variant c.329+1G>A in the *ARG1* gene in people from Roma origin in the endemic region.

The present PhD thesis demonstrates the necessity of applying an individualized approach for genetic verification of the diagnosis in the targeted patients. This, in turn, helps preparing affected patients for new therapeutic approaches at the molecular level. In addition, determining the carrier status and identifying at-risk relatives would be of fundamental importance for offering adequate medico-genetic counseling and family planning.

ВЪВЕДЕНИЕ

Неврологичните заболявания са многобройна група заболявания, като общото между тях е че се засяга централната и/или периферната нервна система. При пациентите може да се наблюдават различни клинични симптоми, които включват атаксия, невромускулно засягане, епилептична симптоматика и др. Към днешна дата са известни редица гени, патогенни варианти в които могат да доведат до наблюдаваните неврологични нарушения. В някои случаи неврологичната симптоматика може да се дължи на комплексното взаимодействие между няколко генетични варианта и фактори на околната среда.

Офталмологичните заболявания включват всички заболявания, които засягат човешкото око и зрението. Генетичната етиология е силно застъпена и в тази група. Широк спектър от патологични генетични варианти в различни гени са описани към момента в асоциация с офталмологични заболявания.

В хода на изработване на дисертационния труд се фокусирахме към генетично охарактеризиране на някои редки неврологични и офталмологични заболявания в контекста на съвременните методи за диагностика – секвениране по Sanger и NGS, както и представянето на предимствата и недостатъците на всеки един от използваните методи.

1. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

1.1. Цел

Целта на настоящия дисертационен труд е молекулярно-генетично охарактеризиране на някои редки неврологични и офталмологични заболявания в контекста на съвременните методи за диагностика – секвениране по Sanger и NGS. Друга поставена цел беше и провеждане на селективен *ARG1* мутационен скрининг в таргетен географски регион на страната.

1.2. Задачи

- Подбиране на най-правилния подход (секвениране по Sanger или NGS) за установяване на генетичната причина, довела до проява на някои редки неврологични и офталмологични заболявания в България
- Извършване на молекулярно-генетични анализи с цел генетично верифициране на диагнозите
- Анализ и интерпретация на данни, получени в резултат от NGS
- Потвърждаване на откритите с NGS варианти и провеждане на сегрегационен анализ в семействата, чрез класическо секвениране по Sanger
- Сравняване на получените резултати с публикуваната световна литература и международни бази данни
- Извършване на таргетен мутационен скрининг по отношение на потенциален ендемичен регион в България
- Изчисляване на процент хетерозиготност и алелна честота по отношение на таргетната мутация в изследвания регион

2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

2.1. Материали

2.1.1. Клиничен материал

В хода на изработване на настоящия дисертационен труд бяха изследвани 279 проби (Таблица 1).

Таблица 1: Разпределение на изследваните пациенти и техни родственици в хода на изработване на настоящия дисертационен труд.

Общ брой изследвани пациенти 279			
Група заболявания	Неврологични заболявания	Офталмологични заболявания	Селективен мутационен скрининг
Брой изследвани таргетни пациенти	33	7	200
Брой изследвани родственици	32	7	
Общ брой	65	14	200

2.1.2. Биологичен материал

За провеждане на молекулярно-генетичните изследвания беше използвана високомолекулна ДНК.

2.2. Методи

- Изолиране на високомолекулна ДНК от периферна кръв по солеви метод
- Изолиране на високомолекулна ДНК от материал, получен след хорионбиопсия или амниоцентеза, както и от букална лигавица, урина и филтърни бланки, чрез използването на комерсиални китове за изолиране
- Директна спектрофотометрия
- Секвениране от ново поколение (NGS)

Секвенирането от ново поколение беше извършено в колаборация с две лаборатории Admera Health, Ню Джърси, Америка и Clinical Institute of Medical Genetics, UMC Ljubljana, Любляна, Словения.

- Биоинформатичен анализ и рефериране към международни бази данни
- Полимеразна верижна реакция (ПВР, polymerase chain reaction; PCR)
- Електрофореза в агарозен гел
- Директно секвениране по Sanger с флуоресцентно белязани дидезоксинуклеотиди

3. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

3.1. Неврологични заболявания

В рамките на настоящия дисертационен труд бяха изследвани 33 таргетни пациенти с неврологични заболявания и 32 родственици (включително фетуси). При 13 (39%) от индексните пациенти, установихме генетичната причина за наблюдаваната клинична симптоматика. Общо изследвахме 22-ма пациенти с неврологични заболявания, включващи гърчова симптоматика. При 8 (36%) от тях установихме генетичната причина, довела до наблюдаваните симптоми. В таблица 2 са представени всички генетично верифицирани пациенти с неврологични заболявания, включващи гърчова симптоматика, които бяха обект на настоящото проучване.

Таблица 2: Молекулярно-генетични данни на пациенти с неврологични заболявания, включващи гърчова симптоматика, обект на настоящата дисертация.

Номер	Пол	Изследвани родственици	Засегнат ген	Установен генетичен вариант	Зиготност	Тип на генетичния вариант	Унаследен от	Използван анализ при таргетния пациент
1	женски	двама родители	<i>IRF2BPL</i>	c.376C>T, p.Gln126Ter	хетерозигот	nonsense	<i>de novo</i>	NGS
2	женски	двама родители	<i>NARS1</i>	c.676G>C, p.Val226Leu	хетерозигот	missense	майка	NGS
				c.986G>A, p.Arg329Gln	хетерозигот	missense	баща	
3	женски	двама родители и незасегната сестра	<i>TPPI</i>	c.119G>A, p.Arg40His и c.1375T>G, p.Tyr459Asp	хетерозигот	missense	майка	NGS
				c.622C>T, p.Arg208Ter	хетерозигот	nonsense	баща	
4	мъжки	двама родители и незасегната сестра	<i>ARG1</i>	c.329+1G>A	хомозигот	splice site	майка	Секвениране по Sanger
							баща	
5	мъжки	/	<i>ARG1</i>	c.775G>A, p.Gly259Ser	хомозигот	missense	/	Секвениране по Sanger
6	женски	двама родители	<i>FH</i>	c.1048C>T, p.Arg350Trp	хомозигот	missense	майка	NGS
							баща	
7	женски	двама родители и два фетуса	<i>PEX1</i>	c.2097dup, p.Leu700TyrfsTer42	хомозигот	frameshift	баща	NGS
							майка	
8	женски	двама родители и един фетус	<i>PEX6</i>	c.2663G>C, p.Arg888Pro	хетерозигот	missense	баща	NGS
				c.160_243del, p.Val54_Leu81del	хетерозигот	In-frame делеция	майка	

От групата на неврологичните заболявания с невромускулно засягане, изследвахме 11 пациенти, като при 5 от тях (45%) верифицирахме генетичната причина за клиничната им изява. В таблица 3 са представени всички генетично верифицирани пациенти от групата на неврологичните заболявания с невромускулно засягане, обект на настоящия дисертационен труд.

Таблица 3: Молекулярно-генетични данни на генетично верифицираните пациенти с неврологични заболявания с невромускулно засягане, обект на настоящата дисертация.

Номер	Пол	Изследвани родственици	Засегнат ген	Установен генетичен вариант	Зиготност	Тип на генетичния вариант	Унаследен от	Използван анализ при таргетния пациент
1	мъжки	двама родители, единият от които е засегнат	<i>MYH7</i>	c.5746C>T, p.Gln1916Ter	хетерозигот	nonsense	баща	NGS
2	женски	майка, засегнатата сестра и двама племенници	<i>MYH7</i>	c.5560-2A>C	хетерозигот	splice site	предполагам бащин произход	NGS
3	женски	двама родители	<i>TWNK</i>	c.1412A>G, p.Tyr471Cys	хетерозигот	missense	майка	NGS
				c.1732A>G, p.Lys578Glu	хетерозигот	missense	баща	
4	мъжки	двама родители и незасегнатата сестра	<i>UNC80</i>	c.29A>G, p.Gln10Arg	хетерозигот	missense	майка	NGS
				c.2338A>G, p.Ser780Gly	хетерозигот	missense	баща	
5	мъжки	двама родители	<i>SCO2</i>	c.418G>A, p.Glu140Lys	хомозигот	missense	майка	NGS
							баща	

Чрез секвениране от ново поколение изяснихме генетична причина при 11 от изследваните таргетни пациенти с редки неврологични заболявания. Класическото секвениране по Sanger беше основен метод за анализ при двама пациенти с диагноза аргиназен дефицит, както и при незасегнатите родственици от семействата им.

Селективен мутационен скрининг при 100 новородени от ромски произход от потенциален ендемичен регион в България, както и 100 здрави контроли от новородени също от ромски произход от цялата страна, беше извършен чрез секвениране по Sanger.

3.1.1. Неврологични заболявания с гърчова симптоматика

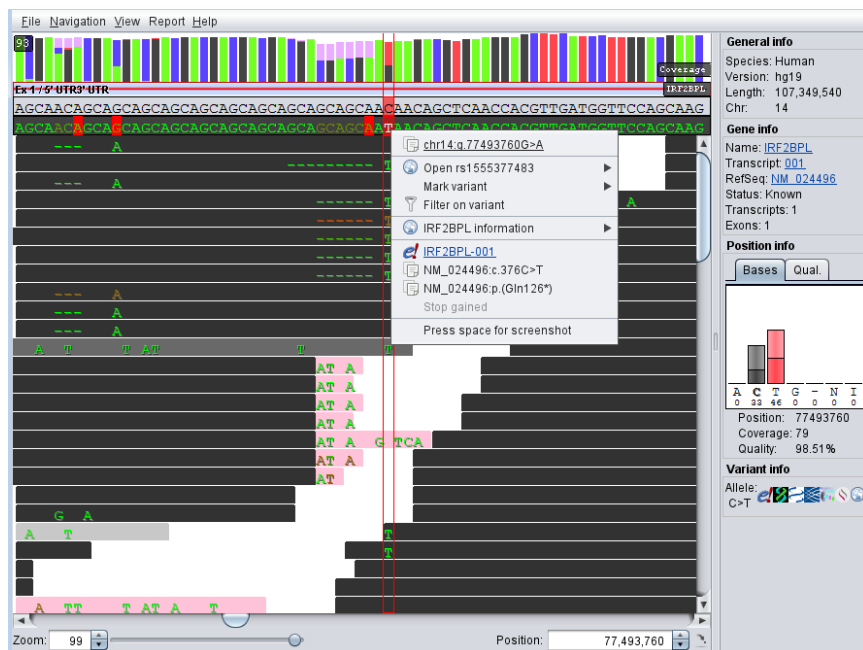
3.1.1.1. *IRF2BPL*-свързани заболявания

Клинична картина

Таргетният пациент е жена на 26 години с клинична диагноза „прогресивна миоклонична епилепсия“. Интелектуален дефицит, изоставане в говорното развитие, атаксия и лек страбизъм са едни от водещите клинични характеристики при пациентката.

Молекулярно-генетичен анализ

Имайки предвид големия набор от гени, патогенни варианти в които могат да бъдат причина за наблюдаваната симптоматика, директно преминахме към цялостно екзомно секвениране с последващ таргетен анализ на подбрани гени. Чрез първоначалния анализ не бяха открити патологични генетични варианти в анализраните гени. Подходът, който може да приложим в тази ситуация е или да преминем към молекулярно-генетичен анализ, чрез който могат да се детектират големи делеции/дупликации, или да преанализираме данните от екзомното секвениране след време. В този случай избрахме да проведем преанализ на NGS данните след време. На база на извършеното преанализиране установихме наличието на хетерозиготен nonsense вариант с.376C>T, p.Gln126Ter в гена *IRF2BPL* (NM_024496) (Фигура 1).



Фигура 1: Секвенционен NGS профил на мутацията с.376C>T, p.Gln126Ter в гена *IRF2BPL* при таргетната пациентка.

Проведеният сегрегационен анализ в семейството показва, че вариантът е възникнал *de novo* при пациентката.

Мутацията с.376C>T, p.Gln126Ter е докладвана в базата данни ClinVar под номер 559610, като патогенна (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/559610/>). Освен това тя е описана за пръв път през 2018 г. при пациент от мъжки пол с клинични характеристики, които включват: двигателна регресия, фебрилна, фоточувствителна и миоклонична епилепсия на 10-годишна възраст, както и атаксия, хореоатетоза и генерализирана дистония от 15-годишна възраст (Marcogliese *et al.*, 2018).

Описаните до момента nonsense варианти по дължината на гена *IRF2BPL* (включително и вариантът с.376C>T, p.Gln126Ter) избягват механизма на nonsense-mediated decay (NMD), което означава, че се получава скъсен протеин, който може да се транслира (Tran Mau-Them *et al.*, 2019). При възникване на стоп кодон на позиция 126 се експресира белтък, в който липсват важни за нормалната му функция домени, като C3HC4 RING finger

домена. Дерегулацията на E3 убиквитин лигазите или натрупването на неразградени убиквитинирани белтъчни агрегати водят до невродегенеративни заболявания или епилептични енцефалопатии.

Базирайки се на казаното до тук и на база на стандартите и препоръките на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти (Richards *et al.*, 2015), класифицирахме генетичния вариант c.376C>T, p.Gln126Ter като патогенен.

Установяването на генетичната причина, довела до наблюдаваната клинична симптоматика при таргетната пациентка, беше изключително предизвикателство, тъй като отне години работа, докато се стигне до потвърждаване на диагнозата на молекулно ниво. С този случай демонстрирахме необходимостта от преанализране на пациентите, при които първоначалният анализ не установява генетична причина за клиничната симптоматика.

3.1.1.2. *NARS1*-свързани заболявания

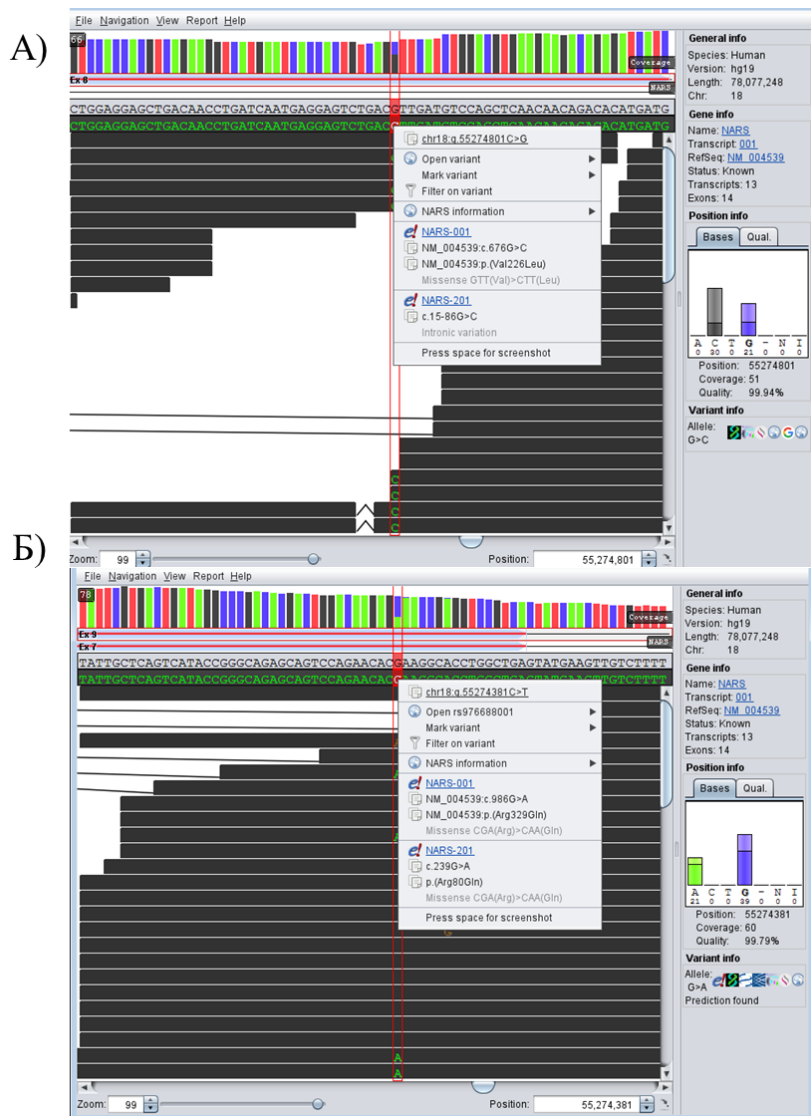
Клинична картина

Прицелният пациент е момиче на 3 години с епилепсия, микроцефалия и общо изоставане в развитието.

Молекулярно-генетичен анализ

В този случай директно преминахме към секвениране от ново поколение (цялостно екзомно секвениране), тъй като няхме ясен генетичен таргет.

На база на проведения молекулярно-генетичен анализ установихме наличието на два хетерозиготни варианта c.676G>C, p.Val226Leu и c.986G>A, p.Arg329Gln в *NARS1* гена (NM_004539) (Фигура 2).



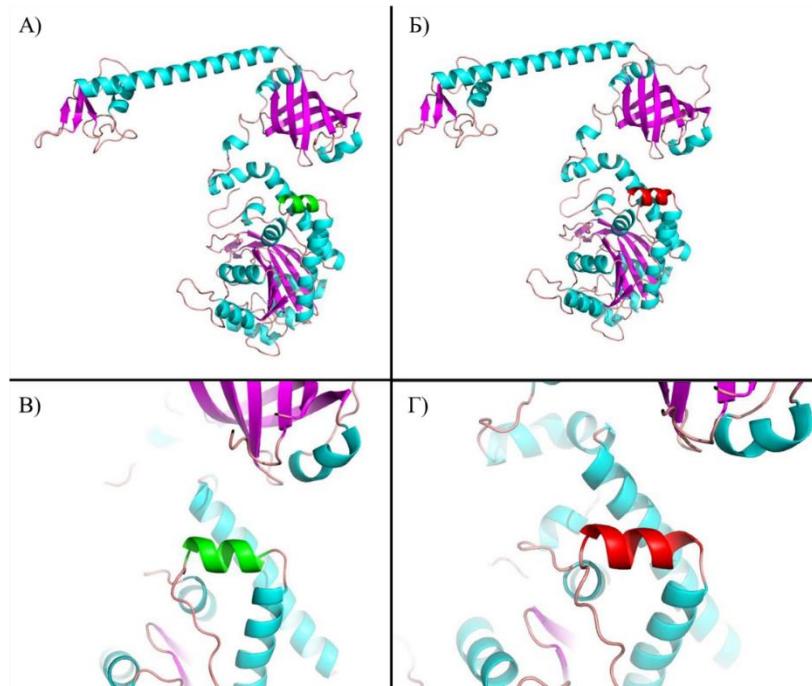
Фигура 2: Секвенционен NGS профил на генетичните варианти в *NARS1* гена. А). Секвенционен профил на варианта с.676G>C, p.Val226Leu. Б). Секвенционен профил на варианта с.986G>A, p.Arg329Gln.

За да проверим модела на унаследяване на двата генетични варианти, проведохме сегрегационен анализ в семейството, който показва, че генетичният вариант с.676G>C е унаследен от майката на пациентката, докато вариантът с.986G>A е унаследен от бащата.

Генетичните варианти с.676G>C, p.Val226Leu и с.986G>A, p.Arg329Gln не са откривани сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1), което ни дава основание да заключим, че те са с изключително ниска честота в общата популация. На база на стандартите и препоръките на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицирахме откритите в *NARS1* варианти като вероятно патогенни.

Използвайки AlphaFold2, създадохме *in silico* белтъчни модели, за да проверим дали откритите missense варианти водят до структурни изменения в протеина. Установихме, че един от тях (p.Val226Leu) води до лека промяна в протеиновата структура, посредством удължаване на алфа-спирала в резултат на включване на аминокиселина пролин на позиция

369 от полипептидната верига на белтъка, кодиран от *NARS1* гена, в структурата ѝ. В нормалния протеин тази аминокиселина не влиза в структурата на алфа-спиралата. Другият генетичен вариант p.Arg329Gln не показва структурни изменения върху белтъка, на база на *in silico* модела (Фигура 3).



Фигура 3: Протеинови модели на дивия тип и p.Val226Leu мутантната цитоплазмена аспарагинил-тРНК синтетаза. А). Див тип цитоплазмена аспарагинил-тРНК синтетаза. Б). AlphaFold2 модел на p.Val226Leu мутацията. В). Дивият тип алфа-спирала (маркирана със зелен цвят) в протеина. Г). Удълженият мотив (маркиран с червен цвят), получен в резултат на вмъкване на пролин, локализиран на позиция 369 в полипептидната верига на белтъка, кодиран от *NARS1* гена, в структурата на алфа-спиралата.

Въпреки че откритите варианти не водят до драстични промени в белтъчната структура, трябва да отбележим, че те са локализирани във високо консервативен регион на протеина. Промени, засягащи такива високо консервативни участъци най-вероятно водят до компрометиране на функцията на ензима, а именно свързването на аминокиселината аспарагин с правилната ѝ тРНК. Увредената функция на аспарагинил-тРНК синтетазата води до нарушаване на синтеза на множество белтъци в структурата, на които участва аминокиселината аспарагин.

3.1.1.3. *TPP1*-свързани заболявания

Клинична картина

Индексният пациент е на 4 години от женски пол с нормално постнатално развитие. На възраст от 3 години се наблюдават първите миоклонични епилептични пристъпи. Атаксия и регрес в развитието също са едни от водещите клинични характеристики, наблюдавани при пациентката. На база на проведена магнитно-резонансна томография се

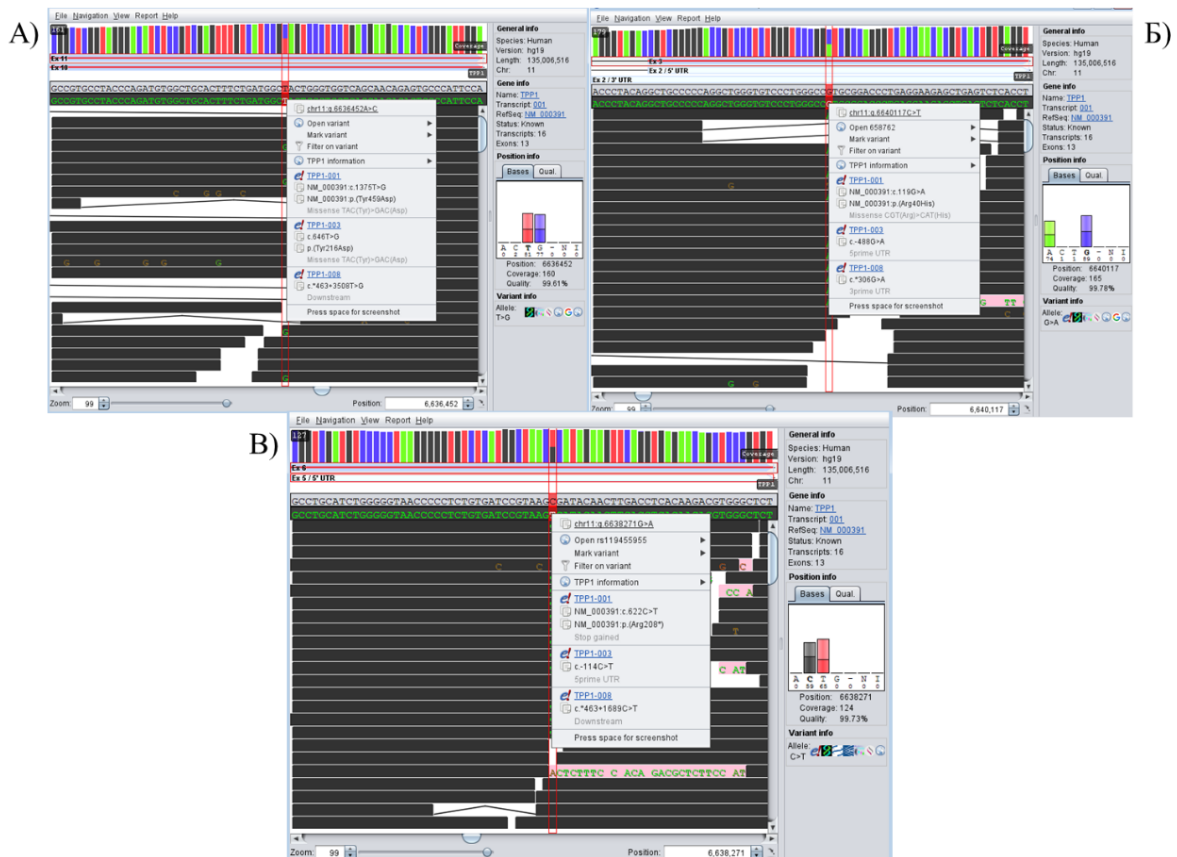
установява хидросирингомиелия на гръбначния стълб и дифузни атрофични промени в главния мозък. На 5-годишна възраст е насочена за молекулярно-генетичен анализ с цел установяване на причината, довела до тези клинични състояния.

Молекулярно-генетичен анализ

Отново поради липсата на ясен генетичен таргет секвенирането ген-по-ген не беше удачен избор за бързо и своевременно детектиране на генетичната причина, довела до наблюдаваната симптоматика при таргетната пациентка.

Поради тази причина преминахме към цялостно екзомно секвениране с таргетен анализ на гени, мутации в които са доказана причина за гореописаните клинични прояви.

На база на проведения молекулярно-генетичен анализ установихме наличието на три хетерозиготни варианта с.119G>A, р.Arg40His; с.1375T>G, р.Tyr459Asp и с.622C>T, р.Arg208Ter в *TPP1* гена (NM_000391) (Фигура 4).



Фигура 4: Секвенционен NGS профил на генетичните варианти в *TPP1* гена. А). Секвенционен профил на варианта с.1375T>G, р.Tyr459Asp. Б). Секвенционен профил на варианта с.119G>A, р.Arg40His. В). Секвенционен профил на варианта с.622C>T, р.Arg208Ter.

За да определим локализацията на откритите генетични варианти върху алелите на *TPP1* гена при таргетната пациентка, проведохме сегрегационен анализ в семейството, чрез класическо секвениране по Sanger. Получените резултати показаха, че генетичните варианти с.119G>A и с.1375T>G са локализирани на единия алел на гена (майчиния алел), а вариантът с.622C>T е локализиран на другия алел на гена (бащиния алел). В допълнение

установихме, че здравата сестра на пациентката е носител само на едноалелните варианти с.119G>А и с.1375T>G в *TPP1* гена в хетерозиготно състояние, което означава, че тя е клинично здрав носител, като своята майка.

Откритият генетичен вариант с.119G>А е достъпен в базата данни ClinVar под номер 658762, като вариант с неясно клинично значение (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/658762/>). В допълнение е откриван в контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1), като неговата популационна честота е оценена на 0.002% (няма докладвани хомозиготни носители). В съответствие със стандартите и препоръките на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицираме варианта като вариант с неясно клинично значение.

Генетичният вариант с.1375T>G, р.Tyr459Asp в *TPP1* гена не е откриван в контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1), което показва, че е с много ниска честота в общата популация. Вариантът с.1375T>G не е съобщаван преди в асоциация с *TPP1*-свързани заболявания, въпреки това на същата аминокиселинна позиция е откриван вероятно патогенен вариант с.1376A>С, р.Tyr459Ser при пациенти с Невронална цероидна липофусциноза 2 (Sheth *et al.*, 2018; Angural *et al.*, 2021). В съответствие със стандартите и препоръките на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицираме открития от нас вариант с.1375T>G като вероятно патогенен.

Nonsense вариантът с.622C>Т, р.Arg208Ter в *TPP1* гена е един от най-честите генетични дефекти при пациентите с Невронална цероидна липофусциноза 2 (Gardner *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2021). Вариантът с.622C>Т е откриван сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1), като неговата популационна честота е оценена на 0.03% (няма докладвани хомозиготни носители). Вариантът е съобщаван в базата данни ClinVar под номер 2643, като патогенен (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/2643/>). Базирайки се на стандартите и препоръките на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицираме варианта с.622C>Т като вероятно патогенен.

Описаните генетични варианти най-вероятно компрометират функцията на ензима трипептидил-пептидаза I, която е лизозомна екзопептидаза, отстраняваща последователно трипептидите от N краищата на полипептидите (субстратите).

Потвърждаването на диагнозата беше от изключително значение, тъй като това позволи да се проведе терапия при засегнатото дете. При пациентите с Невронална цероидна липофусциноза 2, дължаща се на патогенни варианти в *TPP1* гена, се прилага ензим-заместителна терапия, която доставя TPP1 директно в мозъка (Mole *et al.*, 2021).

3.1.1.4. ARG1-свързани заболявания

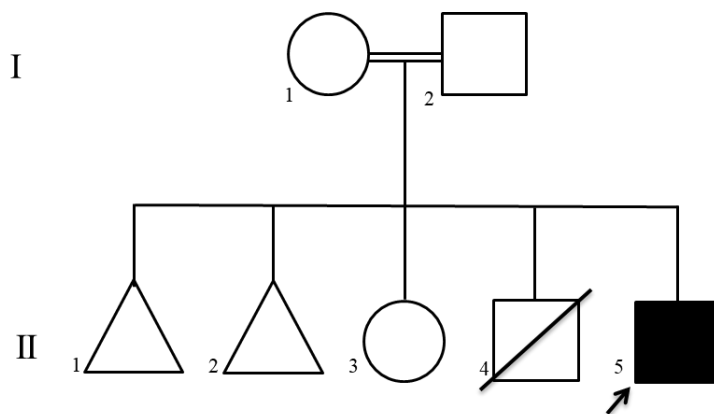
В тази група заболявания попадат два клинични случая на пациенти с аргиназен дефицит.

Клинична картина на случай 1

Момче на 14 години (към момента на генетичното изследване) от ромски произход, родено от пета нормално протекла бременност. Регрес в развитието се наблюдава от 9-месечна възраст. На 20-месечна възраст е диагностициран с епилепсия. Проведеният метаболитен скрининг показва високи нива на оротова киселина и урацил в урината, както и

повишени нива на аргинин и амоняк в кръвта. Всички тези изменения дават индикация за дефект в урейния цикъл и по конкретно аргиназен дефицит.

Фамилната история включва близкородствен брак (родителите са трети братовчеди), майката има два спонтанни аборта и едно починало дете на 9 месеца (след хоспитализация поради повръщане, диария и епилептичен статус в хода на инфекция). Семейството имат и едно незасегнато момиче (Фигура 5).

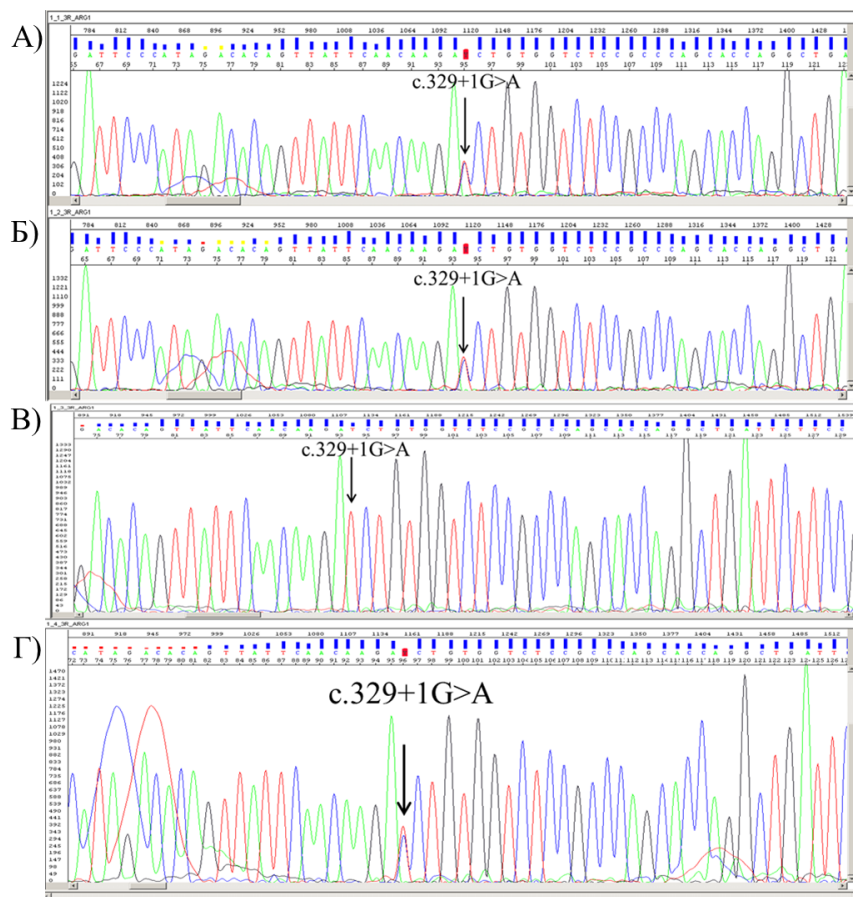


Фигура 5: Родословно дърво на семейството с предполагаема диагноза аргиназен дефицит.

Молекулярно-генетичен анализ

На база на установените метаболитни отклонения и клинични характеристики на тергетния пациент, съответстващи на диагноза аргиназен дефицит, директно преминахме към секвениране по Sanger на гена *ARG1*, патогенни варианти в който са причина за аргининемия.

Проведеният молекулярно-генетичен анализ показва наличието на непубликуван хомозиготен splice site вариант c.329+1G>A в интрон 3 на *ARG1* гена (NM_001244438). Сегрегационният анализ в семейството показва, че родителите и здравата сестра на пациента са хетерозиготни носители на идентифицираната генетична находка (Фигура 6).



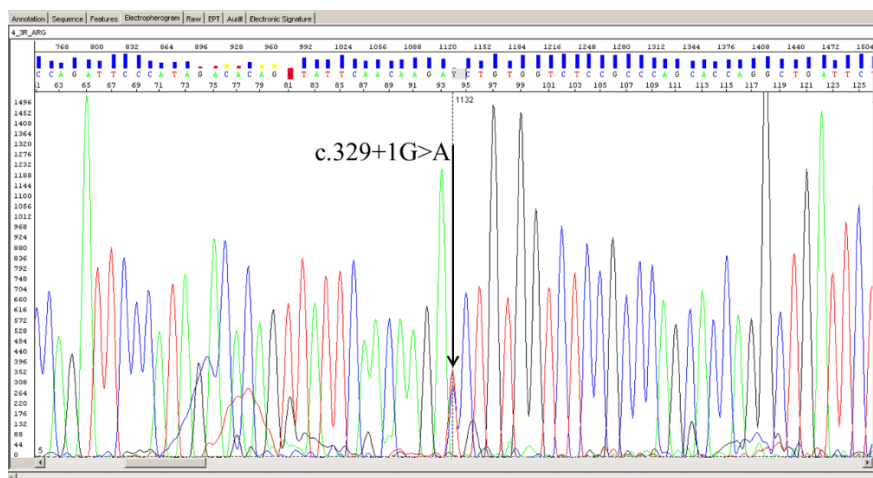
Фигура 6: Секвенционен профил на варианта c.329+1G>A в гена *ARG1*. А). Секвенционен профил на майката, хетерозиготен носител на варианта. Б). Секвенционен профил на бащата, хетерозиготен носител на варианта. В). Секвенционен профил на пациента, хомозиготен носител на варианта. Г). Секвенционен профил на здравата сестра, хетерозиготен носител на варианта c.329+1G>A в гена *ARG1*.

Генетичният вариант c.329+1G>A в гена *ARG1* не е откриван сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1). Освен това той най-вероятно води до нарушаване на правилния екзонен сплайсинг, което се потвърждава и с теоретичен *in silico* предиктор Human Splicing Finder v3.0 (Desmet *et al.*, 2009). Jain-Ghai *et al.*, 2011, предполагат, че наличието на nonsense, splice site или frameshift мутации водят до неонатална изява на заболяването, докато missense вариантите се асоциират с класическа форма на заболяването с по-късно начало (Jain-Ghai *et al.*, 2011). Познавайки се на казаното до тук и съгласно критериите на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицираме окрития генетичен вариант c.329+1G>A като патогенен.

В хода на медико-генетичната консултация със семейството, установихме че таргетният пациент е роден в резултат на близкородствен брак. Тъй като честотата на изява на рецесивните заболявания се повишава при близкородствени бракове предположихме, че е възможно наличието на ендемичен регион за заболяването аргиназен дефицит при роми от региона на с.Осиковица, Община Правец, Софийска област, от където е и нашият индексен пациент. За да проверим тази хипотеза проведохме селективен мутационен скрининг за генетичния вариант c.329+1G>A в *ARG1* гена при 100 новородени от ромски произход от региона на с.Осиковица. За да сравним и обобщим получените резултати

изследвахме и 100 контролни проби на новородени от ромски произход от цялата страна за тергетния генетичен вариант. За целта на мутационния скрининг използвахме филтърни бланки на новородени от дадения географски регион и контролни проби от цялата страна. Подборът на пробите от предполагаемия ендемичен регион се осъществи на база на информация, касаеща етническа принадлежност (ромски произход) и място на раждане (региона на с.Осиковица). Контролните проби от цялата страна бяха подбрани на база на етнически произход.

В резултат на проведените молекулярно-генетични изследвания установихме хетерозиготно носителство на варианта с.329+1G>A при една от изследваните проби от таргетния ендемичен регион (региона на с.Осиковица), което отговаря на честота на носителство 1% (1/100) (Фигура 7). Хетерозиготната проба е от с.Джурово, което се намира на 4 км. от с.Осиковица.



Фигура 7: Секвенционен профил на таргетния генетичен вариант с.329+1G>A в *ARG1* гена, доказан при 1 от изследваните 100 проби от региона на с.Осиковица.

Тъй като всеки ген има 2 алела, следователно бяха анализирани и двата алела на *ARG1* гена за всяка от 100-те проби, което означава, че общо бяха анализирани 200 алела. Проведените молекулярно-генетични изследвания показаха честота на мутантния алел в нашата извадка 1:200 (0.5%).

Проведеният мутационен скрининг върху 100 проби от ромски произход от цялата страна не показва носителство на генетичния вариант с.329+1G>A в *ARG1* гена в други региони на България.

Базирайки се на получените резултати доказахме висока честота на носителство на генетичния вариант с.329+1G>A при роми от региона на с.Осиковица спрямо цялата страна. Това ни дава основание да обособим таргетния географски регион като ендемичен за заболяването аргиназен дефицит.

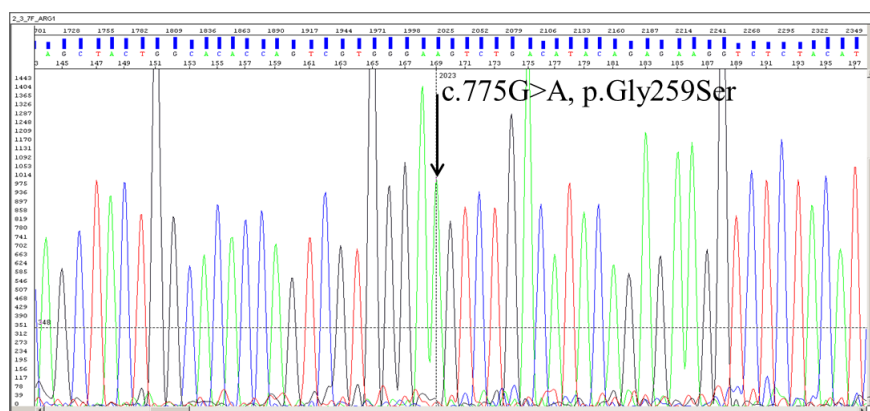
Клинична картина на случай 2

Индексният пациент е момче на 20 години (към момента на генетичното изследване), родено от нормално протекла бременност с нормално ранно моторно и нервно-психическо развитие. На 2-годишна възраст започва да ходи на пръсти, установява се спастична квадрипареза. Когнитивният спад започва да става очевиден на 7-годишна възраст. На 14-

годишна възраст се наблюдава дизартрия. Година по-късно се проявяват и генерализирани тонично-клонични гърчове. На 20-годишна възраст при пациента манифестира спастична квадрипареза, псевдобулбарна дисфагия и дизартрия, нистагъм, атаксия, сколиоза и хипотрофии в дисталните части на четирите крайника. Проведените метаболитни изследвания установиха високи нива на аргинин в кръвта и повишени нива на оротова киселина и урацил в урината, съответстващи на диагнозата аргиназен дефицит.

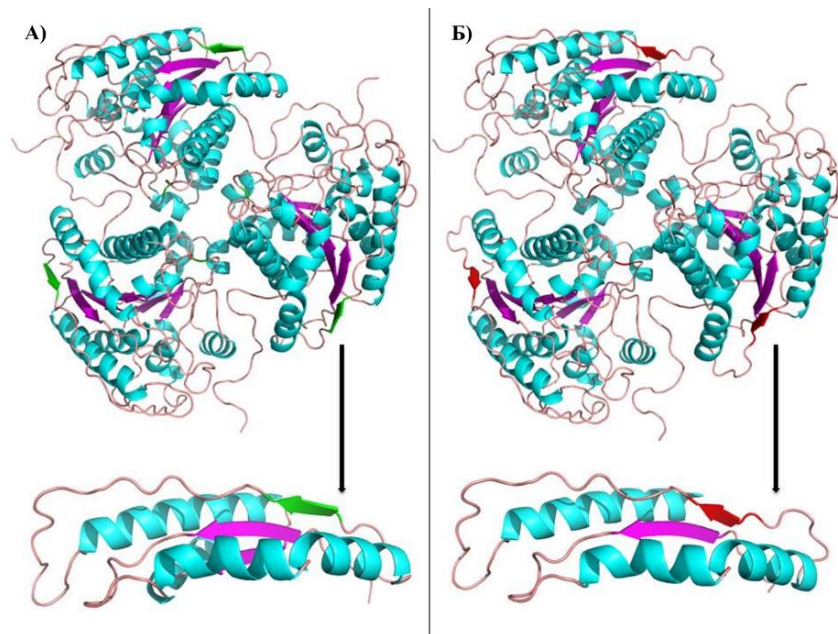
Молекулярно-генетичен анализ

Таргетно секвениране по Sanger на *ARG1* гена беше проведено върху ДНК материал от индексния пациент, предоставен от Национална Генетична Лаборатория. Молекулярно-генетичният анализ показва наличие на хомозиготен missense вариант с.775G>A, p.Gly259Ser в екзон 7 на *ARG1* гена (NM_001244438) (Фигура 8).



Фигура 8: Секвенционен профил на варианта с.775G>A, p.Gly259Ser в *ARG1* гена.

Вариантът с.775G>A не е откриван сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1). Elsayed *et al.*, 2020 смятат, че missense варианти в консервативните региони (екзони 1, 4 и 7) на *ARG1* гена може да имат влияние върху каталитичната активност на ензима, което определя вариантите, локализирани в тези региони на гена като вероятно патогенни (Elsayed *et al.*, 2020). Генерирахме *in silico* протеинов модел, използвайки AlphaFold2, който показва, че откритата генетична находка най-вероятно води до промяна в структурата на протеина. В нативния протеин един от β -листове е изграден от четири аминокиселини Asp54, Val55, Lys56 и Asp57, докато в мутантния протеин този β -лист вече е съставен само от 3 аминокиселини Val55, Lys56 и Asp57 (Фигура 9).



Фигура 9: *In silico* протеинов модел на ензима аргиназа-1. А) Див тип протеин. Нормалният β -лист, който включва аминокиселини Asp54, Val55, Lys56 и Asp57 е маркиран със зелен цвят на фигурата. Б) Мутантен протеин. С червен цвят на фигурата е маркиран β -листа, в който се включват аминокиселините Val55, Lys56 и Asp57.

Аминокиселината Asp54 все още е част от полипептидната верига на протеина, но вече не участва в изграждането на β -листа. На база на структурните промени в белтъка и поради това, че missense варианти в региона, в който попада и нашата генетична находка, са най-вероятно патогенни, може да заключим че е възможно замяната с.775G>A да доведе до нарушена функция на ензима аргиназа-1 и съответно до наблюдаваните клинични характеристики при таргетния ни пациент. Съгласно критериите на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицираме открития генетичен вариант с.775G>A като вероятно патогенен.

Увредената функция на аргиназа-1, която катализира превръщането на аргинин в урея и орнитин, нарушава нормалното образуване на урея в резултат на което излишният азот се натрупва в кръвта под формата на амоняк. Високите нива на амоняк и аргинин водят до тежка неврологична симптоматика, каквато се наблюдава и при нашите пациенти.

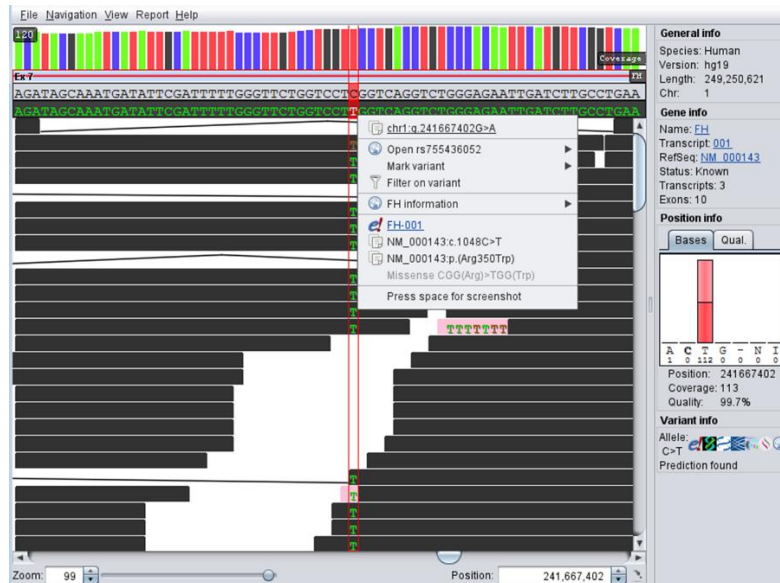
3.1.1.5. FH-свързани заболявания

Клинична картина

Момиче на 8 години с микроцефалия, интелектуален дефицит, изоставане в развитието, тежка хипотония и епилептични пристъпи, които се проявяват на 7-годишна възраст, беше насочено за молекулярно-генетичен анализ с цел изясняване на генетичната причина, довела до наблюдаваните клинични прояви.

Молекулярно-генетичен анализ

В конкретния случай избрахме цялостно екзомно секвениране с анализ на таргетни гени, мутации в които могат да бъдат причина за наблюдаваната фенотипна изява. Проведеният молекулярно-генетичен анализ показва наличието на хомозиготен missense вариант с.1048C>T, p.Arg350Trp в *FH* гена (NM_000143) (Фигура 10).



Фигура 10: Секвенционен NGS профил на генетичния вариант с.1048C>T, p.Arg350Trp в *FH* гена.

Сегрегационният анализ в семейството показва, че родителите на пациентката са хетерозиготни носители на идентифицираната генетична находка.

Патогенни варианти по дължината на *FH* гена са доказана причина за фумаразен дефицит. Тъй като фумаразният дефицит е метаболитно заболяване с широка неврологична симптоматика, насочихме пациентката към провеждане на метаболитно изследване с цел потвърждаване на диагнозата и чрез метаболитен тест. На база на проведените изследвания се установиха повишени нива на фумарат, 2-оксоглутарат (алфа-кетоглутарат) и 4-хидроксibenзоат в урината, което потвърждава диагноза фумаразен дефицит.

Идентифицираният генетичен вариант с.1048C>T е откриван сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1), като неговата популационна честота е оценена на 0.002% (няма докладвани хомозиготни носители). Генетичната находка е описана при пациент с клинични и биохимични данни за фумаразен дефицит (Jasinge *et al.*, 2022). Интересното в случая е, че при докладвания от Jasinge *et al.*, 2022 пациент не се наблюдават епилептични гърчове. Това може да се дължи на факта, че описаният пациент е на 3-годишна възраст. Нашата таргетна пациентка също не е имала епилептични прояви до 7-годишна възраст, след това при нея се изявяват и първите епилептични пристъпи. От казаното до тук може да заключим, че генетичната находка с.1048C>T води до клинични и биохимични изменения, характерни за фумаразен дефицит, но епилептичната симптоматика най-вероятно се изявява на по-късна възраст в хода на развитие на заболяването. Съгласно препоръките на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицирахме варианта като вероятно патогенен.

3.1.1.6. *PEX1* и *PEX6*-свързани заболявания

От групата на пероксизомните заболявания ще разгледаме два клинични случая.

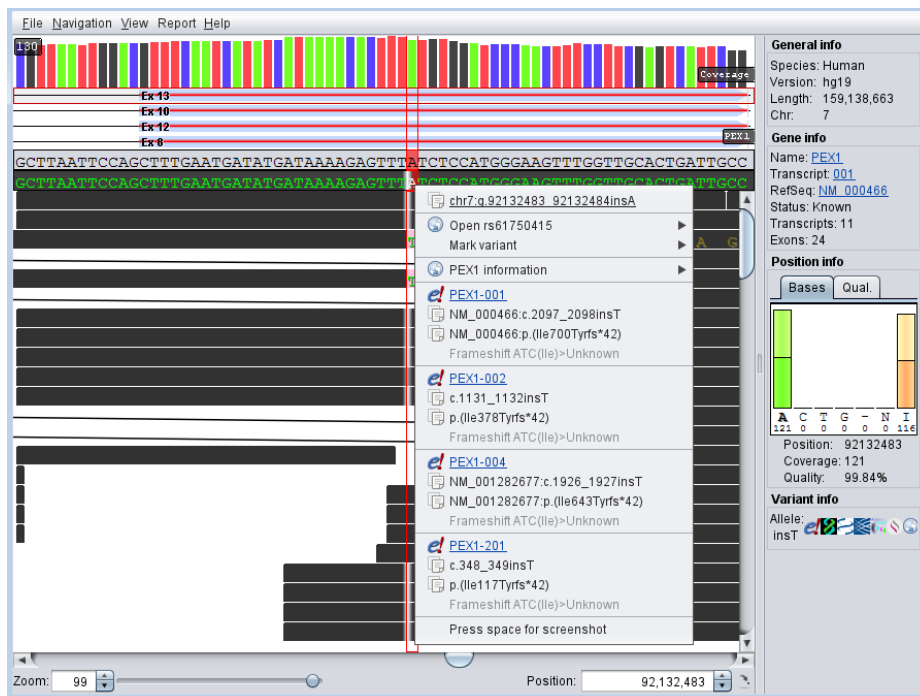
Клинична картина на случай 1

Момиче с клинични и биохимични данни за пероксизомно заболяване (*Zellweger* синдром) е насочено за молекулярно-генетичен анализ с цел иясняване на генетичната причина, довела до наблюдаваната клинична симптоматика.

Молекулярно-генетичен анализ

Избрахме да проведем клинично екзомно секвениране (~4800 гена), поради факта, че имаме ясно поставена клинична диагноза – Пероксизомно заболяване.

На база на проведения молекулярно-генетичен анализ установихме хомозиготен frameshift вариант с.2097dup, p.Ile700TyrfsTer42 в *PEX1* гена (NM_000466) (Фигура 11).



Фигура 11: Секвенционен NGS профил на генетичния вариант с.2097dup, p.Ile700TyrfsTer42 в *PEX1* гена.

Сегрегационният анализ в семейството показва, че родителите на пациентката са хетерозиготни носители на идентифицираната генетична находка, което потвърждава автозомно-рецесивния модел на унаследяване.

В хода на изработване на настоящия дисертационен труд проведохме и две пренатални диагностики в семейството по повод на идентифицирания вариант в *PEX1* гена. Единият фетус не беше носител на генетичния вариант, докато другият беше отново засегнат, хомозиготен носител на вариатна с.2097dup, p.Ile700TyrfsTer42.

Генетичният вариант е откриван сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1), като неговата популационна честота е оценена на 0.05% (няма докладвани хомозиготни носители). В допълнение мутацията е достъпна в базата данни ClinVar под номер 7519, като патогенна (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/7519/>). Откритият генетичен вариант c.2097dup, p.Leu700TyrfsTer42 е един от най-честите дефекти, засягащи *PEX1* гена. Той води до тежка фенотипна изява при засегнатите пациенти, което най-вероятно се обяснява с това, че генетичният дефект води до загуба на белтъчната функция (Collins and Gould, 1999; Crane, Maxwell and Paton, 2005) и нарушаване на нормалното сглобяване на пероксизомите. Базирайки се на казаното до тук и съгласно препоръките на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицираме варианта като патогенен.

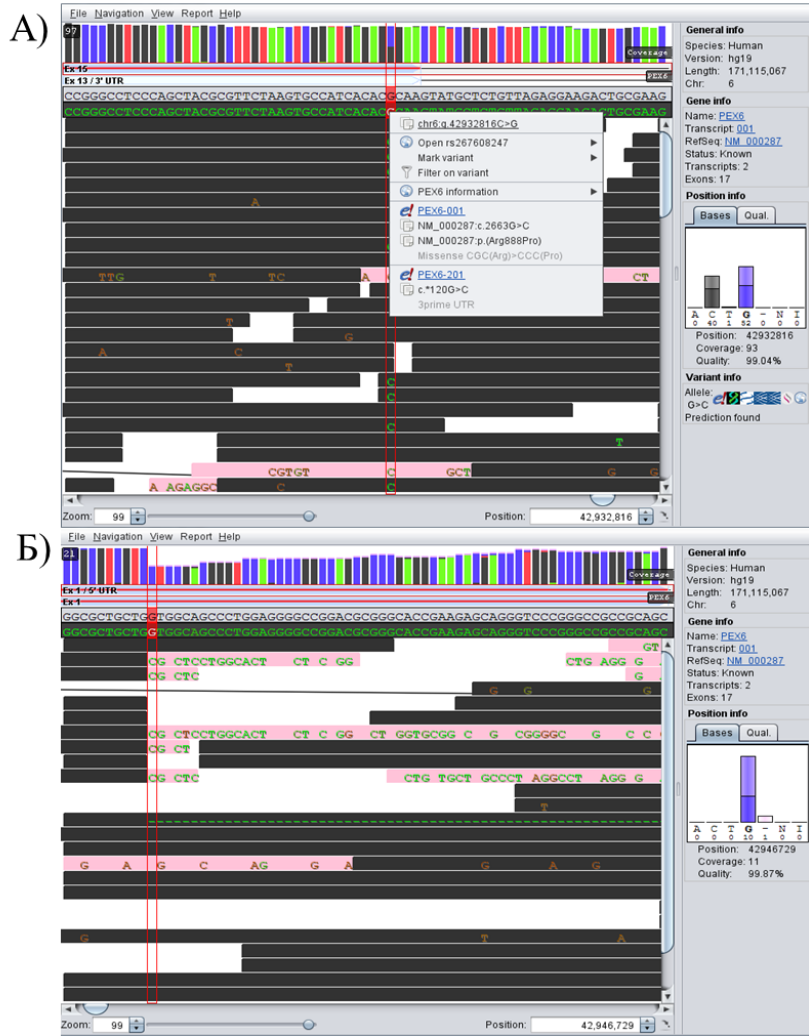
Клинична картина на случай 2

Вторият случай отново беше момиче с клинични и биохимични данни за пероксизомно заболяване (Zellweger синдром).

Молекулярно-генетичен анализ

Молекулярно-генетичната диагностика на заболяването отново беше насочена към провеждане на клинично екзомно секвениране, тъй като имахме ясна диагноза, дължаща се на голям брой гени, които са известни.

Проведените генетични изследвания показаха наличието на два хетерозиготни варианта c.2663G>C, p.Arg888Pro и c.160_243del, p.Val54_Leu81del в *PEX6* гена (NM_000287) (Фигура 12).



Фигура 12: Секвенционен NGS профил на *PEX6* мутациите при таргетната пациентка. А). Секвенционен профил на варианта *c.2663G>C, p.Arg888Pro*. Б). Секвенционен профил на варианта *c.160_243del, p.Val54_Leu81del*.

В хода на анализирани на данните от клиничното екзомно секвениране впечатление прави това, че генетичният вариант *c.160_243del, p.Val54_Leu81del* не е добре покрит и на практика можеше да бъде пропуснат (Фигура 12 Б). Тъй като имахме ясна генетична диагноза и наличието на един патологичен вариант *c.2663G>C, p.Arg888Pro* в ген, който би могъл да обясни наблюдаваната клинична симптоматика при пациентката, преминахме към по-задълбочен анализ, чрез който уснатовихме наличието и на втория вариант *c.160_243del*. След това преминахме към верификация на откритите генетични находки и сегрегационен анализ в семейството, използвайки класическо секвениране по Sanger. Молекулярно-генетичният анализ потвърди наличието на вариантите *c.2663G>C, p.Arg888Pro* и *c.160_243del, p.Val54_Leu81del* при таргетната пациентка. Сегрегационният анализ установи, че вариантът *c.160_243del* е унаследен от майката на пациентката, докато вариантът *c.2663G>C* е унаследен от бащата, което отговаря на автозомно-рецесивен модел на унаследяване.

В хода на изработване на настоящия дисертационен труд проведохме и пренатална диагностика в семейството по повод на идентифицираните варианти в *PEX6* гена. Молекулярно-генетичният анализ показва, че фетусът не е носител на фамилен генетичен вариант с.2663G>C, p.Arg888Pro и с.160_243del, p.Val54_Leu81del.

Идентифицираният генетичен вариант с.2663G>C в *PEX6* гена не е откриван в контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1). Той може да се проследи като патогенен в базата данни LOVD (<https://databases.lovd.nl/shared/variants/0000640194#00015987>). Генетичната находка е докладвана преди от Ebberink *et al.*, 2010 при пациент със заболяване от спектъра на Zellweger (Ebberink *et al.*, 2010). Съгласно препоръките на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицираме откритата генетична находка с.2663G>C като вероятно патогенна.

Другият генетичен вариант с.160_243del в *PEX6* гена също не е откриван сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1). В резултат на възникване на този генетичен вариант отпадат 28 аминокиселини от аминокиселинната последователност, кодирана от *PEX6* гена. Макар че същата in-frame делеция не е откривана при пациенти с подобна клинична симптоматика, много други missense варианти и in-frame делеции в този регион на гена са съобщавани като патогенни (напр.: p.Leu57Pro, p.Val92_Arg93del). Базирайки се на казаното до тук и съгласно критериите на ACMG/AMP, класифицираме варианта като вероятно патогенен.

Увредената функция на белтъците, кодирани от *PEX1* и *PEX6* гените, води до нарушение в сглобяването на пероксизомите и до тяхната дисфункция.

С представените случаи от групата на неврологични заболявания с гърчова симптоматика, демонстрирахме предизвикателствата при диагностицирането им. Все по трудно може да се осъществи таргетно анализиране на конкретен ген, тъй като с напредването на молекулярно-генетичната диагностика се установиха редица гени, мутации в които могат да водят до заболявания с припокриващи се клинични характеристики. Нагледно демонстрирахме и това, че при наличие на ясен генетичен дефект директно може да се премине към таргетен анализ (секвениране по Sanger) с цел определяне на носителския статус при родственици на засегнатите пациенти.

3.1.2. Невромускулни заболявания

3.1.2.1. МУН7–свързани заболявания

От групата на МУН7–свързаните заболявания ще разгледаме два клинични случая.

Клинична картина на случай 1

Индексният пациент е момче с нормално постнатално развитие. На възраст от 11 месеца е диагностициран с дилатативна кардиомиопатия. Установява се и лека генерализирана мускулна хипотония, но без видима мускулна слабост. От фамилната история има данни за мускулна дистрофия, диагностицирана на 6-годишна възраст при бащата на пациента, като клиничните му симптоми се манифестират на 1-годишна възраст,

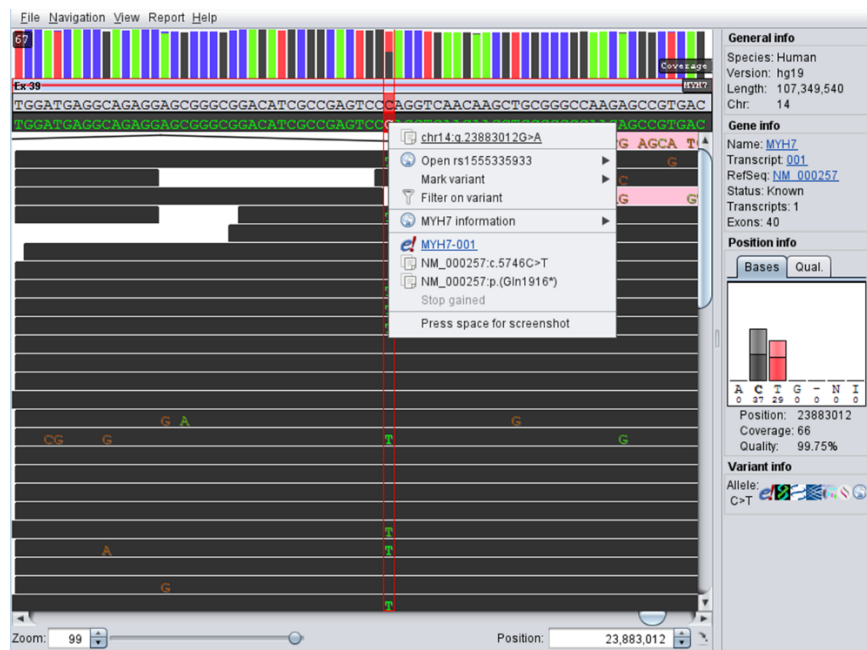
когато прохода с клатушкаща походка. Заболяването при него прогресира много бавно до 34-годишна възраст, когато започват оплаквания, свързани с умора и диспнея. В допълнение ехокардиографията показва тежка дилатативна кардиомиопатия.

Таргетният пациент загива на възраст 2 години и 4 месеца в резултат на сърдечна недостатъчност. Бащата на пациента също загива преди 40-годишна възраст в резултат на сърдечна недостатъчност.

Молекулярно-генетичен анализ

Предварително проведени молекулярно-генетични изследвания на таргетни гени (*DMD*, *LMNA* и *EMD*), свързани с диагнози мускулна дистрофия Дюшен/Бекер и мускулна дистрофия Emery-Dreifuss, не показаха патологични генетични варианти, които могат да обяснят наблюдаваната клинична симптоматика при таргетния пациент и неговия баща. Това даде индикация, че секвенирането ген-по-ген не би било подходящ метод за бърза и своевременна генетична диагностика. Поради тази причина преминахме към секвениране от ново поколение и по-конкретно клинично екзомно секвениране при таргетния пациент.

На база на проведения молекулярно-генетичен анализ установихме наличието на непубликуван хетерозиготен nonsense вариант с.5746C>T, p.Gln1916Ter в *MYH7* гена (NM_000257) (Фигура 13).



Фигура 13: Секвенционен NGS профил на генетичния вариант с.5746C>T, p.Gln1916Ter в *MYH7* гена при таргетния пациент.

Проведеният сегрегационен анализ чрез класическо секвениране по Sanger показва, че вариантът е унаследен от бащата на пациента.

Генетичният вариант с.5746C>T, p.Gln1916Ter не е откриван сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1). За да потвърдим вероятната патогенност на варианта, разгледахме и обсъдихме дали механизмът за разграждане на иРНК-и, които съдържат предварително възникнали стоп кодони (NMD), би действал в конкретния случай.

Предвид това, че откритият от нас генетичен вариант с.5746C>T е локализиран в последните 50-55 нуклеотида на предпоследния екзон на *MYH7* гена, най-вероятно получените иРНК, които носят варианта избягват NMD. Това би довело до синтез на скъсен протеин, който най-вероятно има нарушена функция, в резултат на което се проявяват клиничните характеристики, наблюдавани при таргетния пациент и неговия баща. Тази теория се потвърждава и от Aguib *et al.*, 2021, които доказват, че някои иРНК на *MYH7* с предварително възникнал стоп кодон, локализиран в последния екзон на гена, избягват механизма на NMD (Aguib *et al.*, 2021). Описаният от тях генетичен дефект води до белтък, който е само с 4 аминокиселини по-къс от дивия тип белтък. В нашия случай белтъкът, който се получава е с 19 аминокиселини по-къс (Фигура 14) от нормалния протеин. Именно на това може и да се дължи различната клинична симптоматика при нашите пациенти и описаните от Aguib *et al.*, 2021.



Фигура 14: Схематично представяне на част от аминокиселинната последователност на белтъка, кодиран от гена *MYH7* и локализацията на варианта p.Gln1916Ter. Аминокиселините, които отпадат в резултат на предварително възникналия стоп кодон са отбелязани на фигурата.

Базирайки се на казаното до тук и позовавайки се на стандартите и препоръките на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицираме варианта като вариант с неясно клинично значение.

Клинична картина на случай 2

Индесният пациент е жена на 51 години с предполагаема клинична диагноза дистална миопатия. Първите симптоми на слабост в дисталните мускули на долните крайници се проявяват на възраст от 37 години. Затруднено стъпване на пети и пръсти, съпроводено с мускулни болки и крампи в краката са първоначалните симптоми при пациентката. Няколко години по-късно започват затруднения при изкачване на стълби и изправяне от клекнало положение. В допълнение пациентката има болест на Hashimoto. На 51-годишна възраст неврологичен преглед установява мускулна слабост в долни крайници и лека дистална слабост в горните крайници. След направени допълнителни изследвания не се установява сърдечно засягане.

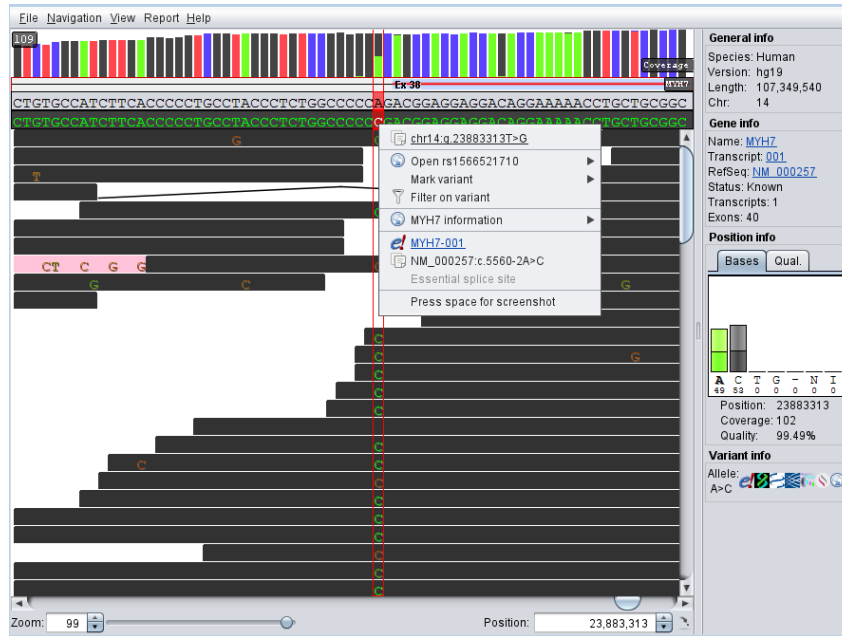
Фамилната история включва сестра с подобна клинична симптоматика, която се проявява на възраст около 49 години. Починалият баща на пациентката, както и двете му починали сестри също са имали подобни клинични оплаквания.

Молекулярно-генетичен анализ

Първоначално при индексната пациентката беше проведено секвениране по Sanger на *MYOT* гена, тъй като това беше посоченият от лекарите първи генетичен таргет и предполагаема клинична диагноза мускулна дистрофия пояс-крайник тип 1А. Молекулярно-генетичният анализ не показва патологични генетични изменения в *MYOT* гена, които да обяснят наблюдаваната клинична симптоматика. След това преминахме към

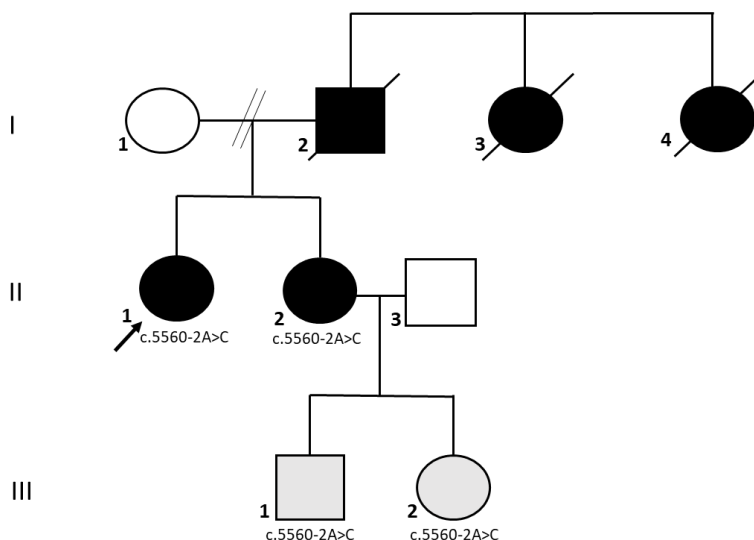
клинично екзомно секвениране с таргетен анализ на гени, мутации в които могат да доведат до наблюдаваните фенотипни характеристики.

На база на проведеното секвениране от ново поколение установихме непубликуван хетерозиготен splice site вариант c.5560-2A>C в *MYH7* гена (Фигура 15).



Фигура 15: Секвенционен NGS профил на генетичния вариант c.5560-2A>C в *MYH7* гена при таргетната пациентка.

Сегрегационният анализ в семейството показва, че засегнатата сестра на пациентката също е носител на идентифицираната генетична находка. Здравата майка на пациентката не е носител на варианта c.5560-2A>C в *MYH7* гена, което дава индикация за това, че вариантът е унаследен от бащата на пациентката, който е имал подобно клинично засягане. В хода на провеждане на сегрегационния анализ установихме, че племенниците на таргетната пациентка също са носители на идентифицираната находка (Фигура 16).



Фигура 16: Родословно дърво, показващо носителството на детектирания вариант в *MYH7* гена при таргетната пациентка и нейните родственици.

Генетичният вариант c.5560-2A>C в *MYH7* гена не е откриван сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1).

Вариантът c.5560-2A>C засяга „А“ нуклеотид от консенсусното акцепторно сплайсинг място, което най-вероятно нарушава правилния екзонен сплайсинг на екзон 38 от *MYH7* гена. Именно този екзон, кодира част от assembly competence домена (Sohn *et al.*, 1997; Bohlega *et al.*, 2004). Смята се, че неправилният екзонен сплайсинг на екзон 38 най-вероятно води до нарушено сглобяване на миозина в дебели нишки и междинно увреждане на функцията (Fiorillo *et al.*, 2016; Pajusalu *et al.*, 2016), на което може да се дължи и наблюдаваната клинична симптоматика при нашите пациенти. На база на казаното до тук и съгласно препоръките на ACMG/AMP за интерпретация на вариантите, класифицираме варианта c.5560-2A>C като вероятно патогенен.

Увреждането на белтъчния продукт на гена *MYH7*, най-вероятно води до неправилно сглобяване на миозин тип II, което нарушава нормалната му функция в мускулните клетки, а именно мускулното съкращение. В резултат на това може да настъпва както сърдечно, така и скелетно-мускулно засягане, което се наблюдава и при представените от нас пациенти.

3.1.2.2. *TWINK*–свързани заболявания

Клинична картина

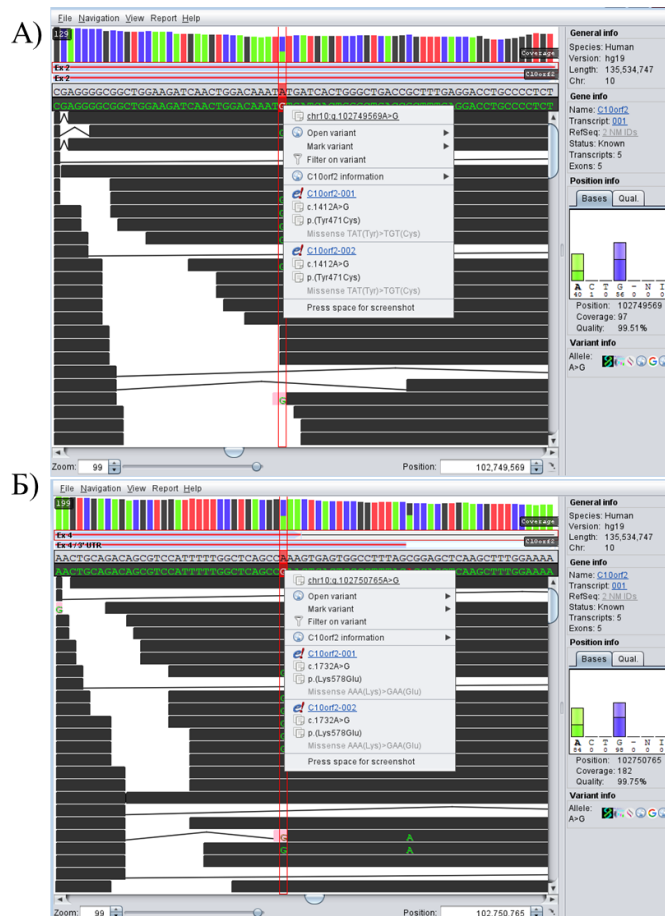
Момиче на 1 година (към момента на генетичното изследване) с изоставане в двигателното развитие, тежка мускулна хипотония, екстрапирамиден синдром и погледна парализа.

Молекулярно-генетичен анализ

На база на клиничната симптоматика при пациентката е поставена диагноза „Спинална мускулна атрофия“, която не се потвърждава от направените молекулярно-генетични изследвания за качествена и количествена оценка на *SMN1* и *SMN2* гените. В

резултат на това преминахме към секвениране от ново поколение с цел изясняване на генетичната причина, довела до наблюдаваните клинични характеристики при пациентката.

На база на извършените изследвания установихме два непубликувани, хетерозиготни missense варианта c.1412A>G, p.Tyr471Cys и c.1732A>G, p.Lys578Glu в *TWNK (C10orf2)* гена (NM_021830) (Фигура 17).



Фигура 17: Секвенционен NGS профил на вариантите c.1412A>G, p.Tyr471Cys и c.1732A>G, p.Lys578Glu в *TWNK (C10orf2)* гена. А). Секвенционен профил на варианта c.1412A>G, p.Tyr471Cys. Б). Секвенционен профил на варианта c.1732A>G, p.Lys578Glu.

За да проверим локализацията на вариантите при пациентката (дали са на един алел или на двата алела на гена), проведохме сегрегационен анализ в семейството, чрез който установихме, че генетичният вариант c.1412A>G е унаследен от майката на пациентката, докато вариантът c.1732A>G е унаследен от бащата. Това потвърждава автозомно-рецесивен модел на унаследяване.

Генетичните варианти c.1412A>G, p.Tyr471Cys и c.1732A>G, p.Lys578Glu в *TWNK* гена не са откривани сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1), което потвърждава това, че са изключително рядко срещани в общата популация.

На база на стандартите и препоръките на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицирахме откритите варианти в *TWNK* гена като вероятно патогенни.

Белтъчният продукт на *TWNK* гена е митохондриална ДНК хеликаза, която участва в репликацията на митохондриалната ДНК. Патогенни варианти в *TWNK* гена водят до нарушение в репликационния процес на мтДНК в различни клетки (напр. мускулните клетки), в резултат на което се губят копия от нея. Именно на това се дължи и наблюдаваната клинична симптоматика при *TWNK*-свързаните заболявания към които попада и описаният от нас случай.

3.1.2.3. *UNC80*-свързани заболявания

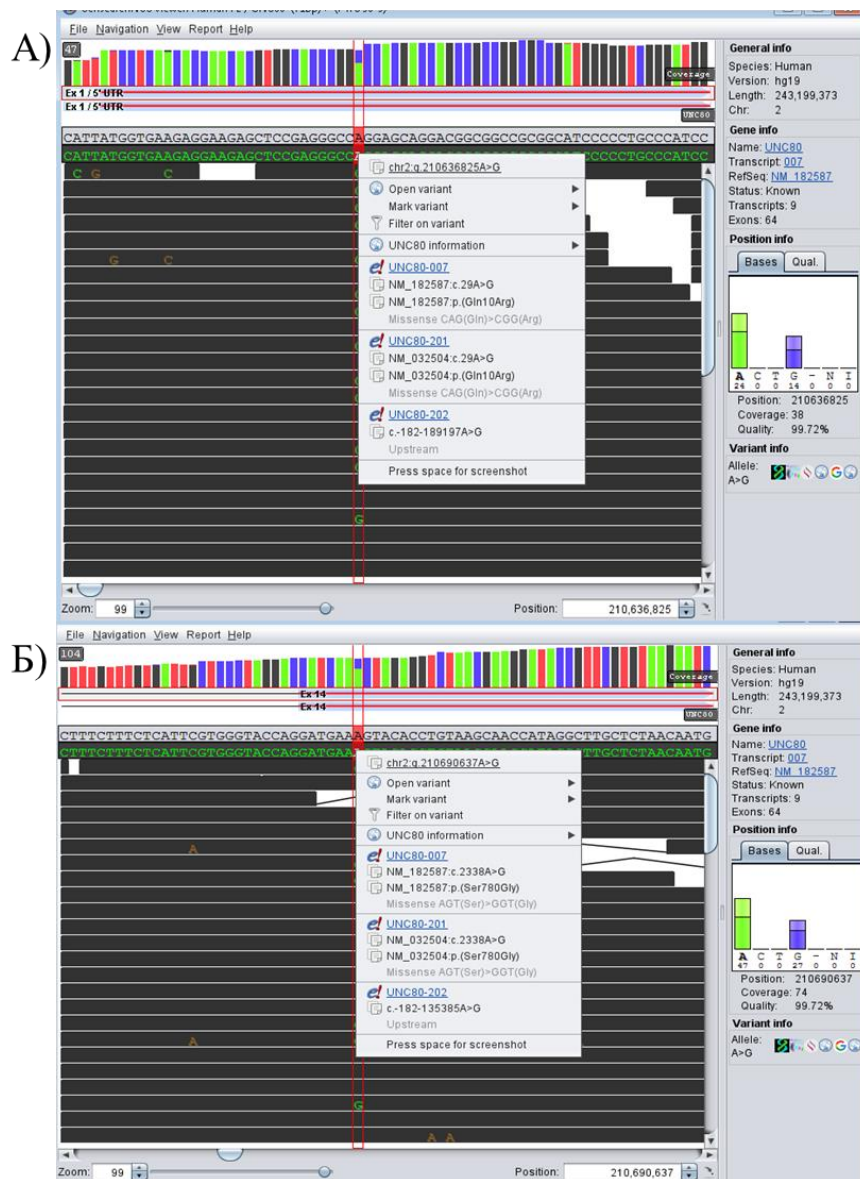
Клинична картина

Индексният пациент е момче на 2 години (към момента на генетичното изследване). След раждането е имал затруднени сукателни рефлексии, не е задържал главата си до 6-месечна възраст. Седи стабилно, но не може да седне сам, не се изправя сам и не ходи. При пациента се наблюдават и лицеви малформации – обърнати надолу устни ъгли, къс нос, ретрогнатия, изпъкнало чело и големи ушни миди. При пациента има данни за интелектуален дефицит.

Молекулярно-генетичен анализ

Първоначално поставената диагноза при пациента беше синдром на Prader-Willi. Проведените молекулярно-генетични изследвания не потвърдиха тази диагноза. Като следваща стъпка предприехме провеждането на цялостно екзомно секвениране с цел генетично верифициране на диагнозата.

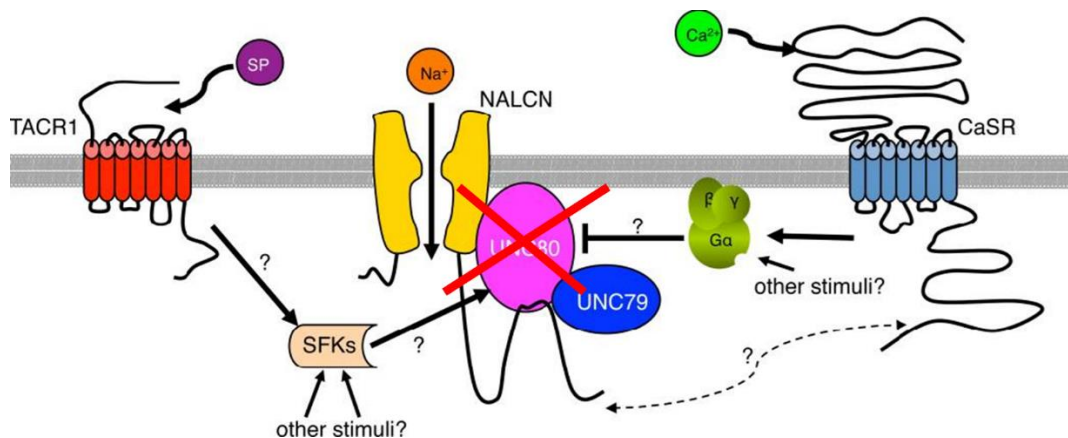
На база на проведените изследвания открихме два хетерозиготни непубликувани варианта с.29A>G, p.Gln10Arg и с.2338A>G, p.Ser780Gly в *UNC80* гена (NM_032504) (Фигура 18).



Фигура 18: Секвенционен NGS профил на вариантите c.29A>G, p.Gln10Arg и c.2338A>G, p.Ser780Gly в *UNC80* гена. А). Секвенционен профил на варианта c.29A>G, p.Gln10Arg. Б). Секвенционен профил на варианта c.2338A>G, p.Ser780Gly.

Сегрегационният анализ в семейството показва, че вариантът c.29A>G е унаследен от майката на пациента, докато вариантът c.2338A>G е унаследен от бащата. Здравата сестра на пациента не е носителка на нито една от идентифицираните генетични находки.

Идентифицираните генетични варианти не са откривани сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1). Липсата на *UNC80* белтък или експресията на такъв с увредена структура и/или функция най-вероятно се отразява върху стабилността и функционалността на *NALCN* каналния комплекс (Фигура 19), който се експресира основно в централната нервна система и е отговорен за пропускливостта на натриевия канал по отношение Na^+ в покой и контролира невронната възбудимост.



Фигура 19: NALCN канален комплекс. Нарушената функция на UNC80 най-вероятно води до дестабилизиране и неправилно функциониране на NALCN каналния комплекс (Ren, 2011 с модификации).

Откритите генетични варианти обогатява познанията за генетичния фонд на българската популация. Получените резултати, показват необходимостта от задълбочен анализ на пациентите с тежка инфантилна хипотония, психомоторно изоставане и специфични лицеви характеристики с цел търсене на генетични варианти в *UNC80* гена.

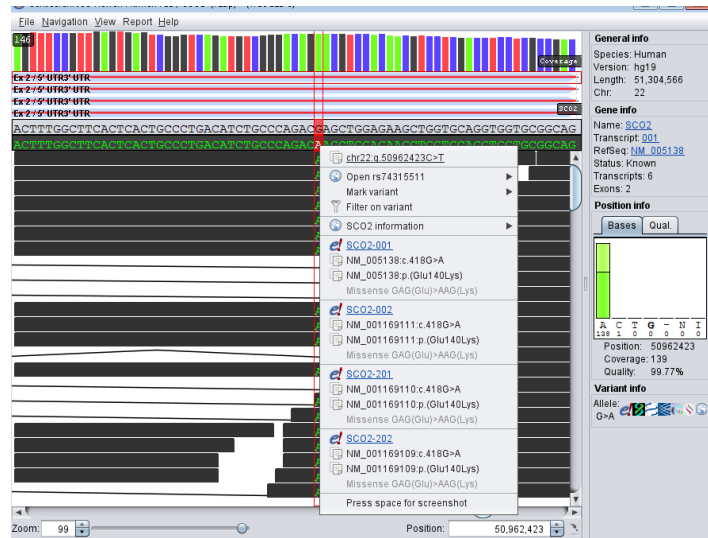
3.1.2.4. *SCO2*-свързани заболявания

Клинична картина

Индексният пациент е момче на 10 месеца (към момента на генетичното изследване) с регрес в нервно-психическото развитие от 5-месечна възраст. Установен е повишен мускулен тонус, тремор на главата и хиперексплексия. Наблюдава се и гърчова симптоматика и повишени стойности на лактат. Абнормна ехокардиография – нарастване на мускулната маса на лява камера.

Молекулярно-генетичен анализ

Отново преминахме към цялостно екзомно секвениране поради липса на ясен генетичен таргет за анализ. На база на проведените молекулярно-генетични изследвания установихме наличието на хомозиготен missense вариант c.418G>A, p.Glu140Lys в *SCO2* гена (NM_001169111) (Фигура 20).



Фигура 20: Секвенционен NGS профил на варианта с.418G>A в *SCO2* гена при таргетния пациент.

Сегрегационният анализ в семейството показва, че вариантът е унаследен от здравите родители, които са хетерозиготни носители.

Генетичният вариант е откриван сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1), като неговата популационна честота е оценена на 0.009% (няма докладвани хомозиготни носители). В допълнение той е достъпен в базата данни ClinVar под номер 5681, като патогенен (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/5681/>).

Missense вариантът p.Glu140Lys е локализиран в $\alpha 1$ спиралата на протеина *SCO2*. Счита се, че p.Glu140Lys води до разрушаване на солевия мост, в резултат на което следват множество структурни промени в протеина, които най-вероятно засягат мед-свързващите свойства на цистеина (локализиран в позиция 137) и по този начин може да се доведе до промени в протеиновата стабилност (Verdijk *et al.*, 2008). Полученият абнормален или нефункционален белтък води до нарушено сглобяване на цитохром-с-оксидазата и до наблюдаваните клинични състояния, характерни за *SCO2*-свързаните заболявания.

На база на казаното до тук и съгласно критериите и препоръките на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицираме варианта с.418G>A, p.Glu140Lys като патогенен.

С представените генетично верифицирани невромускулни заболявания демонстрирахме необходимостта от провеждане на молекулярно-генетични изследвания с цел семейно планиране.

3.2. Офталмологични заболявания

В рамките на настоящия дисертационен труд бяха изследвани 7 таргетни пациента с офталмологични заболявания и 7 родственика. При 4-ма от пациентите (57%) установихме генетичната причина за наблюдаваната клинична симптоматика. В таблица 4 са представени всички генетично верифицирани пациенти с офталмологични заболявания, които бяха обект на настоящото проучване.

Таблица 4: Молекулярно-генетични данни на пациенти с офталмологични заболявания, обект на настоящата дисертация.

Номер	Пол	Изследвани родственици	Засегнат ген	Установен генетичен вариант	Зиготност	Тип на генетичния вариант	Унаследен от	Използван анализ при таргетния пациент
1	мъжки	двама родители	<i>CRB1</i>	c.2708_2709del, p.His903LeufsTer5	хетерозигот	frameshift	майка	NGS
				c.3878G>A, p.Trp1293Ter	хетерозигот	nonsense	баща	
2	мъжки	двама родители	<i>CEP290</i>	c.4882C>T, p.Gln1628Ter	хетерозигот	nonsense	майка	NGS / секвениране по Sanger
				c.2991+1655A>G	хетерозигот	дълбоко интронен	баща	
3	мъжки	незасегнато дете	<i>USH2A</i>	c.2310dup, p.Glu771ArgfsTer8	хетерозигот	frameshift	/	NGS
				c.11864G>A, p.Trp3955Ter	хетерозигот	nonsense		
4	мъжки	майка и незасегнат брат	<i>MT-TP</i>	m.15988A>G	висока степен на хетероплазмия	нуклеотидна промяна в tRNA	майка	Секвениране по Sanger

Чрез секвениране от ново поколение изяснихме генетична причина при 3-ма от изследваните таргетни пациенти. При тях използвахме и секвениране по Sanger с цел потвърждаване на всички открити генетични находки от NGS, както и сегрегационен анализ в семействата. Класическото секвениране по Sanger беше основен метод за анализ при 1 от пациентите, както и при незасегнатите родственици от семейството му.

3.2.1. *CRB1*-свързани заболявания

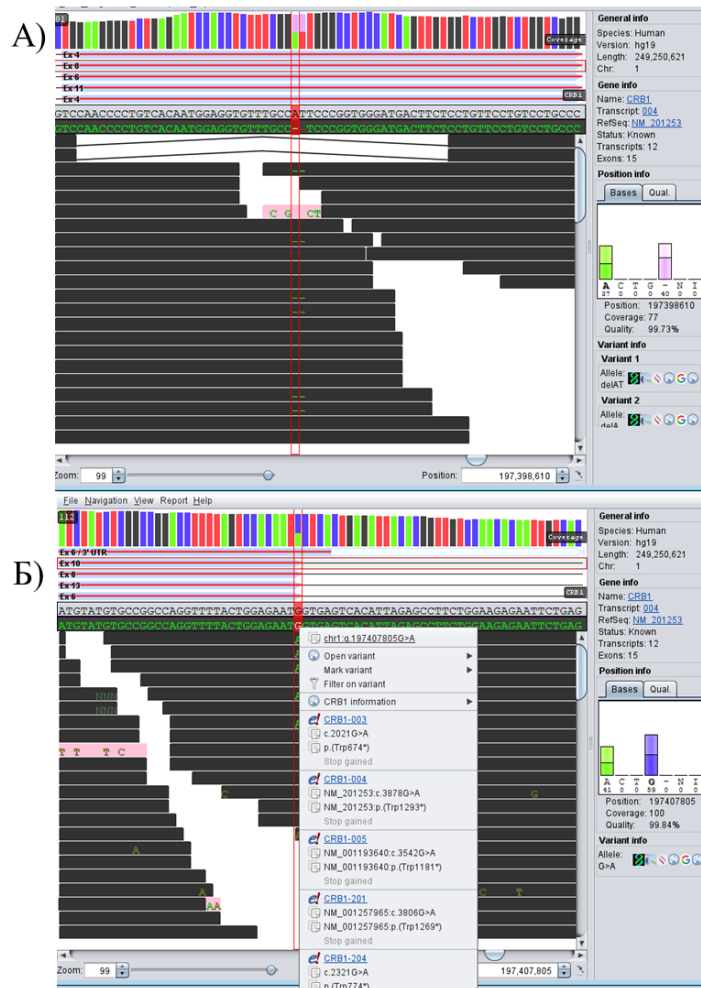
Клинична картина

Таргетният пациент е на 17 години (към момента на генетичното изследване) с клинична диагноза Retinitis pigmentosa (Cone-rod дистрофия).

Молекулярно-генетичен анализ

Пациентът беше насочен за молекулярно-генетичен анализ (цялостно екзомно секвениране) с цел генетично верифициране на диагнозата.

На база на проведения молекулярно-генетичен анализ установихме наличието на два хетерозиготни варианта c.2708_2709del, p.His903LeufsTer5 и c.3878G>A, p.Trp1293Ter в *CRB1* гена (NM_201253) (Фигура 21).



Фигура 21: Секвенционен NGS профил на вариантите c.2708_2709del, p.His903LeufsTer5 и c.3878G>A, p.Trp1293Ter в *CRB1* гена при таргетния пациент. А). Секвенционен профил на варианта c.2708_2709del, p.His903LeufsTer5. Б). Секвенционен профил на варианта c.3878G>A, p.Trp1293Ter.

Проведеният сегрегационен анализ в семейството идентифицира, че майката на пациента е носител на варианта c.2708_2709del, p.His903LeufsTer5, докато бащата на пациента е носител на варианта c.3878G>A, p.Trp1293Ter.

Генетичните варианти c.2708_2709del, p.His903LeufsTer5 и c.3878G>A, p.Trp1293Ter не са отривани сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1). Вариантът c.3878G>A, p.Trp1293Ter е съобщаван в базата данни ClinVar, като патогенен/вероятно патогенен (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/931560/>), докато вариантът c.2708_2709del, p.His903LeufsTer5 не е описван преди при пациенти с *CRB1*-свързани заболявания.

Генът *CRB1* съдържа 12 транскрипта, като транскрипт CRB1-A се експресира основно по време на развитието на ретината, докато транскрипт CRB1-B е преобладаващ в ретината на възрастните (Mairot *et al.*, 2021). Откритите от нас генетични варианти попадат и в двата транскрипта. Именно на засягането и на двата транскрипта (CRB1-A и CRB1-B) може да се дължи и наблюдаваната клинична симптоматика при таргетния пациент.

Нарушената функция на *CRB1* протеина води до прогресивна дегенерация на фоторецепторите, тежко увреждане на клетките на Müller, както и макулна дистрофия в

зависимост от транскрипта, който се засяга. Мутациите в гена *CRBI* са свързани с вариабилни тежки дистрофии на ретината, вариращи от вродена амавроза на Leber до Rod-cone дистрофия (наричана още retinitis pigmentosa) (Вижакowska *et al.*, 2012), което съответства на клиничната картина, наблюдавана при нашия пациент.

На база на казаното до тук и съгласно критериите на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицираме откритите от нас варианти с.2708_2709del, p.His903LeufsTer5 и с.3878G>A, p.Trp1293Ter в *CRBI* гена, като патогенни.

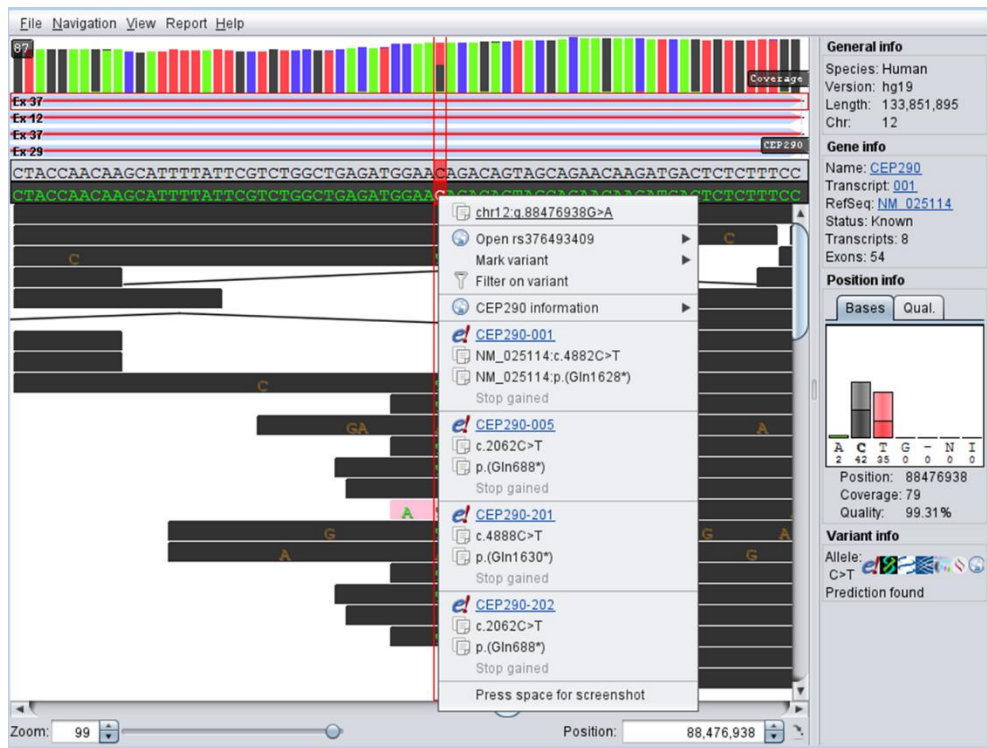
3.2.2. CEP290-свързани заболявания

Клинична картина

Таргетният пациент е момче на 2 години (към момента на генетичното изследване), при което малко след раждането родителите забелязали „непрекъснато движение на очите“. След консултации и прегледи от офталмолози е поставена диагноза вродена амавроза на Leber.

Молекулярно-генетичен анализ

Индексният пациент беше насочен за молекулярно-генетичен анализ (клинично екзомно секвениране) с таргетен анализ на гени, патогенни варианти в които са причина за поставената клинична диагноза. На база на проведеното молекулярно-генетично изследване открихме хетерозиготен патогенен nonsense вариант с.4882C>T, p.Gln1628Ter в *CEP290* гена (NM_025114) (Фигура 22).

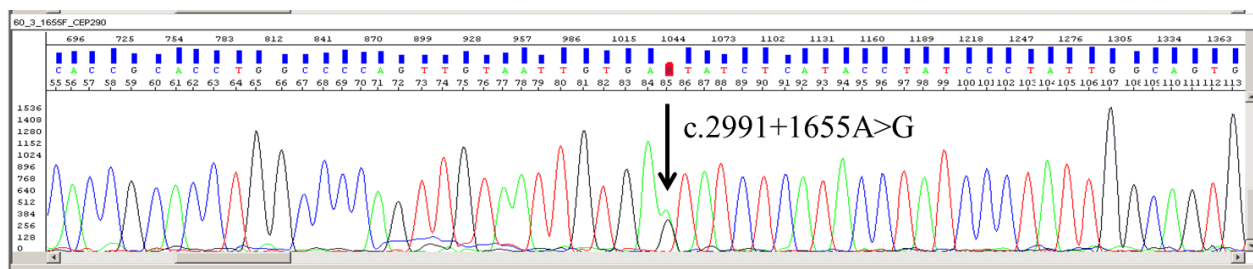


Фигура 22: Секвенционен NGS профил на варианта с.4882C>T, p.Gln1628Ter в *CEP290* при таргетния пациент.

Откритият генетичен вариант е докладван в базата данни ClinVar като патогенен при редица пациенти с *CEP290*-свързани заболявания, в това число и такива с диагноза „Вродена амавроза на Leber” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/217635/>). Вариантът е откриван сред контролните популации по проекта gnomAD, като неговата популационна честота е оценена на 0.007% (няма докладвани хомозиготни носители).

Тъй като в хода на анализ на данните от клиничното екзомно секвениране не детектирахме наличие на втори генетичен вариант, който в комбинация със замаяната с.4882C>T може да доведе до клиничните изяви, наблюдавани при пациента, извършихме литературна справка и това, което ни направи впечатление е, че една от най-честите генетични замени при пациенти с *CEP290*-свързани заболявания и по конкретно Вродена амавроза на Leber е интронният вариант с.2991+1655A>G (Perrault *et al.*, 2007; Wiszniewski W *et al.*, 2011; Collin *et al.*, 2012; Gerard *et al.*, 2012; Duijkers *et al.*, 2018).

За да проверим дали нашият пациент е носител на с.2991+1655A>G в *CEP290* гена, проведохме таргетно секвениране по Sanger на регион от гена, в който попада описаният генетичен вариант. Проведеният молекулярно-генетичен анализ показва, че индексният пациент е хетерозиготен носител на интронния вариант с.2991+1655A>G в *CEP290* гена (Фигура 23).



Фигура 23: Секвенционен профил на варианта с.2991+1655A>G в *CEP290* гена при таргетния пациент.

След като при пациента доказахме наличието на два патогенни хетерозиготни варианта в *CEP290* гена проведохме сегрегационен анализ в семейството, с който установихме, че генетичният вариант с.4882C>T е унаследен от майката на пациента, докато вариантът с.2991+1655A>G е унаследен от бащата.

Съгласно критериите на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицираме вариантите с.4882C>T, p.Gln1628Ter и с.2991+1655A>G в *CEP290* гена като патогенни.

Нарушаване на нормалната функция на *CEP290* белтъка може да води до вариабилна фенотипна изява, тъй като белтъчният продукт на гена е центрозомен протеин, който се експресира в ресничести клетки в цялото тяло (Corpieters *et al.*, 2010; Burnight *et al.*, 2014). В резултат на нарушена функция на *CEP290* белтъка се наблюдава засягане в развитието на ретината, като се уврежда функцията на фоторецепторите, които в състава си включват реснички, необходими за нормалното зрение. Засягането на тези реснички води до тежко и ранно зрително увреждане, което е характерно и за описаният от нас пациент.

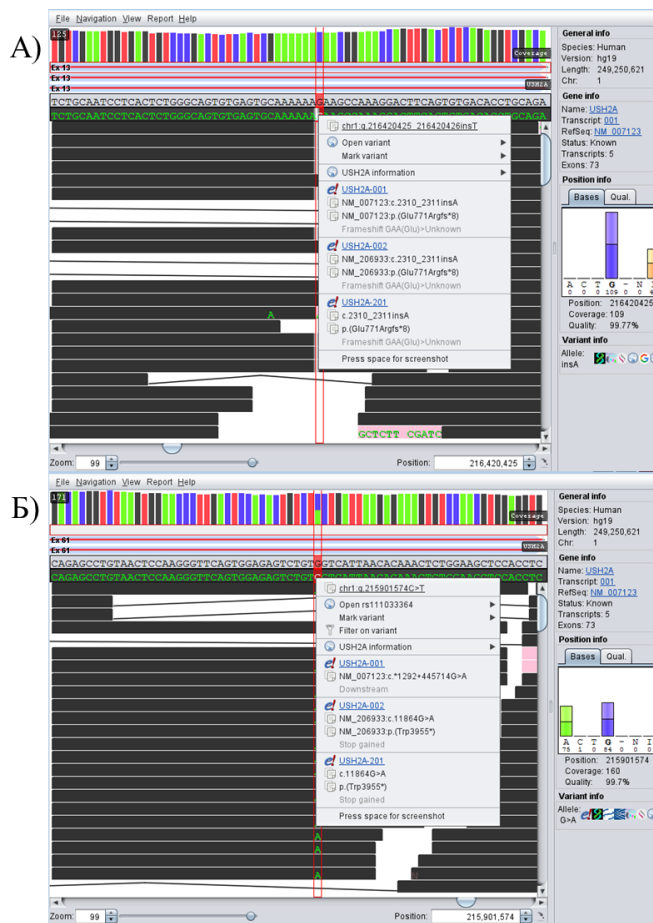
3.2.3. *USH2A*-свързани заболявания

Клинична картина

Таргетният пациент е мъж на 49 години с поставена клинична диагноза синдром на Usher.

Молекулярно-генетичен анализ

Поради големия брой гени, мутации в които могат да бъдат причина за синдром на Usher, директно преминахме към цялостно екзомно секвениране с цел генетично верифициране на диагнозата. На база на проведения молекулярно-генетичен анализ, установихме наличието на два хетерозиготни генетични варианта с.2310dup, p.Glu771ArgfsTer8 и с.11864G>A, p.Trp3955Ter в *USH2A* гена (NM_206933) (Фигура 24).



Фигура 24: Секвенционен NGS профил на вариантите с.2310dup, p.Glu771ArgfsTer8 и с.11864G>A, p.Trp3955Ter в *USH2A* гена. А). Секвенционен профил на варианта с.2310dup, p.Glu771ArgfsTer8. Б). Секвенционен профил на варианта с.11864G>A, p.Trp3955Ter.

Тъй като родителите на пациента не бяха налични за молекулярно-генетични изследвания не успяхме директно чрез изследване на родителите да докажем локализацията на вариантите върху алелите на гена *USH2A*. Това което направихме в случая беше да изследваме детето на таргетния пациент за носителство на вариантите с.2310dup, p.Glu771ArgfsTer8 и с.11864G>A, p.Trp3955Ter чрез секвениране по Sanger. На база на

проведените изследвания установихме, че детето на пациента е хетерозиготен носител само на варианта с.11864G>A, p.Trp3955Ter. По този начин доказахме, че при индексния пациент вариантът с.2310dup, p.Glu771ArgfsTer8 е локализиран на единия алел, докато вариантът с.11864G>A, p.Trp3955Ter на другия алел на *USH2A* гена, което съответства на автозомно-рецесивен модел на унаследяване.

Генетичният вариант с.2310dup не е откриван сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1). Към момента в базата данни ClinVar са публикувани широк набор от патогенни/вероятно патогенни варианти в *USH2A* гена (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=ush2a%5Bgene%5D&redir=gene>). Между тях се срещат всякакъв тип генетични дефекти – missense, nonsense, frameshift и splice site. Впечатление прави това, че най-голям процент от патогенните варианти са nonsense и frameshift, което дава индикация за това, че варианти, водещи до загуба на функция (loss of function), какъвто е и детектираният от нас вариант, са силно застъпен патогенен механизъм при *USH2A*-свързаните заболявания. Базирайки се на казаното до тук и съгласно критериите на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицираме идентифицираната от нас находка с.2310dup като патогенна.

Генетичният вариант с.11864G>A, p.Trp3955Ter е откриван сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1), като неговата популационна честота е оценена на 0.01%. Вариантът е съобщаван многократно като патогенен в ClinVar базата данни при пациенти с *USH2A*-свързани заболявания (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/2357/>). Редица проучвания доказват, че този генетичен вариант е един от най-честите варианти в *USH2A* гена, който се детектира при пациентите със синдром на Usher (Dzhemileva *et al.*, 2014; Neuhaus *et al.*, 2017; Zupan *et al.*, 2019). Съгласно критериите на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицираме варианта с.11864G>A като патогенен.

Белтъчният продукт на гена *USH2A* е локализиран във вътрешното ухо и ретината. Той е важен компонент на базалните мембрани и участва в развитието и хомеостазата на вътрешното ухо и ретината (Bhattacharya *et al.*, 2002). Нарушената функция на *USH2A* белтъка най-вероятно засяга именно развитието и хомеостазата на вътрешното ухо и ретината.

3.2.4. Наследствена оптична невропатия на Leber

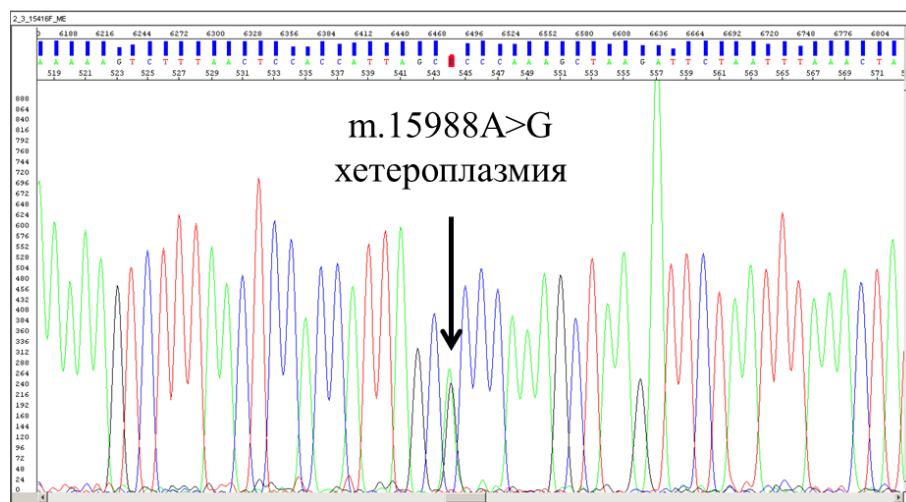
Клинична картина

Таргетният пациент е мъж на 34 години (към момента на генетичното изследване). Клиничните симптоми при него датират от 31-годишна възраст. Постепенно, безболково развива клинична картина, отговаряща на двустранна оптична невропатия. След проведено невро-офтальмологично изследване е поставена диагноза Наследствена оптична невропатия на Leber.

Молекулярно-генетичен анализ

Патогенни варианти в митохондриалния геном са причина за появата на това заболяване. Поради тази причина проведохме таргетно секвениране по Sanger на митохондриалната ДНК с цел установяване на генетичната причина, довела до клиничните симптоми при таргетния пациент.

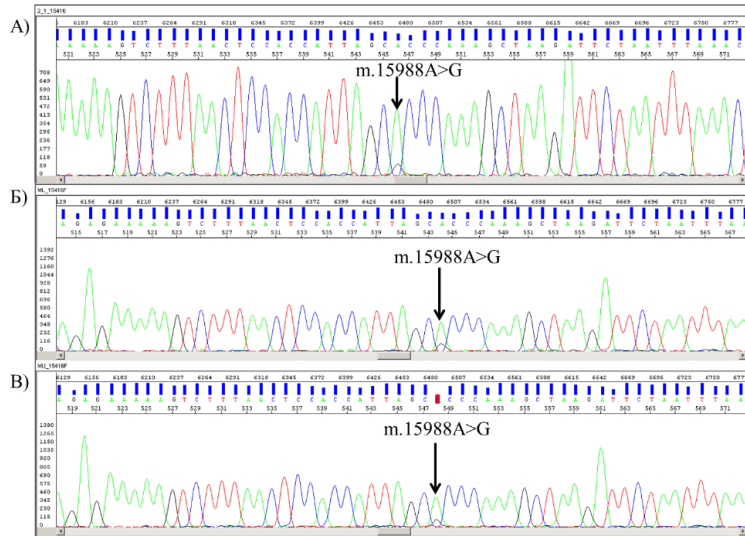
Проведеният молекулярно-генетичен анализ показва наличието на варианта m.15988A>G в гена *MT-TP*, който кодира митохондриалната транспортна РНК за пролин, във висока степен на хетероплазмия при таргетния пациент (Фигура 25).



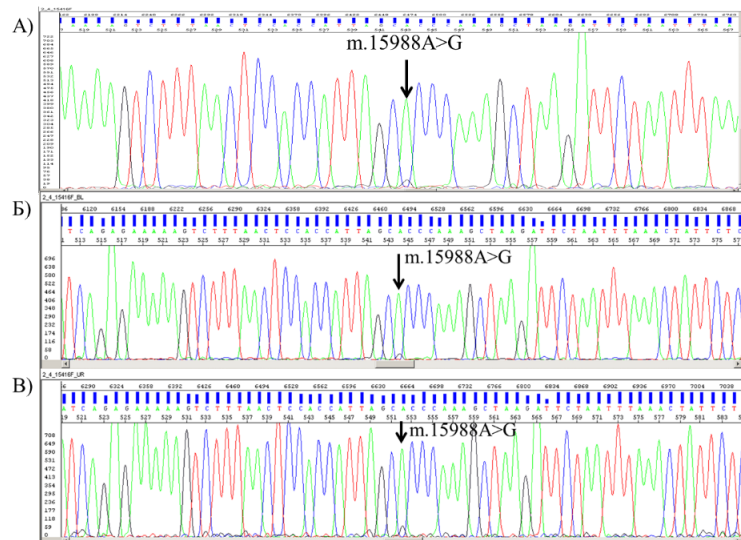
Фигура 25: Секвенционен профил на варианта m.15988A>G в гена *MT-TP* при таргетния пациент.

Тъй като изходният материал за изследване беше венозна кръв, решихме да проверим степента на хетероплазмия на варианта m.15988A>G и в други тъкани от пациента. Проведохме таргетно секвениране по Sanger за варианта m.15988A>G върху ДНК материал, изолиран от букална лигавица и уринна проба на пациента. Получените резултати показаха носителството на варианта m.15988A>G във висока степен на хетероплазмия при всички изследвани ДНК проби от пациента.

За да потвърдим или отхвърлим патогенния ефект на варианта проведохме сегрегационен анализ в семейството. Изследвахме здравите майка и брат на пациента, за да проверим дали някой от тях носи генетичния вариант m.15988A>G. За целта таргетно изследвахме ДНК проби, изолирани от кръв, букална лигавица и урина от майката и брата на пациента. Молекулярно-генетичният анализ показва, че майката и братът на пациента също са носители на варианта m.15988A>G, но в много ниска степен на хетероплазмия (Фигура 26 и Фигура 27).



Фигура 26: Секвенционен профил на варианта m.15988A>G при майката на таргетния пациент. А). Секвенционен профил на варианта m.15988A>G в ДНК, изолирана от венозна кръв, показващ носителство на варианта в ниска степен на хетероплазмия. Б). Секвенционен профил на варианта m.15988A>G в ДНК, изолирана от букална лигавица, показващ носителство на варианта в ниска степен на хетероплазмия. В) Секвенционен профил на варианта m.15988A>G в ДНК, изолирана от урина, показващ носителство на варианта в ниска степен на хетероплазмия.



Фигура 27: Секвенционен профил на варианта m.15988A>G при брата на таргетния пациент. А). Секвенционен профил на варианта m.15988A>G в ДНК, изолирана от венозна кръв, показващ носителство на варианта в ниска степен на хетероплазмия. Б). Секвенционен профил на варианта m.15988A>G в ДНК, изолирана от букална лигавица, показващ носителство на варианта в ниска степен на хетероплазмия. В) Секвенционен профил на варианта m.15988A>G в ДНК, изолирана от урина, показващ носителство на варианта в ниска степен на хетероплазмия.

Получените резултати от сегрегационния анализ в семейството ни дават основание да заключим, че въпреки това че здрави родственици на пациента (майка и брат) носят варианта m.15988A>G, при тях се наблюдава много ниска степен на хетероплазмия в сравнение с таргетния пациент. Именно на това може да се дължи и фактът, че при него се

наблюдава клиничната симптоматика, характерна за наследствената оптична невропатия на Leber.

Идентифицираният генетичен вариант m.15988A>G не беше съобщаван в базата данни MITOMAP, към момента на генетичното изследване (2018г.). Към днешна дата той вече е достъпен в базата данни MITOMAP (<https://www.mitomap.org/MITOMAP>), като е посочено, че вариантът се среща в базата данни Helix при 3 от изследваните ~196 000 проби в хомоплазмия и в хетероплазмия. Хипотезата, която може да изкажем в случая е, че най-вероятно не се наблюдава патологичен фенотип, когато в клетките имаме наличие само на една популация митохондриални ДНК-и независимо от това дали носят нормалната митохондриална ДНК последователност или носят генетичния вариант m.15988A>G. В случаите, когато наблюдаваме хетероплазмия във висока степен, както е при нашия пациент, най-вероятно се получава конфликт на регулаторно ниво в митохондриите. Тези регулаторни промени на митохондриално ниво биха могли да се асоциират с патологичния фенотип, наблюдаван в описаният от нас случай. В базата данни MITOMAP виждаме, че вариантът е откриван и в хетероплазмично състояние, но тъй като нямаме информация за степента на хетероплазмия не може да изключим вероятността в изследваните проби да се наблюдава ниска степен на хетероплазмия, както при здравите родственици на таргетния пациент, на което може да се дължи и фактът, че на този етап при тях няма изявена клинична симптоматика. Освен това в базата данни MITOMAP е посочено, че изследваните проби са от букална лигавица, което не ни дава информация за носителството на варианта и степента на хетероплазмия в проби от други тъкани.

На база на казаното до тук класифицираме открития от нас вариант m.15988A>G като вариант с неясно клинично значение.

Генетичният вариант засяга гена *MT-TP*, който кодира митохондриалната транспортна РНК за пролин. В резултат на увредена функция на белтъчния продукт на гена *MT-TP*, се нарушава и нормалната митохондриална белтъчна синтеза, което води до увреждане на функцията на митохондриите.

В заключение може да кажем, че към момента данните в световната литература не показват убедителна връзка на патологични варианти в *MT-TP* гена и LHON. Получените от нас резултати дават основание да се провеждат по-задълбочени анализи на откритите варианти в *MT-TP* гена и връзката им с наследствена оптична невропатия на Leber.

От групата на офталмологичните заболявания генетично верифицирахме 4-ма (57%) от пациентите. Изборът на подходящ метод за молекулярно-генетична диагностика се определяше от таргетната диагноза. Секвениране от ново поколение се прилага масово при заболявания, които могат да се дължат на патогенни варианти в различни гени. Секвениране по Sanger е подходящ метод за диагностика, когато имаме ясен генетичен таргет (напр. митохондриалния геном). Въпреки това в някои случаи е необходимо комплексното използване на повече от един метод за анализ с цел потвърждаване на диагнозата на молекулярно ниво. Това демонстрирахме нагледно с представения пациент с *CEP290*-свързано заболяване.

3.3. Обобщение на резултатите и заключение

Настоящият дисертационен труд описва предимствата и недостатъците на съвременните молекулярно-генетични методи за диагностика на редки неврологични и офталмологични заболявания. С всички описани случаи представяме най-правилния подход, който трябва да се предприеме при избора на молекулярно-генетичния анализ, с цел бързо и своевременно диагностициране на генетичната причина, довела до наблюдаваните фенотипни изменения при индексните пациенти. На база на използваните методи за анализ верифицирахме генетичната причина за наблюдаваните симптоми при 17 от 40 изследвани пациенти с редки неврологични и офталмологични заболявания. Установихме носителския статус при 39 родственици на генетично потвърдените пациенти. Това допринесе за адекватната медико-генетична консултация в засегнатите семейства. В хода на изработване на дисертационния труд бяха открити множество генетични варианти, които не са докладвани преди в световната литература, което показва хетерогенността и уникалността на хората от български произход. Проведохме таргетен мутационен скрининг за рядкото заболяване аргиназен дефицит в България. Резултатите показаха висока честота на носителство на генетичния вариант с.329+1G>A в *ARG1* гена при роми от региона на с.Осиковица. Получените резултати ни дават основание да предложим провеждане на селективни скринингови програми на хората от ромски произход от ендемичния регион с цел превенция на заболяването аргиназен дефицит в България. Чрез проведените молекулярно-генетични изследвания дадохме насока за провеждане по-задълбочени анализи на откритите варианти в *MT-TP* гена и връзката им с наследствена оптична невропатия на Leber.

4. ИЗВОДИ

4.1. Секвенирането по Sanger, златен стандарт в генетичната диагностика, може успешно да се използва за бърза и надеждна диагностика, когато имаме ясна клинична и/или биохимична диагноза. Такъв подход доведе до успешен резултат при 3-ма пациенти (8%) от изследваната група.

4.2. Секвенирането от ново поколение успешно се прилага за диагностични цели в случай, когато клиничната диагноза е неясна или генетичният таргет включва множество гени. Такъв подход доведе до успешен резултат при 14 пациенти (35%) от изследваната група.

4.3. Необходимо е да се приложи индивидуализиран подход за генетична диагностика при всеки конкретен пациент според диагнозата, фамилната история от една страна и познаването на генетичните основи на заболяванията и молекулните техники за анализ на човешкия геном от друга.

4.4. Представените неврологични заболявания с гърчова симптоматика се причиняват от разнообразни генетични варианти, нарушаващи различни клетъчни процеси като: натрупване на неразградени белтъчни агрегати в клетката; лизозомни и пероксизомни увреждания, водещи до натрупване на субстрати в тези органели; метаболитни нарушения в цикъл на Кребс и уреен цикъл или нарушения в аминоксил-тРНК-синтезните функции и транспорта на аминокиселини в процеса на белтъчната синтеза.

4.5. Представените невромускулни заболявания се причиняват от разнообразни генетични варианти, нарушаващи белтъци от мускулното съкращение; йонни невронални канали, регулиращи невромускулната сигнализация и митохондриални ензими или регулатори, повлияващи експресията на митохондриалния геном или електронния транспорт и производството на АТФ.

4.6. Представените офталмологични заболявания се причиняват от разнообразни генетични варианти, засягащи: експресията на важни белтъци в ретината, като регулатор на клетъчната полярност и компонент на базалните мембрани; центрозомен протеин, експресиран в ресничестите клетки на тялото или генетични варианти, нарушаващи нормалните функции на митохондриите.

4.7. Семействата, при които диагнозата е генетично верифицирана, могат да се възползват от новите възможности за гена и молекулна терапия, както и от пренатална диагностика при следваща бременност.

4.8. Установените уникални генетични характеристики при български пациенти показват висока генетична хетерогенност, характерна за българската популация.

4.9. Установените генетични характеристики при пациенти от ромски произход показват характерната за този етнос висока честота на рецесивни заболявания, дължаща се на близкородствени бракове и възпроизводство в затворени общества.

4.10. На базата на проведения селективен скрининг за варианта с.329+1G>A в *ARG1* гена при роми от региона на с.Осиковица, се установи значителна честота на носителство 1%, което обособява изследвания географски регион като ендемичен.

5. ПРИНОСИ

Приноси с научно-приложен характер:

5.1 Висок процент (43%) от случаи със сложни, припокриващи се клинични диагнози, социално значими, част от които нелечими за момента, някои от които с летален изход в ранна детска възраст, са генетично верифицирани.

5.2 Настоящият дисертационен труд представя разнообразието от генетични варианти в България. Чрез извършените молекулярно-генетични изследвания се обогатиха световните бази данни по отношение на новооткритите генетични варианти.

5.3 Резултатите от извършения селективен скрининг показват висока носителска честота на рядкото генетично заболяване аргиназен дефицит в таргетен регион на България. Това е от изключително значение за създаване на селективна скринингова програма на ромите от този регион с цел превенция на заболяването.

6. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

6.1. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Atemin S**, Todorov T, Maver A, Chamova T, Georgieva B, Tincheva S, Pacheva I, Ivanov I, Taneva A, Zlatareva D, Tournev I, Guerguelcheva V, Gospodinova M, Chochkova L, Peterlin B, Mitev V, Todorova A. MYH7-related disorders in two Bulgarian families: Novel variants in the same region associated with different clinical manifestation and disease penetrance. *Neuromuscul Disord.* (2021), 31(7):633-641.

Импакт фактор (2020): 4.296

Забелязани цитирания: 1

2. Чернинкова С, **Атемин С**, Тодоров Т, Митев В, Тодорова А. Случай на херeditарна оптична невропатия на Leber с нов генетичен вариант m.15988A>G в митохондриалния геном. *Българска неврология* (2018), Том 19, брой 2:62-67

Забелязани цитирания: 1

3. **Атемин С**, Тодоров Т, Митев В, Тодорова А. Геномна диагностика и приложението ѝ в педиатричната практика: възможности и ограничения. Глава от книга: Профилактика, диагностика и терапия в детско-юношеската възраст. Клинични и терапевтични предизвикателства в педиатричната практика. Арбилис (2020), 47-59

4. **Atemin S**, Todorov T, Tourtourikov I, Mitev V and Todorova A. Neurodevelopmental disorder in a Bulgarian patient caused by novel mutations in the *NARS1* gene. *Acta Medica Bulgarica* (2022), 49(2), 48-50

ОБЩ ИМПАКТ ФАКТОР: 4.296

6.2. НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Цанева С**, Георгиева Б, Тодоров Т, Томов В, Литвиненко И, Чамова Т, Търнев И, Гергелчева В, Йосифова А, Митев В, Тодорова А. Геномно секвениране като подход за диагностика в неврологичната практика. Национална научна конференция по детска неврология, психиатрия и психология на развитието, 11-12 октомври 2018 г., Парк хотел „Москва“, София, България
2. **Атемин С**, Тодоров Т, Ангелова Л, Митев В, Тодорова А. Синдром на Zellweger – генетична хетерогенност на българската популация. Трети Докторантски Симпозиум, Молекулярна биология – от молекулите до клетките и обратно, 7-8 март 2019 г., ИМБ-БАН, София, България
3. **Атемин С**, Тодоров Т, Георгиева – Абаджиева В, Гергелчева В, Митев В, Тодорова А. Секвениране от ново поколение – отговор на неизяснените въпроси в генетичната диагностика на редките болести. Десета национална конференция за редки болести и лекарства сираци, 13-15 септември 2019 г., Пловдив, България
4. **Атемин С**, Тодоров Т, Георгиева Б, Савов А, Митев В, Тодорова А. Скрининг за мутация в гена *ARG1*, асоциирана с метаболитното заболяване Аргининемия в предполагаем ендемичен регион в България. Научно-практическа конференция „Ден на редките болести в България“, 28-29 февруари 2020, София, България (устна презентация)
5. Тодорова А, **Атемин С**, Димова П, Йорданова-Козарева Р, Пачева И, Иванов И, Тодоров Т. Нови технологични подходи за молекулярно-генетична диагностика в детската неврология: случаи от нашата практика. Национална научна конференция по детска неврология, психиатрия и психология на развитието, 02-03 септември 2021 г., Парк хотел „Москва“, София, България
6. **Tsaneva S**, Todorov T, Maver A, Peterlin B, Guergueltcheva V, Todorova A, Mitev V. MYH7-related myopathy in a Bulgarian family: a novel splice acceptor variant in patients with late onset clinical manifestation established by NGS. ESHG Conference, June 16–19, 2018, Fiera Milano Congressi, Milan, Italy (E-P09.30)
7. **Atemin S**, Todorov T, Ivanova M, Kathom H, Avdjieva D, Mitev V, Todorova A. First genetically proven Arginase deficiency case of Bulgarian Roma origin due to a novel pathogenic splice site variant in the ARG1 gene. ESHG Conference, June 15–18, 2019, Gothenburg, Sweden (E-P06.03)
8. **Atemin S**, Todorov T, Sleptsova M, Mitev V, Todorova A. NARS1-related epilepsy in a Bulgarian patient. ESHG Conference, June 11-14, 2022, Vienna, Austria (EP10.053)

7. БИБЛИОГРАФИЯ

7.1. Чуждоезична литература

1. Aguib, Y. *et al.* (2021), *Circulation*, pp. 754–757.
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.048295.
2. Angural, A. *et al.* (2021), doi: 10.20944/preprints202107.0661.v1.
3. Bhattacharya, G. *et al.* (2002), *Hearing Research*, 163(1–2), pp. 1–11.
doi: 10.1016/S0378-5955(01)00344-6.
4. Bohlega, S. *et al.* (2004), *Neurology*, 62(9), pp. 1518–1521.
doi: 10.1212/01.WNL.0000123255.92062.37.
5. Bujakowska, K. *et al.* (2012), *Human Mutation*, 33(2), pp. 306–315.
doi: 10.1002/humu.21653.
6. Burnight, E. R. *et al.* (2014), *Gene Therapy*, 21(7), pp. 662–672.
doi: 10.1038/gt.2014.39.
7. Collin, R. W. *et al.* (2012), *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 1(3), p. e14.
doi: 10.1038/mtna.2012.3.
8. Collins, C. S. and Gould, S. J. (1999), *Human Mutation*, 14(1), pp. 45–53.
doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(1999)14:1<45::AID-HUMU6>3.0.CO;2-J.
9. Coppieters, F. *et al.* (2010), *Human Mutation*, 31(10), pp. 1097–1108.
doi: 10.1002/humu.21337.
10. Crane, D. I., Maxwell, M. A. and Paton, B. C. (2005), *Human Mutation*, 26(3),
pp. 167–175. doi: 10.1002/humu.20211.
11. Desmet, F. O. *et al.* (2009), *Nucleic Acids Research*, 37(9), pp. 1–14.
doi: 10.1093/nar/gkp215.
12. Duijkers, L. *et al.* (2018), *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3),
pp. 1–12. doi: 10.3390/ijms19030753.
13. Dzhemileva, L. *et al.* (2014), *Archives of Disease in Childhood*, 99(Suppl 2),
p. A475.1-A475. doi: 10.1136/archdischild-2014-307384.1316.
14. Ebberink, M. S. *et al.* (2010), *Human Mutation*, 31(1), pp. 1058–1070.
doi: 10.1002/humu.21153.
15. Elsayed, L. E. O. *et al.* (2020), *Frontiers in Neurology*, 11(October), pp. 1–7.
doi: 10.3389/fneur.2020.569996.
16. Fiorillo, C. *et al.* (2016), *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 11(1).
doi: 10.1186/s13023-016-0476-1.
17. Gardner, E. *et al.* (2019), *Human Mutation*, 40(11), pp. 1924–1938.
doi: 10.1002/humu.23860.
18. Gerard, X. *et al.* (2012), *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 1(6), p. e29.
doi: 10.1038/mtna.2012.21.
19. Jain-Ghai, S. *et al.* (2011), *Molecular Genetics and Metabolism*, 104(1), pp. 107–111.
doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.06.025>.
20. Jasinge, E. *et al.* (2022), *Laboratory medicine*, 53(3), p. e62.
doi: 10.1093/labmed/lmab107.
21. Ma, L. *et al.* (2021), *Stem Cell Research*, 53. doi: 10.1016/j.scr.2021.102323.
22. Mairot, K. *et al.* (2021), *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23).
doi: 10.3390/ijms222312642.

23. Marcogliese, P. C. *et al.* (2018), *American Journal of Human Genetics*, 103(2), pp. 245–260. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.07.006.
24. Mole, S. E. *et al.* (2021), *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 16(1), pp. 1–19. doi: 10.1186/s13023-021-01813-5.
25. Neuhaus, C. *et al.* (2017), *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, 5(5), pp. 531–552. doi: 10.1002/mgg3.312.
26. Pajusalu, S. *et al.* (2016), *Neuromuscular Disorders*, 26(3), pp. 236–239. doi: 10.1016/j.nmd.2015.11.011.
27. Perrault, I. *et al.* (2007), *Human mutation*, 28(4), p. 416. doi: 10.1002/humu.9485.
28. Ren, D. (2011), *Neuron*, 72(6), pp. 899–911. doi: 10.1016/j.neuron.2011.12.007.
29. Richards, S. *et al.* (2015), *Genetics in Medicine*, 17(5), pp. 405–424. doi: 10.1038/gim.2015.30.
30. Sheth, J. *et al.* (2018), *BMC Neurology*, 18(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s12883-018-1206-1.
31. Sohn, R. L. *et al.* (1997), *Journal of Molecular Biology*, 266(2), pp. 317–330. doi: 10.1006/jmbi.1996.0790.
32. Tran Mau-Them, F. *et al.* (2019), *Genetics in Medicine*, 21(4), pp. 1008–1014. doi: 10.1038/s41436-018-0143-0.
33. Verdijk, R. M. *et al.* (2008), *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 146(21), pp. 2822–2827. doi: 10.1002/ajmg.a.32523.
34. Wiszniewski W *et al.* (2011), *Hum Genet.* doi: doi:10.1007/s00439-010-0928-y.
35. Zupan, A. *et al.* (2019), *Genes*, 10(12). doi: 10.3390/genes10121015.

7.2. Електронни източници

1. ClinVar database <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>
2. Leiden Open Variation Database <https://www.lovd.nl/>
3. MITOMAP <https://www.mitomap.org/MITOMAP>