



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА

Д-Р РАДОСЛАВА ВАСИЛЕВА ВЪЖАРОВА,

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“

**АНАЛИТИЧЕН ПОДХОД ЗА РАЗКРИВАНЕ НА ГЕНЕТИЧНИ
НАРУШЕНИЯ ПРИ РЕДКИ БОЛЕСТИ ЧРЕЗ ДНК СЕКВЕНИРАНЕ ОТ
НОВО ПОКОЛЕНИЕ**

ДИ С Е Р Т А Ц И Я

за присъждане на образователна и научна степен “ДОКТОР”

Област на висше образование: „Природни науки, математика и
информатика”

Професионално направление: „Биологически науки” Шифър 4.3.

Научна специалност: „Генетика”

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: ЧЛ. КОР. ПРОФ. Д-Р ДРАГА ТОНЧЕВА, ДБН

София, 2016

Rare diseases are rare, but rare disease patients are numerous.
Orphanet

СЪДЪРЖАНИЕ

1.	ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	5
1.1.	Редки болести	5
1.1.1.	Определение	5
1.1.2.	Етиология	5
1.1.3.	Епидемиология	7
1.1.4.	Класификация на Редките болести	9
1.1.5.	Здравни и социални последици при Редки болести	10
1.1.6.	Лекарства сираци	11
1.2.	Клинична хетерогенност	12
1.3.	Генетична хетерогенност	14
1.3.1.	Алелна хетерогенност	14
1.3.2.	Локусна хетерогенност	15
1.4.	Клинично-генетична хетерогенност на наследствената спастична параплегия (HSP)	16
1.5.	Спектър на вариациите в човешкия геном	34
1.5.1.	Единични нуклеотидни полиморфизми (SNP)	35
1.5.2.	Експресионни SNPs (eSNP)	39
1.5.3.	F-SNP	40
1.5.4.	Малки инсерции и делеции (INDELs)	41
1.5.5.	Структурни варианти	45
1.5.6.	Микроделеции-микродупликации	47
1.6.	Геномни проекти в постгеномната ера	49
1.6.1.	Проект TCGA (The Cancer Genome Atlas)	49
1.6.2.	Проект UK10K	50
1.6.3.	Проект NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP)	50
1.7.	Международни геномни консорциуми	51
1.7.1.	The International Schizophrenia Consortium (ISC)	51
1.7.2.	International Cancer Genome Consortium (ICGC)	52
1.7.3.	Structural Genomic Consortium (SGC)	52
1.7.4.	International Consortium for Prostate Cancer Genetics (ICPCG)	52
1.7.5.	Rare Diseases Clinical Research Network (RDCRN)	53
1.7.6.	International Headache Genetics Consortium	53
1.7.7.	International Multiple Sclerosis (MS) Genetics Consortium	53
1.8.	Ново генерационно секвениране	54

1.9.	Обобщение на литературните данни _____	55
2.	ЦЕЛ И ЗАДАЧИ _____	56
3.	МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ _____	57
3.1.	Участници в проучването _____	57
3.2.	Биологични проби _____	58
3.3.	Методи _____	59
3.3.1.	Изолране на ДНК _____	59
3.3.2.	Таргетно ДНК ресеквениране от ново поколение _____	60
3.4.	Анализ на данните _____	74
3.5.	Критерии за класифициране на установените редки и нови генетични варианти _____	76
4.	РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ _____	79
4.1.	NGS анализ на здрави индивиди с TruSight One панел _____	79
4.1.1.	Патологични варианти и фармакогенетични дефекти, установени в контролната група индивиди _____	79
4.2.	Дискусия на резултатите от NGS изследване на здрави индивиди _____	85
4.3.	NGS изследване на пациенти с Редки болести _____	87
4.3.1.	Дизайн на изследването _____	87
4.3.2.	Патологични и вероятно патологични варианти при пациенти с редки болести _____	93
4.3.3.	Патологични и вероятно патологични варианти при родственици на пациенти с редки болести _____	107
4.4.	Обсъждане на резултатите от NGS анализа на пациенти с Редки генетични болести _____	109
4.4.1.	Обсъждане на установените патологични ДНК варианти при пациенти от 1-ва група _____	110
4.4.2.	Обсъждане на установените патологични ДНК варианти при пациенти от 2-ра група _____	134
4.4.3.	Обсъждане на патологични и вероятно патологични варианти, установени при здрави родственици на болни с редки болести _____	165
4.5.	Алгоритъм за прилагане на NGS при пациенти с редки моногенни болести _____	174
5.	ИЗВОДИ _____	177
6.	ПРИНОСИ _____	178
	Web-базиран източници и софтуерни приложения _____	179
	Литература _____	178
	Приложение 1 _____	200

1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1.1.Редки болести

1.1.1. Определение

През 1980-те и 1990-те години, Редките заболявания са били известни като "болести сираци", а в края на 1990-те години - „пренебрегвани заболявания“. Съвременното понятие за „Рядка“ болест включва всички заболявания с честота под 2 на 10000 живородени деца, независимо от тяхната етиология или клинично разнообразие – проявена симптоматика, начална възраст на изява, тежест на заболяването. Към тях спадат: генетични болести, наследствени карциноми, автоимунни заболявания или редки инфекции.

Според Европейската комисия, редките болести се определят като „хронични инвалидизиращи или животозастрашаващи заболявания, които засягат по-малко от 5 на 10000 индивиди“. Въпреки ниската им честота, Редките болести представляват сериозен здравен проблем, тъй като техният брой е много голям - между 5000 - 8000 различни нозологични единици. Общата честота на редките болести се оценява на около 6%. В България, при население от 7 364 570 души (данни от последното преброяване през 2011 г.) броят на болните се оценява на около 400 хиляди. Редките болести са най-често фамилни и засягат членове на обремененото семейство.

Макар и редки, някои от заболяванията имат относително висока честота в определени популации – напр. β -таласемията в Средиземноморските популации, болеста на Tay-Sachs сред евреите Ешкенази, муковисцидозата сред европейците и др.

Редките болести представляват тежък проблем за общественото здравеопазване. Ниската им честота, разнообразието на клиничните симптоми и относително високият общ брой на болните с Редки болести изискват мултидисциплинарен подход, осигуряването на достъп до качествено здравеопазване, справедливост и солидарна подкрепа за пациентите.

1.1.2. Етиология

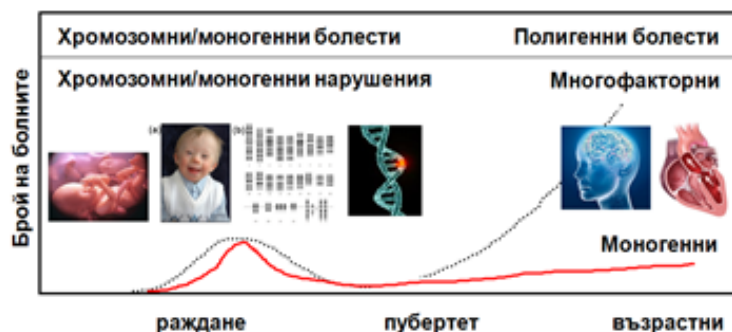
Около 80% от редките болести са с генетична етиология. Те се дължат на хромозомни аномалии, дефекти в единични гени или мултифакторни причини.

Генетичните заболявания могат да са наследени от родителите или да са резултат от de novo възникнали генетични аномалии. Концепцията за моногенни болести „мутация в един ген – едно заболяване“ претърпя развитие в няколко аспекта:

- Различни мутации в един и същи ген могат да са свързани не само с вариабилна фенотипна изява на една конкретна болест, но и да са причина за различни заболявания, обособени като отделни нозологични единици;
- Мутации в различни гени, чиито продукти участват в един и същ сигнален път или метаболитен процес, могат да имат сходен фенотип и разграничаването им само по клинични симптоми е невъзможно;
- При редица класически моногенни заболявания, фенотипната изява зависи от съучастието и на други гени – модификатори, както и от епигенетични промени и фактори на околната среда.

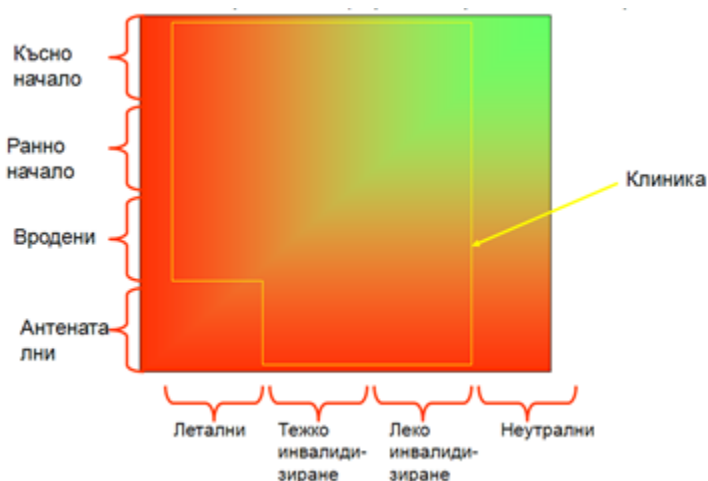
За повечето Редки болести молекулната патогенеза остава все още непозната.

Редките моногенни болести се проявяват най-често при раждане като вродена болест (3% до 4% от новородените) или в детската възраст, например инфантилната спинална мускулна атрофия, остеогенезис имперфекта, синдром на Rett, метаболитни заболявания като болестите на Hurler, Hunter, Sanfilippo, синдром на Zellweger, хондродисплазия и др. Първите симптоми на други редки заболявания, могат да се проявят в детска възраст или по-късно (напр. неврофиброматозата). Други Редки болести започват да се развиват при възрастни лица (болест на Huntington, малкомозъчна атаксия и амиотрофична латерална склероза и др) (Фиг. 1).



Фигура 1. Динамика на спектъра на РБ през различни периоди на индивидуално развитие на лицата

Редките болести се срещат във всяка медицинска специалност – педиатрия, офталмология, кардиология, неврология, онкология и т.н. Клиничната симптоматика варира в много широки граници – от леки до тежки дори летални форми (Фиг. 2).



Фигура 2. Клинична хетерогенност на Редките болести

Профилактиката на Редките болести в засегнатите семейства и разработването на ефективни терапии и развитието на персонализирана медицина изискват изясняване на причините за възникване на конкретното заболяване и разкриване на патогенетичните механизми при всеки пациент. Бързото развитие на геномните технологии през последните 15 години и резултатите, получени в хода на проекта Човешки геном, създадоха предпоставка за внедряване постиженията на геномиката в клиничната практика.

Обект на настоящата разработка е съвременна характеристика на генетичните нарушения при Редките генетични заболявания с приложение на нови технологии за геномен анализ.

1.1.3. Епидемиология

Точният процент на разпространението на отделните редки заболявания трудно може да бъде определен на базата на известните информационни източници. Това се дължи на бедната информация за използваните методи, различното ниво на клинично описание, бедна документация на случаите, объркване между заболяемост при раждане и през целия живот и др. Валидността на публикуваните изследвания се приема за даденост и не оценяват. Вероятно има завишаване на честотата при някои публикувани изследвания,

които са базирани на болнични данни. Тези оценки следва да се приемат като предполагаема честота без да са точни.

Епидемиологията на Редките болести не е добре позната, а единствен източник на ориентираща информация за разпространението им е ORPHANET (www.orpha.net). Данните за българската популация са оскъдни, тъй като от една страна липсва изграден национален регистър, а от друга има голям брой Редки болести, които не са описани и нямат собствен код в Международната Класификация на Болестите (МКБ).

У нас Информационният център за редки болести и лекарства сираци (ИЦРБЛС) в гр. Пловдив координира 7 епидемиологични регистъра за редки болести (бета таласемия майор, хронична миелоидна левкемия, болест на Крон, болест на Уилсън, болест на Гоше, мукополизахаридоза тип II, първична миелофиброза, невроендокринни тумори). Обхванати са над 1100 пациенти в България. Регистри за редки болести има в Националната генетична лаборатория, в генетичните звена на Медицинските Университети в страната, в Специализираната болница за активно лечение по педиатрия, УМБАЛ „Александровска“, в Специализираната болница за лечение на хематологични заболявания, в Клиниката по клинична имунология и в отделни генетични лаборатории.

На следната интернет страницата http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence_of_rare_diseases_by_alphabetical_list.pdf са дадени данни за разпространението в Европа на известните до момента случаи на отделни редки заболявания, базирани на систематичен преглед на литературата. На този сайт редовно ще бъде публикувана актуализирана информация. Тя ще съдържа нови епидемиологични данни.

Честотата на Редките болести е определена като средна от най-високите и най-ниските стойност. При заболявания с неизвестно разпространение изчисленията са извършвани по следния начин:

- За вродени заболявания с начало при раждането: разпространението = честотата при раждане $\times$ (средната продължителност на живота на пациента/продължителността на живота на общото население);

- За други редки болести: разпространението = честотата x средната продължителност на живота при рядкото заболяване;

Когато няма данни за разпространението или за честотата, се дават данни за броя на случаите или семействата, съобщени в литературата.

1.1.4. Класификация на Редките болести

Към настоящия момент няма единна класификация на редките болести. Само малка част от редките заболявания имат кодове в международни номенклатури, което прави невъзможно проследяване на пациенти в информационните системи на здравеопазването на национално и международно ниво.

В актуалната 10-та ревизия на МКБ (ICD10) със специфичен код са включени 466 редки болести, а всяка година се откриват около 100 нови редки заболявания. Повечето европейски страни използват ICD10 или 9, а други (UK, Белгия, Испания) приемат SNOMED CT номенклатура, в която специфичен код имат 2 883 заболявания.

Класифицирането на Редките болести е затруднено, поради изключително големия брой нозологични единици, многообразието на клинични симптоми и ниската популационна честота на отделните заболявания. Повечето редки заболявания не са включени в действащата Международната класификация на болестите (ICD10) и тези със специален код, често са непълно класифицирани. Като последица от това, информацията за заболяемост и смъртност при редки заболявания е неточна и на практика „невидима“ за информационните системи на здравеопазването. В опит да се преодолее този проблем Orphanet с подкрепата на СЗО е събрала всички публикувани експертни класификации и бази данни от фенотипове индексирани с ICD10 кодове, MIM кодове, гени, тип на унаследяване, възраст на поява и епидемиологична информация, като всяко заболяване е включено в толкова класификационни системи, колкото са необходими за коректното му представяне.

Очаква се 11-тата ревизирана версия на МКБ да включва известните до момента Редки болести. Класифицирането на Редките болести ще се базира предимно на клинични критерии, като нозологичните единици, свързани със засягане на определен орган или система, ще бъдат включени в отделни раздели. Всяко Рядко заболяване ще има основен

код, отразяващ органа/системата, засегнати най-тежко и профила на специалистите, които са свързани с диагностиката и лечението на болестта.

Създаването на кодове на Редките болести ще улесни включването на тези заболяванията в здравни пътеки и ще се отрази върху специализираните здравни услуги. След приемане на Европейската директива за изграждане на Европейски експертни центрове, този процес се ускори, вкл. в България, което ще доведе до подобряване на здравните грижи за пациентите.

Новата номенклатура Orphanet се очаква да бъде завършена до 2017 г. Новата версия на МКБ ще позволи да се събират надеждни данни за епидемиологията, историята на заболяванията и клиничната симптоматика. Новата Orphanet номенклатура и класификация на Редките болести се основава на научни публикации и на експертно мнение. Тя е съобразена с използваната медицинска терминология в клиниката, което прави съвместими различните кодиращи системи. В номенклатурата на Orphanet са интегрирани ICD11 и SNOMED CT, благодарение на партньорството между Orphanet и IHTSDO. Номенклатурата на Orphanet е свободно достъпна за изтегляне от www.orphadata.org на седем езика (холандски, английски, френски, немски, италиански, португалски, испански) и се актуализира два пъти годишно (<http://www.orpha.net> website; (Rath A, et al., 2014; 2012; [http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Education_Home.php?lng=EN#REPORT_RARE_DISEASES])).

1.1.5. Здравни и социални последствия при Редки болести

Редките заболявания представляват предизвикателство за медицината и науката. Те не са били във фокуса на интереси на лекари, изследователи и политици, не са били задълбочено изследвани и не са били обект на обществена здравна политика. Повечето редки заболявания са нелечими, но при подходящи медицински грижи може да се подобри качеството и продължителността на живот на болните. При някои заболявания е постигнат забележителен напредък, което ентусиазира научните среди при търсене на генетичните дефекти и молекулни пътища за отделните Редки заболявания и пороци социална солидарност към пациентите.

Болните от редки заболявания са изправени пред големи трудности и са особено уязвими поради здравни, психологически, социални, икономически и културно проблеми. Те срещат проблеми за достъп до квалифицирани специалисти за конкретното заболяване, за точно поставяне на диагноза, за конкретно поведение към тях, за персонализирана медицина, за получаване на полезна информация за болестта. Те имат ограничен достъп до качествено здравеопазване, затруднена професионална и социална интеграция и независимост.

Най-големи трудности срещат пациенти, при които не е поставена диагноза и заболяването остава неизяснено, тъй като липсат достатъчно научни и медицински познания. Това са хората, които страдат най-много, тъй като не получават подходяща подкрепа.

1.1.6. Лекарства сираци

Лекарствата сираци, наречени още “orphan drug“, са предназначени за лечение на редки заболявания, поради което фармацевтичните компании не са склонни да ги развиват в условията на обичайните пазарни практики. Процесът на създаване на ново лекарство обикновено отнема 10 г. и изисква голямо финансиране (няколко десетки милиона евро). Перспективата за възстановяване на направената инвестиция при редки заболявания е нищожна, което обрича пациентите да останат без подходящо лечение.

Европейска агенция за оценка на лекарствените продукти „ЕМЕА“ положи солидарни усилия на национално и европейско равнище, заедно с фармацевтичната индустрия, с цел да се стимулира развитието на качествено производство на лекарства за редки заболявания, еквивалентно на изискванията за всяко друго лекарство. Целта е: а) насърчаване на индустрията да извършва научноизследователска дейност и да разработва лекарства за редки заболявания; б) създаване на компетентни малки и средни предприятия в тази специализирана област; в) повишаване на знанията за тези болести; г) развитие на трансгранично сътрудничество между различните изследователски центрове, институции, пациенти и т.н.

Успехът при създаване на нови лекарства зависи от прогресът в изследването на генетичната етиология и молекулната патогенеза на Редките болести, който се очаква да бъде направен с използване на новите геномни технологии.

(http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Education_AboutOrphanDrugs.php?lng=EN)

Редките болести представляват сериозен проблем за лекарите, за пациентите и техните семейства, за обществото като цяло и за здравната система на всяка страна. Диагнозата на Рядка болест се поставя трудно, поради няколко причини: ниска честота, откриване на единични случаи в клиничната практика на лекарите; клинична хетерогенност; ограничени възможности за генетични изследвания; над 3,200 редки болести са с известен генетичен дефект, а при останалите няма установено генетично нарушение.

1.2.Клинична хетерогенност

Основните проблеми в диагностичен план са: недостатъчна информация за клиниката и за генетичните дефекти при Редките болести; закъснение в поставянето на диагнозата след развитието на клинична симптоматика и липса на лечение за повечето заболявания. Според европейско проучване, диагнозата се поставя с голямо закъснение от 5 до 30 години.

Проблемът за използване на иновативни технологии за диагностика на пациенти с Редки болести е много важен и актуален. Данните от международния опит на Белгия показват следното:

- При 44% от пациентите с Редките болести първоначалната диагноза се променя след генетично изследване;
- 75% от пациентите с Редките болести без генетично изследване са лекувани неправилно, вкл. медикаментозно (36%), хирургично (12%), психотерапия (7%) и др.
- При 78% от децата с Редките болести забавената диагноза причинява тежки последствия, включително смърт (1%);
- 22% от пациентите с Редките болести се консултират средно от 5 клиницисти преди назначаване на генетично изследване, а 7% - от 10 клиницисти;

Редките болести се проявяват с различна по спектър и тежест клинична симптоматика при различните пациенти. Една от основните им характеристики е клиничната хетерогенност, т.е. някои от симптомите могат да доминират, или да бъдат слабо изявиени, не всички клинични характеристики на заболяванията са представени в еднаква степен.

Например, заболяването аниридия е моногенно и се дължи на мутация в *PAX6* гена. Аниридията се характеризира с липса на ирис, обикновено са засегнати двете очи. Изолираната аниридия се проявява не само с вроден дефект на ириса, но и с хипоплазия на макулата и оптичния нерв, промени в корнеята и други очни усложнения: нистагъм, амблиопия, буфталм и катаракта. Разнообразието в клиниката се подчертава от факта, че при някои пациенти аниридията се съчетава с бъбречна нефробластома (тумор на Wilms), аномалии на гениталиите, или интелектуален дефицит и церебеларна атаксия (синдром на Gillespie), водещи до WAGR синдром.

Болестите на съединителната тъкан представляват група заболявания, които се проявяват със симптоми от страна на ставите, мускулите и кожата, но те могат също така да включват и други органи и системи, включително очи, сърце, бели дробове, бъбреци, стомашно-чревния тракт, и кръвоносните съдове. Болестите на съединителната тъкан обхващат над 200 нарушения, вкл. синдром на Ehlers-Danlos, на Marfan, Osteogenesis imperfecta, полимиозит и дерматомиозит, ревматоиден артрит, склеродерма, синдром на Sjögren, системен lupus erythematosus, комбинирани болести на съединителната тъкан и др. Синдромът на Ehlers-Danlos (EDS) включва над 10 заболявания, които се характеризират със свръхмобилност на ставите, разтеглива лесно ранима кожа, вариране на симптомите от леки до тежки – изкривяване на гръбначния стълб, слабост на кръвоносните съдове, кръвотечения, сърдечни, белодробни, стомашно-чревни проблеми.

1.3. Генетична хетерогенност

Редките моногенни заболявания почти винаги се характеризират с алелна и / или локусна хетерогенност.

1.3.1. Алелна хетерогенност

През последните 25 години са идентифицирани гени за около 50% от известните 6-8,000 редки моногенни болести. Благодарение на развитието на новите технологии се очаква, че до 2020 г. ще бъдат определени останалите патологични гени свързани със заболявания. (Boycott K. et al., 2013).

Гените, кодиращи протеини, представляват 1% от човешкия геном, но те концентрират 85% от мутациите, които имат клинично значение. Десетки/стотици различни мутации, разпространени в различни популации, могат да засегнат един и същи ген и могат да се експресират с различна по тежест клинична симптоматика. Явлението е познато като алелна хетерогенност.

Класически пример за алелна хетерогенност е муковисцидозата, при която са идентифицирани над 300 мутации в гена *CFTR* (като най-честа е $\Delta F508$), но те най-често се проявяват със сходни клинични симптоми.

Цялостните геномни асоциативни изследвания (GWAS проучвания) на отделни общи варианти разкриват високо рискови варианти за разстройства на аутистичния спектър (ASD). *CTNNA3* е много добър „кандидат“ ген за аутизма, тъй като са получени данни за разпространени и редки варианти при това разстройство. Генът е член на семейството на α -катенин, играе ключова роля в процесите на клетъчна адхезия, които имат значение за развитието на ASD. Редки геномни вариации в броя на копийните варианти и точкови мутации имат по-значимо участие в етиопатогенезата на аутизма в сравнение с разпространените варианти. Две редки хетерозиготни „кампаунд“ делеции в екзон 11, включващи гена *CTNNA3* при пробанд с аутизъм, са отговорни за рецесивното наследяване на аутизма в семейството.

Резултатите от изследванията по геномния проект за аутизъм (Autism Genome Project (AGP) genome-wide study) разкриват още 14 допълнителни хетерозиготни делеции в ASD пробанди, които са различни по позиция (от екзон 6 до екзон 13), по размер и генетично съдържание, в резултат на отстраняване на 1 или 2 екзони (Bacchelli E. et al., 2014).

1.3.2. Локусна хетерогенност

Заболявания с локусна хетерогенност са тези, при които една и съща клиника може да се дължи на мутации в различни ген. Напр. повечето пациенти с аниридия носят мутация в *PAX6*, локализиран в късото рамо на 11 хромозома (11p13). При останалите пациенти *PAX6* генът е нормален и заболяването вероятно се дължи на мутации в други гени: *PITX*, *FOXC1*, *CYPB*, *GDF6* и т.н. Синдромът WAGR (спорадична аниридия) се дължи на делеция 11p13, която включва и *PAX6* гена. Затова поставянето на генетична диагноза на Редките болести често налага използване на няколко различни техники.

При използване на конвенционални подходи, откриването на молекулярния дефект може да се забави с месеци и години, напр. при пациент със синдром на Ehlers Danlos изясняването на диагнозата е отнело повече от 30 години. Това забавяне понякога има трагични последици. Навреме поставената диагноза е от голямо значение за правилното поведение и достъпа до лечение на пациентите.

Генетичните изследвания с конвенционални методи са скъпи. Големият успех в диагностиката на Редките болести беше постигнат през последните две-три години с въвеждане на ново поколение секвенатори, с които може да се поставя бърза диагноза, да се направи екзомно секвениране на всички 22,000 гени, или на голям брой гени, включени в специфични панели. През 2011 година България стана петата страна в Европа след Англия, Германия, Швейцария и Холандия, която разполага с геномна лаборатория оборудвана с ново поколение секвенатор и с геномен скенер (в СБАЛГАР „Д-р Малинов“). С въвеждането на тази нова геномна технология у нас, диагнозата на редки болести и наследствени предразположения вече е възможна и се прави на български пациенти на многократно по-ниска цена от тази в други европейски страни. Новата геномна технология (NGS next generation sequencing) значително ускорява диагностичния процес. Включването на NGS в рутинната практика улеснява и подобрява диагнозата на известни патологични и вероятно патологични мутации. През 2012 г. Англия отдели 100

милиона £ за цялостно геномно секвениране на 100,000 пациенти и излезе начело в диагнозата, лечението и превенцията на Редките болести в Европа.

Генетичната диагноза може да бъде поставена чрез дородови и послеродови изследвания, които позволяват ранна диагностика и вторична профилактика на заболяването в засегнатите семейства. Персонализираната терапия и ефективната превенция на редките болести зависят от точната генетична диагноза, прецизната оценка на генетичния риск и от адекватната медико-генетична консултация.

1.4. Клинико-генетична хетерогенност на наследствената спастична параплегия (HSP)

HSP представляват група от клинично-генетично хетерогенни неврологични заболявания, които се проявяват с билатерални, предимно симетрични контрактури на долните крайници, причинени от нарушена функция на нервите. Най-засегнати са дългите нерви, които са чувствителни на дефекти в клетъчния транспорт.

На патоморфологично ниво, заболяването се характеризира предимно с дегенерация на аксоните, особено в дисталните краища на кортикоспиналния тракт и лека загуба на клетки от предния рог.

Диференциално диагностичния план обхваща:

- Структурни аномалии на главния или гръбначния мозък;
- Други моторно невронни заболявания, като бавно прогресираща амиотрофична латерална склероза (amyotrophic lateral sclerosis - ALS) или първична латерална склероза (primary lateral sclerosis - PLS)
- Левкодистрофии, като мултиплена склероза, дефицит на витамин B₁₂, болест на Krabbe, метахроматична левкодистрофия и адреномиелоневропатия.
- Спиноцеребеларна атаксия (Spinocerebellar ataxias - SCAs) (т. нар. болест на Machado-Joseph [SCA 3], Friedreich ataxia, спастична атаксия на Charlevoix-Saguenay или други спастични атаксии).
- Инфекции (например: HIV AIDs, тропична спастична параплегия (известна като human T-cell leukemia virus 1 [HTLV1] -associated myelopathy) и невросифилис.

- Метаболитни болести (Sedel et al., 2007) – метилмалонова ацидемия и хомоцистинурия, дефекти на урейния цикъл, дефицит на биотинидаза, фенилкетонурия, глицинова енцефалопатия, церебрален фолатен дефицит, хомакарнозиноза, церебротендинозна ксантоматоза, синдром на Sjögren-Larsson, адултна форма на болест с полиглюкозанови включвания (polyglucosan body) и дефицит на нуклеозид фосфорилаза.
- Ранна деменция (Amyotrophic Lateral Sclerosis - ALS) и фамилна болест на Alzheimer при мутация в гена *PSEN1* (кодиращ presenilin-1), *PSEN2* (кодиращ presenilin-2), или APP (кодиращ amyloid прекурсорен протеин).
- Дора зависима дистония (Dopa-responsive dystonia - дефицит на GTP Cyclohydrolase 1- Dopa-Responsive Dystonia, Tyrosine Hydroxylase Deficiency).

Класификацията на HPS се гради на: клинична симптоматика, на тип на наследяване, начална възраст на заболяване и на генетична характеристика.

- Клинична симптоматика:

Неусложнените „чисти“ форми на HSP се характеризират с неврологични проблеми със спастична слабост на долните крайници и хипертоничен пикочен мехур. Началото на заболяването варира от ранни форми до късни прояви. Болните обикновено нямат проблеми с горните крайници, запазват говора и имат нормална продължителност на живота.

При сложните форми на HSP се появява допълнителна неврологична симптоматика: засяга се очния нерв, развива се катаракта, атаксия (загуба на мускулна координация), епилепсия, припадъци, изоставане в умственото развитие, когнитивни нарушения, деменция, екстраепирамидни нарушения или периферна невропатия и глухота. Патогенезата при различните форми на HSP не е напълно изяснена. Смята се, че заболяването се дължи на дегенерация на горните двигателни неврони на мозъка и гръбначния мозък. Моторните неврони пряко или косвено контролират движенията на мускулите чрез инициране на свиване или отпускане на мускулите. В HSP се засягат горните двигателни неврони. Тези клетки пренасят сигнали от мозъка към мозъчния ствол и гръбначния мозък. На

свой ред, тези сигнали се пренасят от долните моторни неврони до мускулите. При HSP, тези сигнали не са проведени до долните двигателни неврони обикновено в резултат на прогресивна дегенерация на аксони на някои от спиналните трактове. Характерните дегенеративни промени при HSP изглежда засягат предимно кортикоспиналния тракт. В допълнение, може да има дегенеративни промени на пътищата, които предават сензорни импулси от някои региони на гръбначния мозък към мозъка.

Заболяването се определя като HSP в случаите, когато неврологичната симптоматика е появена предимно с пирамидни нарушения. Клиничната класификация понякога трудно разграничава HSP от церебрална атаксия, умствено изоставане и левкодистрофии.

- Тип на наследяване. Тази група от генетични заболявания може да има различен тип на наследяване в отделните рискови фамилии – автозомно доминантно, автозомно рецесивно, X-свързан рецесивен тип.
- Начална възраст на заболяване. Тя е служила в миналото за класифициране на HSP в тип I (начало преди 35 години) и тип II (начало след 35 години). При тип II проявени са мускулната слабост, симптоми от пикочния тракт и сензорна загуба.
- Генетична база. Единствено генетичните изследвания за известни генни мутации могат да потвърдят диагнозата (Fink JK, 2003, Depienne C, et al., 2007; De Matteis, M. A.; Luini, A., 2011).

До сега са идентифицирани 72 HSP локуси и 55 гени за спастична параплегия (SPGs) (Lo Giudice T, et al., 2014) (виж табл. 1)

- SPG3A тип

Един от типове на заболяването - спастичната параплегия 3A (SPG3A), се диагностицира единствено с генетичен тест за мутации (deletions/insertions, missense, nonsense и splice site варианти) в *ATL1* гена.

Генът е локализиран на 14q22.1 хромозомен район и кодира протеина atlastin-1, който принадлежи на подклас GTPases (известна като dynamins). Този протеин участва във везикуларния транспорт и рециклирането на везикулите. Той има два трансмембранны

домена и GTP свързващ домен. Atlastin-1 е експресиран в невроните на пирамидния тракт, който е засегнат от аксонална дегенерация. Atlastin-1 е локализиран в ендоплазматичния ретикулум (ER) и комплекса на Golgi (Zhu et al 2003, Zhu et al 2006). Atlastin-1 играе важна роля при формиране на тубуларната ER мрежа (Hu et al 2009, Park et al 2010) и взаимодействия със микротубуларния протеин spastin, който предизвиква най-честите форми на АД HSP (Sanderson et al 2006).

Таблица 1. Автозомно доминантна форма на наследствената спастична параплегия (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1509/>)

Ген / Локус Наименование (хромозомен локус)	Протеин	Клиничен синдром	Справка
<i>ATL1</i> / SPG3A	Atlastin-1	Неkomplицирана HSP • Типично начало: детство (може да бъде не-прогресивна); или по-късна възраст (прогресия) • Генетична не-пенетрантна • <i>De novo</i> мутация със спастична диплегична церебрална парализа	Hazan et al [1993] , Paternotte et al [1998] , Zhao et al [2001]
<i>SPAST</i> / SPG4	Spastin	Неkomplицирана HSP; най-честа причина за AD HSP (~40%) • Начало: от ранна до късна форма • Вариабилни прояви: когнитивни нарушения при късната форма	Hazan et al [1994] , Hentati et al [1994b] , Charvin et al [2003] , Evans et al [2005] , Roll-Mecak & Vale [2005]
<i>NIPA1</i> / SPG6	Не-импринтиран район в протеин 1 при Prader-Willi / Angelman синдром (транспортен на магнезий NIPA1)	Неkomplицирана HSP • начало в късно-юношеска или ранна-възрастова форма, бавно прогресираща • Рядко се усложнява с епилепсия, или вариабилна периферна невропатия (1 случай с ALS)	Fink et al [1995a] , Fink et al [1995b] , Rainier et al [2003] , Chen et al [2005] , Du et al [2011] , Svenstrup et al [2011] , Martinez-Lage et al [2012]
<i>KIAA0196</i> / SPG8	KIAA0196 (WASH)	Неkomplицирана HSP	Hedera et al [1999a] , Hedera et al

			[1999b] , Reid et al [2000] , Valdmanis et al [2007] , Bian et al [2011]
SPG9 / (10q23.3-q24.1)	Неизвестен	Усложнена HSP • Катаракта, гастроезофагеален рефлукс, монотра невропатия	Seri et al [1999] , Meijer et al [2004]
<i>KIF5A</i> / SPG10	Kinesin тежко верижна изоформа 5A	Не-усложнена HSP или усложнена с дистална мускулна атрофия	Reid et al [1999] , Fichera et al [2004]
<i>RTN2</i> / SPG12	Reticulon-2	Не-усложнена HSP	Reid et al [2000] , Montenegro et al [2012]
<i>HSPD1</i> / SPG13	Chaperonin 60 (heat shock протеин 60, HSP60)	Не-усложнена HSP • Начало: юношество или възрастни	Fontaine et al [2000] , Hansen et al [2002] , Bross et al [2008]
<i>BSCL2</i> /SPG17	BSCL2 (seipin)	Усложнена HSP: • Амиотрофия на мускулите на ръцете (Silver синдром)	Patel et al [2001] , Windpassinger et al [2004] , Auer-Grumbach et al [2005]
SPG19 / (9q)	Неизвестен	Не-усложнена HSP	Valente et al [2002]
SPG29 / (1p31.1-21.1)	Неизвестен	Усложнена HSP • Нарушен слух; персистиращо повръщане в резултат на хиатусна херния (наследствена)	Orlacchio et al 2005
<i>REEP1</i> / SPG31	Експресия на рецептор – повишаващ протеин 1	Не-усложнена HSP или случайно асоциирана с периферна невропатия	Zuchner et al [2006a] , Zuchner et al [2006b] , Beetz et al [2008]
<i>ZFYVE27</i> / SPG33	Protrudin	Не-усложнена HSP	Mannan et al [2006]
SPG36 / (12q23-q24)	Неизвестен	• Начало: 14-28 години • Моторно сензорна невропатия	Schule et al [2009]
SPG37 / (8p21.1-q13.3)	Неизвестен	Не-усложнена HSP	Hanein et al [2007]
SPG38 / (4p16-p15)	Неизвестен	В 5 родственици от една фамилия • Начало - 16-21 години • Атрофия на мускулите на	Orlacchio et al [2008]

		ръцете	
SPG40 (неизвестен локус)	Неизвестен	Не-усложнена HSP - Начало >35 години - АД HSP локуси са изключени	Subramony et al [2009]
SPG41 / (11p14.1-p11.2)	Неизвестен	В една китайска фамилия - Начало: юношество - Лека слабост на мускулите на ръцете	Zhao et al [2008]
SLC33A1 / SPG42	Транспортер на Acetyl - coenzyme A	Не-усложнена HSP в едно дете - Начало: 4-40 г. - вероятно непълна пенетрантност	Lin et al [2008] , Lin et al [2010] , Schlipf et al [2010]

Болестните миссенс мутации се срещат предимно в GTPase домен, което е съпроводено с намаляване на каталитичната активност на протеина. Допуска се, че те проявяват доминантно-негативен ефект върху дивия тип, тъй като протеиновата молекула има тетрамерна структура.

Пенетрантността на патологичните варианти е висока (~80%-90%) (Durr et al 2004). Патогенният вариант p.Arg415Trp има най-ниска пенетрантност (30%). *ATL1* патогенни варианти са установени при голям брой (30%-50%) от ранните форми на HSP с начало преди 10 годишна възраст (Abel et al 2004, Durr et al 2004) и при 10% - 15% от всички случаи с автозомно-доминантен тип наследяване на HSP. Патогенни алелни варианти в *ATL1* гена са представени в табл. 2.

Таблица 2. Част от *ATL1* патогенни варианти

mRNA нуклеотидна замяна	Аmino-киселинна замяна	Референтни секвенции
c.1243C>T	p.Arg415Trp ²	NM_015915.4 NP_056999.2
c.467C>T (635C>T)	p.The156Ile	
c.715C>T (884C>T)	p.Arg239Cys	
c.773A>G (942A>C)	p.His258Arg	
c.479T>G (638T>C)	p.Leu157Trp	
c.1270dupA (1688insA)	p.Ile424AsnfsTer16 (522Stop)	

В случаите, когато не се диагностицира патогенна мутация, не може да се изключи SPG3A, тъй като все още не е известна честотата на мутациите в не-кодиращи райони на гена.

SPG3A трябва да бъде диференцирана от други АД HSP като:

- SPG4 тип, предизвикан от патогенни варианти в *SPAST* гена, кодиращ spastin (Blair et al 2007).

Генният продукт играе роля за функциониране на клетъчните микротубули, които участват във вътреклетъчния транспорт и в клетъчното делене. Той има значение за микротубулната динамика и за дезорганизиране структурата на микротубулите, когато не са необходими повече. *SPAST* е експресиран в човешките тъкани на фетуса и възрастни и има по-висока експресия във феталния мозък.

SPAST-асоциираната HSP се наследява по автозомно доминантен тип и се характеризира с непълна пенетрантност.

SPAST генът може да премине през алтернативен сплайсинг с включване на вариабилни части от екзон 4. В нервната система на възрастни, най-честата изоформа на генния продукт spastin не включва екзон 4. В екзон 4 не са описани мутации.

Патогенните варианти са от типа на missense (31%), nonsense (~10%) и splice site мутации (~26%), малки делеции (~22%) и инсерции (~11%), водещи до изместване на рамката на четене (frameshift) и големи делеции. Повечето точкови мутации, с изключение на missense, водят до създаване на преждевременен стоп кодон.

Таблица 3. Част от *SPAST* патогенни варианти

mRNA нуклеотидна замяна	Амино-киселинна замяна	Референтни секвенции
c.131C>T (C256T)	p.Ser44Leu ²	NM_014946.3 NP_055761.2
c.134C>A (C259A)	p.Pro45Gln ²	
c.879G>A (1004G>A)	p.Pro293Pro	
c.334G>A	p.Glu112Lys	
c.1157A>G	p.Asn386Ser	

Мутациите в AAA домен на *SPAST* гена се проявяват вероятно с доминантно-негативен ефект (Errico et al 2002). Резултатите на McDermott et al, 2003, 2006 показват, че мутантният spastin взаимодейства абнормно с микротубулите, променя разпределението на вътреклетъчните органели (като митохондрии и пероксизоми) и дезорганизира дългите кортико-спинални аксони, лежащи в основата на молекулната патогенеза на наследствените спастични параплегии.

За разлика от късата изоформа на spastin, експресията на дългата изоформа променя нормалния растеж на аксона и инхибира аксоналния транспорт. Тези резултати фаворизират хипотезата за “gain-of-function” механизъм, определящ HSP (Solowska et al 2008). Фактът, че голяма част от мутациите в гена *SPAST* са свързани предимно със създаване на предварителен стоп кодон, подкрепя тезата за хаплоинсуфициенция (т.е., болестта възниква при ниво на функционалния spastin под критичното ниво) (Patrono et al 2002, Schickel et al 2007). В подкрепа на тази хипотеза са наблюденията, че при подтискането на spastin се нарушава структурата на микротубулите и развитието първичните хипокампални неврони, което води до абнормна морфология на невроните, дистрофичен неврит и дефектен растеж на аксоните (Riano et al 2009)

- SPG6 (OMIM 600363) с генен дефект в *NIPA1*, кодиращ транспортера на магнезий (*NIPA1*) (Bien-Willner et al 2006).
- SPG10 (OMIM 604187), дължащ се патологични мутации в *KIF5A* (кодиращ kinesin 5A) (Reid et al 2002).
- SPG42 (OMIM 612539) при патогенен вариант в *SLC33A1* (кодиращ acetyl-coenzyme A transporter 1) (Lin et al 2008).

Обобщени данни за автозомно рецесивната форма на наследствената спастична параплегия (AR HSP) са представени на табл. 4.

Таблица 4. Автозомно рецесивни форми на наследствената спастична параплегия (AR HSP)

Ген / Локус Наименование (хромозомен локус)	Протеин	Клиничен синдром	Справка
<i>CYP7B1</i> / <i>SPG5A</i>	CYP7B1 протеин	Неkomplицирана или комплицирана с: • Асонална невропатия • Дистална или генерализирана мускулна атрофия • Аномалии на бялото вещество при изследване с MRI	Hentati et al [1994a] , Wilkinson et al [2003] , Muglia et al [2004] , Tang et al [2004] , Tsaousidou et al [2008] , Biancheri et al [2009] , Criscuolo et al [2009]
<i>SPG7</i> / <i>SPG7</i>	Paraplegin	Неkomplицирана или вариабилно комплицирана с: • Митохондриални аномалии на биопсия на скелетните мускули • Дизартрия, дисфагия, блед оптичен диск, аксонална невропатия, данни за васкуларни лезии, церебеларна атрофия при MPT	Garner et al [1990] , DeMichele et al [1998]
<i>SPG11</i> / <i>SPG11</i>	Spatacsin	50% от AR HSP Неkomplицирана или вариабилно комплицирана с: • Хипоплазия на corpus callosum, изоставане в интелектуалното развитие, слабост на горните крайници, дизартрия, нистагъм • ‘Kjellin’ синдром (начало в детската възраст, прогресивна спастична параплегия с пигментна ретинопатия, изоставане в интелектуалното развитие, дизартрия, деменция, дистална мускулна атрофия) • Ювенилна, бавно прогресираща ALS	Martinez Murillo et al [1999] , Winner et al [2004]

SPG14 (3q27-q28)	Неизвестен	Комплицирана HSP в 3 членове на Италианска фамилия с кръвно родство - Начало: ~30 години - изоставане в интелектуалното развитие и дистална моторна невропатия	Vazza et al [2000]
ZFYVE26 / SPG15	Zinc finger FYVE domain-сдържащ протеин 26	Комплицирана HSP Вариабилна клиника: пигментна макулопатия, дистална амиотрофия, дизартрия, изоставане в интелектуалното развитие (Kjellin синдром)	Hughes et al [2001] , Hanein et al [2008]
ERLIN2 / SPG18	Erlin-2	Комплицирана HSP в 2 фамилии - изоставане в интелектуалното развитие и хипоплазия на corpus callosum - мутации в гена <i>ERLIN2</i> също идентифицирани в лица с ювенилна първична латерална склероза	Al-Yahyaee et al [2006] , Alazami et al [2011] , Al-Saif et al [2012]
SPG20 / SPG20	Spartin	Комплицирана HSP Загуба на дистални мускули (синдром на Troyer)	Cross & McKusick [1967] , Crosby et al [2002] , Patel et al [2002] , Proukakis et al [2004] , Lu et al [2006]
SPG21 / SPG21	Maspardin	Комплицирана HSP Деменция, церебеларни и екстрапирамидни прояви, хипоплазия на corpus callosum, аномалии на бялото вещество (Mast синдром)	Simpson et al [2003]
SPG23 / (1q24-q32)	Неизвестен	Комплицирана HSP - начало: в детството - Аномални кожни пигментации (витилиго), преждевременно побеляване, характерен фациес; Lison синдром	Blumen et al [2003]
SPG24 / (13q14)	Неизвестен	Комплицирана HSP - начало: в детството - Вариабилна клиника: спастична	Hodgkinson et al [2002]

		дизартрия и псевдобулбарни прояви	
SPG25 / (6q23-q24.1)	Неизвестен	В 4 членове на кръвнородствена Италианска фамилия • начало: 30-46 години • Болки в шията и гърба, свързани с дискови хернии и спастична параплегия и друга периферна невропатия	Zortea et al [2002]
SPG26 / (12p11.1-q14)	Неизвестен	Комплицирана HSP в 5 членове на бедуинска фамилия с кръвно родство • Начало: 7-8 години • Прогресивна спастична паразареа с дизартрия и дистална амиотрофия на горни и долни крайници • Нормална проводимост на нервите • Слабо нарушение на интелекта, мозък в норма при изследване с МРТ	Wilkinson et al [2005]
SPG27 / (10q22.1-q24.1)	Неизвестен	Некомплицирана HSP в 7 членове на една фамилия • Начало 25-45 години • Комплицирана HSP при 3 членове • атаксия, дизартрия; нарушен интелект, сензорно-моторна полиневропатия, лицев дисморфизъм, нисък ръст	Meijer et al [2004] , Ribai et al [2006]
<i>DDHD1</i> / SPG28 (14q21.3-q22.3)	DDHD1	Комплицирана или некомплицирана HSP • Начало: от детство до възрастни • Вариабилни прояви: аксонална невропатия, дистална сензорна невропатия, и церебеларни нарушения на движението на очите	Bouslam et al [2005] , Tesson et al [2012]
<i>KIF1A</i> / SPG30	KIF1A	Комплицирана HSP • Загуба на дистални мускули, сакадични очни движения, периферна невропатия, леки церебеларни признаци	Klebe et al [2006]
SPG32 / (14q12-q21)	Неизвестен	Слабо нарушение на интелекта, клинично асимптомна церебеларна атрофия	
<i>FA2H</i> / SPG35	Fatty acid 2-	Комплицирана HSP в деца от Оман и	Dick et al

	hydroxylase	Пакистан - Начало: 6-11 години - Екстрапирамидални прояви, прогресивна дизартрия, деменция, припадъци - Абнормално бяло мозъчна вещество и натрупване на желязо в мозъка	[2008], Dick et al [2010], Kruer et al [2010]
<i>PNPLA6</i> /SPG39	Neuropathy target esterase (NTE)	Комплицирана HSP Загуба на мускулна маса на горни и долни крайници	Rainier et al [2008]
C19orf12 / SPG43	C19orf12	В 2 сестри от Мали - Начало: 7 - 12 години - Прогресивна спастична параплегия с атрофия на мускулите на ръцете, дизартрия	Meilleur et al [2010]
<i>GJC2</i> / SPG44	Gap junction protein GJA12/GJC2, connexin 47 (Cx47)	Комплицирана HSP - Начало: 1-во-2-ро десетилетие - Лек фенотип с когнитивни нарушения, бавно прогресираща спастична параплегия, дизартрия, обхващане на горни крайници - MPT дава данни за хипомиелинизираща левкоенцефалопатия - Подобна на болестта на Pelizeaus-Merzbacher (PMLD, ранно демиелинизиращо нарушение с нистагъм, психомоторно изоставане, прогресивна спастичност, атаксия) - мутация в гена <i>GJA/GJC2</i>; Ile33Met	Orthmann-Murphy et al [2009]
SPG45 / (10q24.3-q25.1)	Неизвестен	Комплицирана HSP при 5 членове на Турска фамилия с кръвно родство - Начало: <1 година - Понижен интелект, спастичност на долни крайници и контрактури - Оптична атрофия в 1 индивид - Нистагъм в 2-ма индивиди - Нормален MRI при 1 индивид	Dursun et al [2009]
<i>GBA2</i> / SPG46	Не-лизозомна glucosylceramidase	Деменция, вродена катаракта, атаксия, хипоплазия на corpus callosum	Boukhris et al [2010]

<i>AP4B1</i> / SPG47	AP-4 комплекс субединица beta-1	Комплицирана HSP в 2-ма сибси от кръвнородствена Арабска фамилия - Начало: ранно детство - Бавно прогресираща спастична парапареза, намален интелект, припадъци - Вентрикуломегалия при 1-ния сибс; хипоплазия на corpus callosum и перивентрикуларна аномалия на бялото вещество при другия сибс.	Blumkin et al [2011]
<i>AP5Z1</i> / SPG48	AP-5 комплекс субединица zeta-1	Некомплицирана HSP при 2-ма сибси с хомозиготни мутации Начало: 6-то десетилетие ‘Спорадична спастична параплегия при 1 индивид с хетерозиготна мутация Анализ на гена <i>KIAA0415</i> при 166 неродствени болни (38 рецесивна; 64 доминантна, 64 спорадична) и контроли	Slabicki et al [2010]
<i>TECPR2</i> / SPG49	Tectonin beta-propeller repeat-containing protein 2	Комплицирана HSP при 5 лица от 3 несвързани фамилии с произход от Jewish Bukharian - Начало: в детството - Хипотония, забавено развитие с тежки когнитивни нарушения, дисморфични черти (нисък ръст, микроцефалия, абнормални изменения в областта на уста, зъби, лице) - Спастична, атаксична и ригидна походка - Други: гастроезофагеален рефлукс, рекурентни епизоди на апнея, леки дисморфични черти - Епилепсия при 2-ма индивида - Хипоплазия на corpus callosum и церебеларна атрофия при изследване на МРТ в 2-ма индивида	Oz-Levi et al [2012]
<i>AP4M1</i> / SPG50	AP-4 комплекс субединица mu-1	В 5 членове на кръвнородствена Мароканска фамилия - Начало: в детството - Не-прогресивна спастична квадриплегия с тежки когнитивни нарушения	Verkerk et al [2009] , Najmabadi et al [2011]

		• Вариабилни прояви • Вентрикуломегалия, авнормално бяло вещество и вариабилна церебеларна атрофия • Навроаксонални аномалии, глиоза, и редуциран миелин при пост-мортем изследване	
AP4E1 / SPG51	AP-4 комплекс субединица epsilon-1	Комплицирана HSP при 2-ма от кръвнородствена фамилия от Палестина и 2-ма сибси от Сирийска кръвнородствена фамилия • Микроцефалия, хипотония, изоставане в психомоторното развитие, спастична тетраплегия, значителни когнитивни, лингвистични нарушения, лицев дисморфизъм; атрофия и дифузна загуба на бяло мозъчно вещество (MPT изследване) • Вариабилни прояви на припадъци	Abou-Jamra et al [2011] , Moreno-De-Luca et al [2011] , Najmabadi et al [2011]
AP4S1 / SPG52	AP-4 комплекс субединица sigma-1	5 члена на Сирийска кръвнородствена фамилия • Неонатална хипотония и тежки когнитивни нарушения • Прогресивна ранна спастична параплегия, микроцефалия, нисък ръст, лицев дисморфизъм	Dell'Angelica et al [1999] , Hirst et al [1999] , Abou-Jamra et al [2011]
VPS37A / SPG53	Вакуоларна протеин сортираща-асоциирана с протеин 37A	Комплицирана HSP в 9 лица от 2 Арабски Moslem фамилии • Забавено развитие, прогресивна спастичност на долни крайници, и съответно прогресивни нарушения на горни крайници; скелетен дисморфизъм (кифоза и rectus carinatum); леки до средни когнитивни нарушения; вариабилна хипертрихоза	Zivony-Elboum et al [2012]
DDHD2 / SPG54	DDHD2	Комплицирана HSP в 4 неродствени фамилии • Начало: <2 години • Забавено психомоторно развитие, когнитивни нарушения, прогресивна спастичност (контрактури на краката),	Al-Yahyaee et al [2006] , Schuurs-Hoeijmakers et al [2012]

		хипоплазия на corpus callosum, перивентрикуларни аномалии на бялото вещество • Вариабилни прояви: дизартрия, дисфагия, страбизъм, хипоплазия на зрителния нерв	
<i>C12orf65</i> / SPG55	C12orf65, митохондриялна	Комплицирана HSP в 2 японски братя на не-кръвнородствени родители • Начало: в детството • Вариабилни прояви: намалена зрителна острота (с централна скотома и атрофия на оптичния нерв), редуцирана сила и сръчност на горни крайници, атрофия на мускулите на долните крайници, моторно сензорна невропатия	Antonicka et al [2010] , Shimazaki et al [2012]
<i>CYP2U1</i> / SPG56	Cytochrome P450 2U1	Комплицирана HSP в 5 неродствени фамилии • Начало: в ранното детство • Вариабилни прояви: дистония на горни крайници, когнитивни нарушения, хипоплазия на corpus callosum, нарушения на бяло мозъчно вещество, аксонална невропатия, калцификация на базалните ганглии	Tesson et al [2012]
<i>GAD1</i> / (некласирана SPG)	Glutamate decarboxylase 1	В 4 сибси от кръвнородствена Пакистанска фамилия • Спастична церебрална парализа и умерен до тежък интелектуален дефицит	Mitchell & Bunday [1997] , McHale et al [1999] , Lynex et al [2004]
SPOAN syndrome / (11q13)	Неизвестен	Комплицирана HSP: • Спастична параплегия, асоциирана с оптична атрофия, невропатия (SPOAN)	Macedo-Souza et al [2005]

5p15.31-14.1 (некласирана SPG)	Epsilon субединица на цитозолния chaperonin- съдържащ t- комплекс пептид-1 (Cct5)	Комплицирана HSP асоциирана с инвалидизираща сензорна невропатия	Bouhouche et al [2006a] , Bouhouche et al [2006b]
--------------------------------------	---	---	---

В таблица 5 са представени основните клиничко-генетични характеристики на X свързаната форма на наследствената спастична параплегия

Таблица 5. Наследствена спастична параплегия – X-свързана форма

Ген / Локус Наименование (хромозомен локус)	Протеин	Клиничен синдром	Справка
<i>L1CAM</i> /SPG1	Нервно-клетъчни адхезионни молекули L1	Комплицирана HSP - Нарушения на интелекта - Вариабилни прояви: хидроцефалия, афазия	Jouet et al [1994]
<i>PLP1</i> / SPG2	Myelin proteolipid protein	Комплицирана HSP Вариабилни прояви: CNS аномалии на бяло мозъчно вещество на МРТ; периферна невропатия	Kobayashi et al [1994] , Saugier-Weber et al [1994] , Cambi et al [1996] , Hudson [2003]
<i>SPG16</i> / (Xq11.2)	Неизвестен	Не-комплицирана или комплицирана: Моторна афазия, редуцирано зрение, нистагъм, леко нарушен интелект, дисфункция на черва и пикочен мехур	Steinmuller et al [1997] , Tamagaki et al [2000]
<i>SLC16A2</i> /SPG22	Monocarboxylate transport 8	Комплицирана HSP (Allan-Herndon-Dudley синдром) Начало: вродено	Allan et al [1944] , Marx [1991] , Bialer et al [1992]

		• Мускулна хипотония на врата в детството, нарушен интелект, дизартрия, атаксия, спастична параплегия, лицеви аномалии	
SPG34 / (Xq24-q25)	Неизвестен	• Не-комплицирана Начало: 12-25 години	Macedo-Souza et al [2008]

Таблица 6. отразява обобщени данни за митохондриалната форма на HSP

Клинико-генетичната хетерогенност на Редките болести поставя големи изпитания пред клиницистите.

Таблица 6. Наследствена спастична параплегия – наследена от майката по митохондриален път

Ген / Локус (хромозомен локус)	Протеин	Клиничен синдром	Справка
Некласирана <i>SPG</i>	Митохондриален <i>ATP6</i> ген	Прогресивна спастична параплегия • Начало: възрастни • Леки до тежки симптоми • Вариабилни прояви: аксонална невропатия, късна деменция и кардиомиопатия	Verny et al [2011]

Само мултидисциплинарен екип от лекари може да има успех и да предостави качествени услуги на пациентите с Редки болести, базирани на добрата медицинска практика. С тази задача могат да се справят Центровете за високи постижения. Добър пример е създаване на Център за болести на съединителната тъкан (БСТ), в който функционира мултидисциплинарен екип за диагностиката и лечението на деца със скелетни дисплазии (прекомерната нисък ръст) включително остеогенезис имперфекта (чупливи кости). В новосъздаден Експертен център по компетентност има различни експерти по: клинична генетика (включително генетични консултанти), по детска рехабилитация, костно-минерална медицина, ортопедична хирургия, физиотерапия, трудова терапия, костна

денситометрия, ортезни и юношеска медицина. Те предоставят цялостна мултидисциплинарна услуга, която е специализирана за остеогенезис имперфекта, Ehlers-Danlos синдроми, скелетна дисплазия, синдром на Марфан, артрогрипоза и Mucopolysaccharidoses. Като цяло мултидисциплинарната услуга е предназначена за деца с едно от около 600 редки заболявания с подобна клинична симптоматика. Групирането на клиничните прояви на шестте разнородни заболявания в една основна група, обгрижвана от специализиран мултидисциплинарен екип, е икономически ефективна стратегия, тъй като осигурява качествена диагностика и "терапия" за нуждаещите се пациенти. Осезаемите ползи от мултидисциплинарни услуги са: подобряване състоянието на пациентите, подобро качество на живот.

1.5.Спектър на вариациите в човешкия геном

NGS технологията, при която се извършва секвениране с ново поколение секвенатори, откри нова ера в геномните анализи. Тя стана достъпна за поставяне на генетична диагноза на пациенти с редки болести, тъй като има големи предимства пред традиционното секвениране по Сангер: изследването се извършва с безпрецедентна бързина (Hayden E.C., 2008). Тези анализи допринасят за определяне на предразположеност към болести и за развитие на персонализирана медицина. За постигане на тези цели е необходимо да се определят генетични варианти в човешкия геном.

Молекулната генетика и технологиите за секвениране доведоха до разкриване на многобройни варианти с малки размери, като мини- и микросателитни ДНК последователности (VNTR) (Nakamura Y, et al., 1987; Jeffreys AJ, 1985; Litt M and Luty JA., 1989), малки инсерции/делеции (INDELs – с дължина от 1 to 10 000 bp) (Mills R.E., et al., 2006) и полиморфизми на единични нуклеотиди (SNP), които представляват промени на единични бази в ДНК последователността (Sachidanandam R, et al., 2001; The International SNP Map Working Group., 2001; International HapMap Consortium 2003), както и малки субституции. В допълнение, към тези варианти също се включват варианти в броя на копия (CNVs), структурни варианти (SVs) и инсерции на мобилни елементи (MEIs - Mobile Element Insertions). Такива варианти могат да се открият при всеки след сравнение с последователността на референтния човешкия геном.

Понятието "вариране" или "вариант" се отнася до алелна последователност, която се различава от референтната последователност по най-малко една нуклеотидна база или по по-дълга секвенция. Като цяло разликата между "вариант" и "полиморфизъм" е, че полиморфизмите по дефиниция са променливи локуси в рамките на една или между групи от населението. "Вариантът" не дава информация за степен на полиморфизъм. Поради тази причина, понякога се използва термина единичен нуклеотиден вариант (SNV) вместо SNP (единичен нуклеотиден полиморфизъм). Въпреки това, в литературата продължава да се използва акронима SNP, тъй като е широко приет, въпреки че не е точен.

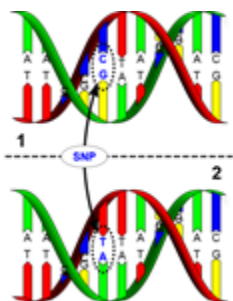
Компанията Complete Genomics (Complete Genomics) е секвенирала повече от 20,000 човешки геноми с цел да бъде определена ролята на вариантите за здравето на индивидите

и за развитието на нови терапии. Вариантите за всеки алел се определят чрез сравняване на техните секвенциите с референтна последователност. Този сравнителен процес се извършва за всеки от двата алела на всеки автозомен локус. Близко разположени варианти на единия или на двата алела се групират заедно като един вариантен локус (single variant locus).

1.5.1. Единични нуклеотидни полиморфизми (SNP)

Единичните нуклеотиди полиморфизми дълго време се смятаха като основен източник на различия в човешкия геном. Съвместните усилия на международни научни колективи доведоха до идентифицирането и генотипирането на значителна част от предполагаемите 15 милиона картирани refSNP (rs - номер) в човешкия геном (International HapMap Consortium 2005).

Единичните нуклеотиди полиморфизми (SNP) са вариации в една и съща ДНК последователност между различни индивиди, дължащи се на замяна на един нуклеотид (A, T, C или G), които се срещат с висока честота в популациите (фиг. 3). SNPs се характеризира с честота на „редкия“ алел над 1% (minor allele frequency). Популационната им честота е различна за различни популации и етнически групи.



Фигура 3. Двете ДНК последователности (1 и 2) се различават по една базова двойка (т.е. в този локус има два алела).

Почти всички SNPs варианти имат два алела. Най-често те са локализирани в некодиращи райони, в междугенни райони и много по-рядко в кодиращи. SNPs в кодиращите райони на гените могат да бъдат:

- синонимни (не променят структурата на протеина)
- не-синонимни варианти - missense (водят до замяна на аминокиселина в протеина) и nonsense (води до образуване на преждевременен стоп кодон).

Missense мутациите нарушават функцията на протеина в различна степен – от слаб ефект (при замяна с аминокиселина с подобен размер и физико-химични свойства, напр. замяна на левцин с валин) до силен ефект (ако засегнат вторични структурни елементи). Когато SNP води до промяна на аминокиселинната последователност, важно е да се знае локализацията на аминокиселината в структурата на протеин. Ако заменената аминокиселина е разположена в активния център на протеина, тя с голяма вероятност ще повлияе на функционалната му активност. Броят на новооткритите missense варианти нараства ежедневно. Един от най-сложните проблеми при интерпретиране на резултати от секвенирането с NGS технологии е определяне на патогенност, диагностична стойност и клинично значение на вариантите водещи до аминокиселинни замени. Разработени са много програми за предсказване ефекта на SNPs (MAPP, nsSNPAnalyzer, PANTHER, PhD-SNP, SIFT, PolyPhen-1, PolyPhen-2 and SNAP), но те трудно могат да бъдат сравнени помежду си.

- MAPP предиктор - предсказва ролята на всички възможни аминокиселинни субституции върху функцията на протеина. Предиктор на патологичния ефект на SNPs (разработен от Emidio Capriotti, Remo Calabrese, Rita Casadio)
- nsSNPAnalyzer (<http://snpanalyzer.uthsc.edu/>) - предсказва вероятност за фенотипен ефект на несинонимни еднонуклеотидни замени; дава допълнителна информация за структурата на съседните секвенции. Този анализатор използва информация от сравняване на множество последователности (multiple sequence alignment) и пространствената триизмерна структура на протеина (Bao et al., 2005). При липса на данни за протеина, се използва структурата на хомоложен протеин (взета от ASTRAL база данни), определя се вероятност за разтворимост, поларитет и вторична структура при настъпилата субституция, извършва се alignment и се генерира SIFT предикция. Ако няма структурен аналог, не може да се извърши предикция.
- PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) (<http://www.pantherdb.org/about.jsp>) – представлява система за класификация на протеините и техните гени с цел да се улесни високо-резолютивния анализ. В ерата на геномиката един от най-важните приоритети е характеризиране на функцията на

протеините. За тази цел е създаден метод PANTHER, с който се осъществява връзка между структурата на протеина и неговата функция. Протеините са класифицирани според следните характеристики (Thomas et al., Genome Research 2003; Mi et al. NAR 2005):

- фамилия (група от еволюционно свързани протеини) и субфамилия (родствани протеини с една и съща функция);
 - молекулна функция на протеина или на протеини, с които има директни взаимодействия на биохимично ниво, напр. протеин киназа;
 - биологични процеси, при които функцията на протеина се реализира в големи биохимични мрежи и се отразява на ниво клетки или органи;
 - пътища, подобни на биологичните процеси, но също така са специфично свързани с взаимодействие на молекули.
- PhD-SNP предиктор – той е базиран на класификация със Support Vector Machine (SVM) и тестване и информация за протеиновата последователност.

PhD-SNP е оптимизиран, за да предскаже дали единична аминокиселинна замяна може да бъде класифицирана или като свързана с болест, или като неутрален полиморфизъм. Необходимите въвеждани данни са:

- Протеинова секвенция – представена като Swiss-Prot или като текстов файл;
- Позиция – номера на позицията в секвенцията, в която е настъпила мутация;
- Специфична мутация – представя се символа на мутантната аминокиселина;
- Предикция – избира се предиктор базиран на секвенция или секвенция и профил;
- Множествен SVM – ако се прави предикция чрез 20 вариантен SVM модел или крос-валидираща процедура или единичен SVM модел
- SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant) – предсказва ефектът на аминокиселинната субституция върху функцията на протеина, базиран на степен на консервативност на аминокиселинни последователности между близки секвенции и на физичните характеристики на аминокиселините;

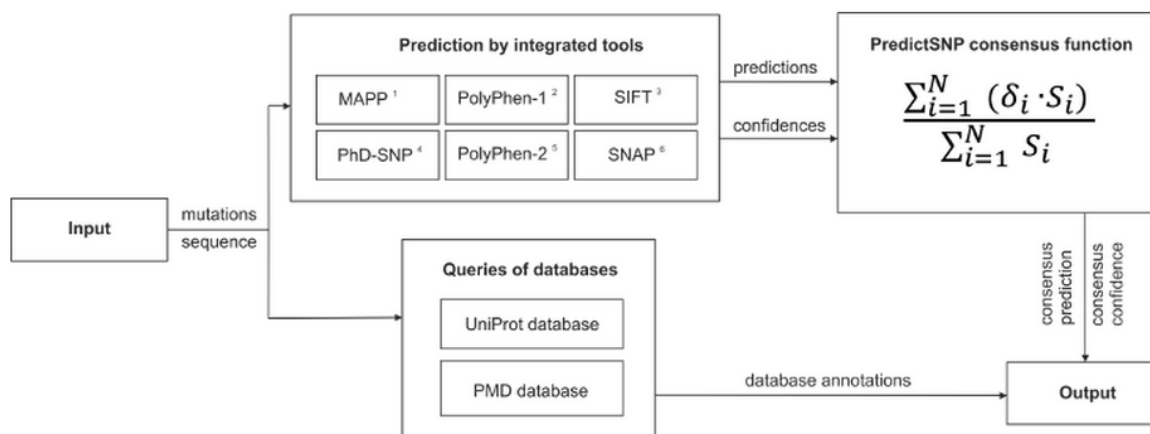
- PolyPhen-2 (PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) - средство за предсказване на вероятния ефект на аминокиселинната замяна върху структурата и функцията на протеина) чрез използване на структурни и сравнителни еволюционни съображения. Той извършва функционална анотация на SNP, картира го върху генния транскрипт, аотира протеинната секвенция и създава консервативни профили. На базата на тези характеристики, определя вероятния функционален ефект на миссенс мутацията (Adzhubei I. et al., 2013);

Flanagan et al., 2010 определят чувствителността на двата предиктора SIFT и PolyPhen-2 като относително висока (съответно 69% и 68%), но тяхната специфичност е ниска (13% и 16%). Двете програми са по-добри за предсказване на функционална активност на мутации със загуба на функция в сравнение с придобиване на функция (SIFT, $p = 0.001$; PolyPhen, $p \leq 0.0001$). Най-достоверният подход за определяне на вероятна патогенност на missense вариантите се основава на определяне на консервативност на засегнатите секвенции. Около 88% от патогенните мутации засягат консервативни райони, докато бенигнените варианти са локализирани в райони, които са полиморфни при много видове. Според авторите, двете програми са полезни за приоритизиране на промени, които предизвикват загуба на функция на протеина, но тяхната предиктивна стойност трябва да се приема внимателно, поради тяхната ниска специфичност. При откриване на нови missense варианти, са необходими допълнителни доказателства за потвърждаване или отхвърляне на патогенния ефект.

- PredictSNP (Consensus classifier for prediction of diseases-related mutations)

Резултатите са по-реалистични при приложение на консенсусен подход, който компенсира слабостите на отделни калкулатори (Bendl J et al, 2014). Шест от най-добрите индивидуални предиктори са комбинирани в консенсусен класификатор PredictSNP, който значително подобрява предиктивните резултати за мутациите. Интернет сървърът и базата данни са свободно достъпни (<http://loschmidt.chemi.muni.cz/predictsnp>).

Отделните етапи при определяне на предиктивната стойност на SNPs са отразени на фиг. 4 (Consensus classifier for prediction of disease-related mutations):



[1] Stone, E. et al. (2005) *Genome Research*, 7, 978-986

[2] Sunyaev, S. et al. (2001) *Human Mol. Gen.*, 6, 591-597

[3] Adzhubei, I. et al. (2010) *Nature Methods*, 4, 248-249

[4] Capriotti, E. et al. (2006) *Bioinformatics*, 22, 2729-2734

[5] Kumar, P. et al. (2009) *Nature Protocols*, 7, 1073-1081

[6] Bromberg, Y. et al. (2007) *Nucleic Acids Research*, 11, 3823-3835

Фигура 4. Етапи при определяне на предиктивната стойност на SNPs

1.5.2. Експресионни SNPs (eSNP)

Експресионни SNPs (eSNP - expression SNP) са тези, които не са локализирани в кодиращи райони, но могат да засегнат сплайсинга, местата за свързване на транскрипционни фактори, деградацията на mRNA, последователности в не-кодираща RNA.

Yen-Tsung Huang et al., 2014 провеждат задълбочени анализи за разкриване на ролята на SNPs варианти за генната експресия при изследване на комплексни заболявания. Генетичната база на комплексните заболявания най-често се изследва чрез цялостни геномни асоциативни анализи (GWAS Genome-wide association studies). Авторите се отнасят критично към асоциативните изследвания, тъй като те не са базирани на биологично знание (Hunter and Chanock, 2010) и предлагат статистическият анализ да интегрира данните за множеството маркери с биологичия модел и физична локализация (Wu et al. 2010). Yen-Tsung Huang et al., 2014 считат, че генната експресия е факторът, който определя риска за заболяване. Те разглеждат генната експресия като медиатор между SNP и нарушените молекулни пътища, които водят до заболяване. SNP-овете, които регулират mRNA експресия на гена се наричат експресионни локуси за количествени признаци (eQTL-expression Quantitative Trait Loci) (Schadt et al., 2003). От статистическа гледна точка, eQTL SNPs се разглежда като e SNPs, който корелира с експресия на mRNA на гена. Cis-eQTL SNPs са тези SNPs, които са вътре или около съответния ген, а trans-

eQTL SNPs са далече от гена, даже на други хромозоми. Многобройните цялостни геномни eQTL анализи (genome-wide eQTL analyses) са базирани на DNA-RNA (т.е. SNPs-генна експресия) асоциативни геномни анализи. Резултатите от eQTL дават допълнителна информация за приоритизиране на открити локуси за предразположеност от GWAS проучвания (Morley et al., 2004; Innocenti et al., 2011; Hsu et al., 2010; Zhong et al., 2010; Zhang et al., 2012). Разработени са методи за търсене на етиологичното значение на многобройните геномни данни чрез тяхното интегриране в биологични мрежи (Schadt et al., 2005; Zhu et al., 2008; Hageman et al., 2011; Neto et al., 2013).

Биоинформационната база данни за SNPs (dbSNP) е генерирана от the National Center for Biotechnology Information (NCBI) и осигурява свободен достъп до широка колекция от единични нуклеотидни полиморфизми. Трябва да се има предвид, че dbSNP съдържа не само има едно-нуклеотидни вариации, но също така съдържа INDELS, STRs и MNPs (множество нуклеотидни варианти - base nucleotide variations).

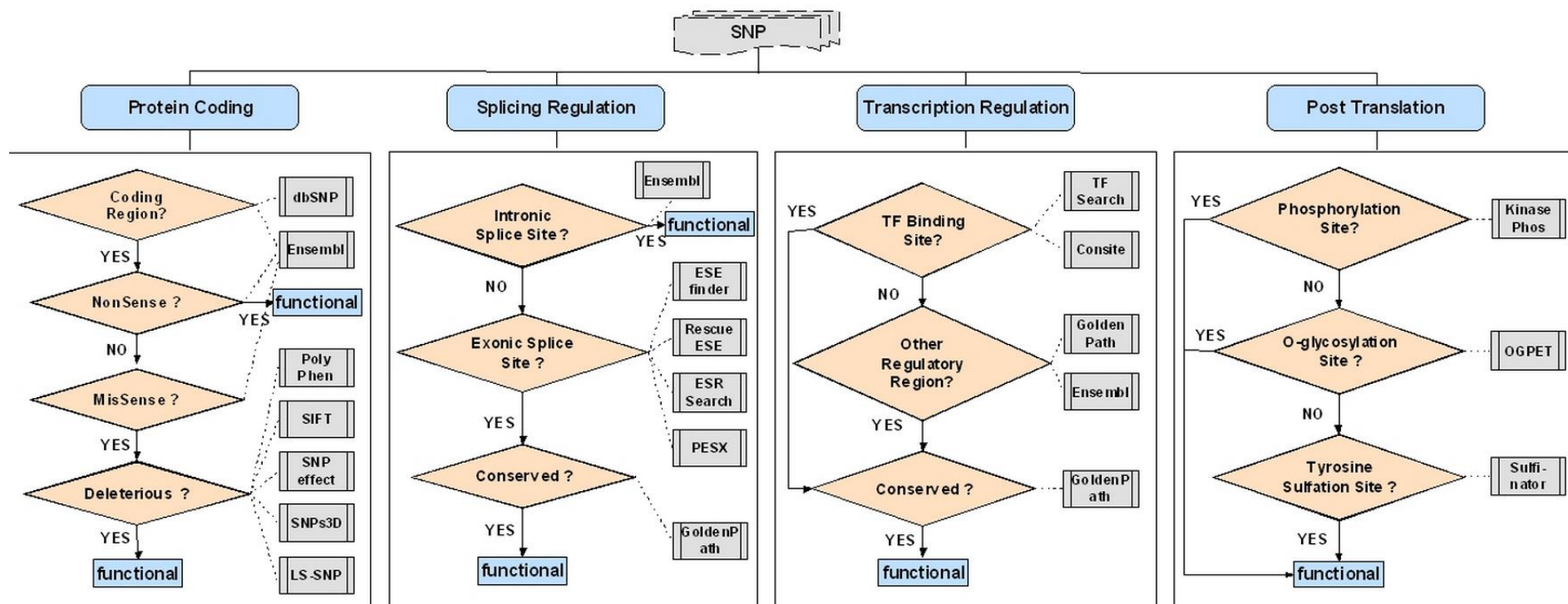
1.5.3. F-SNP

F-SNP са функционални SNPs, специфично приоритизирани за проучване на асоциации с болести. Базата данни за F-SNP (<http://compbio.cs.queensu.ca/F-SNP/>) дава интегрирана информация за функционалните ефекти на SNPs, екстрахирана от 16 биоинформационни бази данни. Функционалните предиктори за патологични SNP използват информация за нарушения, настъпили на различни нива (регулация на сплайсинга, на транскрипцията, на трансляцията и пост-трансляцията) и помагат да се номинират SNP-ове с потенциален ефект за човешкото здраве. За всяка категория се провеждат серии от тестова, за да определят дали SNP има функционално значение. Например, за да се прецени дали един SNP има вреден ефект върху кодиращия протеин, първо трябва да се намира на кодиращата област. Използва се Ensembl (Hubbard, T. J. P., et al., 2007), за да се проучи дали това е безсмислена (nonsense) мутация, в този случай SNP се счита за вреден. В противен случай - ако SNP е missense мутация, трябва допълнително да се тества с пет различни програми: PolyPhen (Ramensky, V. and Sunyaev, S., 2002), SIFT (Ng, P. and Henikoff, S. 2001), SNPeffect (Reumers, J., et al., 2005), SNPs3D (Yue, P., et al., 2006), LS-SNP (Karchin, R. et al. 2005), за да се провери дали не-синонимната субституция е вредна.

С тези инструменти SNP-ът може да бъде идентифициран или като вариант с потенциално вредно функционално въздействие (означен функционален) или без патологично значение.

1.5.4. Малки инсерции и делеции (INDELs)

Малките "INDELs" могат да бъдат с дължина до 50 бази, но точната горна граница зависи от региона и покритието. Въпреки факта, че малките INDELs се срещат с висока честота в човешкия геном и причиняват големи различия в човешките гени, те са изследвани по-малко, отколкото SNPs-овете и големите структурни промени (Bhangale T.R., et al., 2005; McCarroll S.A., 2006). Малки INDELs са особено трудни за откриване, валидиране, генотипиране и за оценка на фенотипната им изява в норма и патология. През последните години беше постигнат напредък при откриването на малки инсерции/ делеции (INDELs) в човешкия геноми. Няколко милиона малки INDELs са били открити в човешките популации. Броят на INDELs в човешки геноми е на второ място (брой на INDELs – 2145084) след броя на единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs), и по отношение на вариации в базови двойки (SNV). Много от тези INDELs са картирани във функционално важни райони вътре в човешките гени, и вероятно повлияват нормалните признаци при човек и болести. Затова се допуска, че малки INDELs вариации ще играят важна роля в персонализираната медицина (Mullaney J.M., et al., 2010).



Фигура 5. Алгоритъм за идентифициране на SNP вариант с потенциално вредно функционално въздействие (F-SNP)

В табл. 7 са посочени различните типове варианти в човешкия геном.

Таблица 7. Дефиниция на различни типове варианти в dbSNP (McEntyre J, et al., 2002)

Типове dbSNP варианти	Правила за дефиниране на алелни типове	Примери за дефиниция на алел
Единични нуклеотидни вариации (SNVs)a	Субституция на единична база: A, T, C, или G. Формално се нарича “SNP”. Името се промени на “SNV”, за да се подчертае, че dbSNP база данни съдържа, както редки, така и полиморфни варианти.	A/T
Делеционно/Инсерционни вариации (DIVs)a	Изписва се пълната секвенция на инсерцията като един алел, и “-” за да се посочи делетирания алел. Този клас се определя като вариант, ако вариантите алели са с различна дължина или ако единият алел е делетиран (“-”). Формално се нарича Делеция/Инсерция полиморфизъм “DIP”. Името е променено на “DIV”, за да се подчертае, че dbSNP база данни съдържа, както редки, така и полиморфни варианти.	T/-/CCTA/G
Микросателити или къси тандемни повтори (STR)	Алелите се определят чрез представяне на повторените мотиви и броя на копията за всеки алел. Експанзията на алелния повторен мотив, представен в dbSNP с пълната дължина на секвенцията е само приблизителна, тъй като много микросателитни маркери не са напълно секвенирани и са посочени само като количествени вариации.	(CAC)8/9/10/11
Повторени елементи	Прилага се за insertion/deletion полиморфизми на дълги последователности, напр. Alu. Тези вариации често включват делеции “-” индикатор за липсващ повторен елемент.	(Alu) / -
Мулти-нуклеотидни вариации (MNV)a	Определят се като мулти-базови вариации. Формално се нарича “MNP”. Името е променено на “MNV” да се подчертае, че dbSNP база данни съдържа, както редки, така и полиморфни варианти.	GGA/AGT

При по-нови проучвания се сравняват данни от секвенирането с нова генерация секвенатори (NGS технологии) с референтна последователност на човешкия геном (Korbel JO, 2007; Kidd JM, 2008; Tuzun E, et al., 2005); търсят се отклонения от Менделовото

унаследяване и от равновесието на Hardy-Weinberg в данните от HapMap SNP-генотипирането (McCarroll SA, et al., 2006; Conrad DF et al., 2006) и се извърша анализ, базиран на данни, с усъвършенствани статистически методи, с който се прави опит да се открият полезни модели, или взаимоотношения, или връзки между данните, особено когато те са получени от различни източници. Основна цел на извличане на данни е да се открият неизвестни досега варианти от ДНК ресеквениране, които първоначално са били генерирани за разкриване на SNP (Mills RE, et al., 2006). Резултатите от тези цялостни геномни анализи при здрави индивиди са каталогизирани в Database of Genomic Variants (DGV, <http://projects.tcag.ca/variation/>), която предоставя карта на структурните варианти в човешкия геном. Досега регистрираните в DGV копийни варианти покриват около 850 Mb (~30%) от човешкия геном. Все пак, трябва да се има предвид, че тази цифра може да е значително преувеличена. Причините за това са поне две: 1) Повечето проучвания са били базирани на ВАС микрочипове и регистрираните граници на копийните варианти са границите на съответните клонове, макар че размерите на същинските варианти могат да са по-малки. Това води до значително надценяване на размерите на копийните варианти. Тази теза е подкрепена от резултатите от проучването на Perry et al. (2008) с ползване на олигонуклеотидна платформа, които показват, че 88% от установените CNV са с по-малък размер от регистрирания в DGV. Данните от по-прецизни методи, като секвениране от ново поколение показват, че болшинството от копийните варианти са с размер под 50 kb (Korbel JO, et al., 2007, Kidd JM, et al., 2008; Tuzun E, et al., 2005). 2) Данните, получени при различните проучвания варират по отношение на контрола на качеството на резултатите и могат да съдържат различен брой фалшиво позитивни резултати, тъй като малка част са валидирани с различни аналитични платформи (Scherer SW, et al., 2007, Cooper GM, et al., 2007). Като се вземат предвид тези обстоятелства, вероятно по-реална оценка на дела на структурните варианти на човешкия геном е ~5 до 10% (Sharp AJ. et al., 2009). Всички тези проучвания показват, че различията в генома между хората са значително по-големи отколкото се е предполагало, като количествената разлика в генома между всеки двама здрави индивиди е от порядъка на ~5 Mb (Korbel JO, et al., 2007; Redon R, et al., 2006; Tuzun E, et al., 2005). Ето защо понастоящем се приема, че всеки два индивида от човешката популация се различават повече на ниво структурни варианти на генома, отколкото на ниво нуклеотидна последователност (Sebat J., 2007). Определени

класове гени са свръхпредставени в големите по размер копийни варианти. Това са предимно гени, свързани с отговор към външни стимули, като имунен отговор, перцепция, метаболизъм на лекарства и сигнална трансдукция (Tuzun E, et al., 2005; Nguyen DQ, et al., 2006; Sharp AJ, et al., 2006). Това показва, че структурните варианти на генома играят роля в адаптивността към промените във външната среда, което е важно от еволюционна гледна точка. Пример за подобна еволюционна адаптация е намирането на по-голям среден брой копия на гена за слюнчена амилаза (*AMY1*) сред популации, където нишестето е основна съставка на диетата.

1.5.5. Структурни варианти

Въвеждането на технологии за цялостно сканиране на генома за количествени различия с по-голяма разрешителна способност от тази на микроскопския анализ (5-10 Mb) доведе до разкриване на изобилие от субмикроскопски вариации в генома (~50 kb-5 Mb). През 2004 година беше поставено начало на разбирането за обхвата и приноса на копийните варианти (CNV) за нормалното разнообразие сред хората с две основополагащи проучвания, при които са установени множество CNV в човешкия геном на здрави индивиди чрез array CGH (Iafrate AJ et al, 2004; Sebat J et al, 2004). Тези находки са били потвърдени и разширени върху по-обстойни анализи чрез array CGH (Locke DP, et al., 2006; Redon R, et al., 2006; Wong KK, et al, 2007). Прилагат се и други стратегии за изучаване на структурни вариации в генома, при това с резолюция многократно по-висока от тази на ВАС микрочиповете.

Мета-анализите на големи проучвания на нормалните структурни варианти в човешкия геном показва, че тяхното разпределение не е случайно и корелира с разпределението на определени геномни структури, като сегментни дупликации и мобилни елементи (напр. Alu повтори) (Cooper GM, et al., 2007). Около една трета от горещите точки за структурни варианти се откриват в перичентромерните и субтеломерните райони на хромозомите, където има тенденция да се разполагат също и сегментни дупликации (She X, J., et al., 2004; Linardopoulou EV, et al., 2005). Установено е, че районите, съдържащи копийни варианти, са с 4-10 пъти по-голямо съдържание на сегментни дупликации (Sharp AJ, et al., 2005; Sebat J, et al., 2004; Redon R, et al., 2006; Wong KK, et al., 2007). Тази тясна корелация между копийните варианти и сегментните дупликации отразява две особености: 1) много

сегментни дупликации имат вариабилен брой копия (Fredman D, et al., 2004) и могат сами по себе си да бъдат разглеждани като CNV и 2) районите фланкирани от сегментни дупликации имат тенденция да претърпяват не-алелна хомоложна рекомбинация (NAHR - Non-allelic homologous recombination), водеща до поява на рекурентни CNV.

С цел да се изследва еволюционното значение на CNV, Perry et al. (2006), Perry GH, Yang F, Marques-Bonet T et al. (2008) сравняват локализацията и честотата на CNV в генома на човека и шимпанзето, както и със структурните особености на двата генома. Те установяват, че CNV при хората и шимпанзетата се срещат в ортоложни райони на генома много по-често от очакваното и са строго асоциирани с наличието на високо хомоложни вътрехромозомни сегментни дупликации. Теоретичните очаквания за честотата на отпадане на общите полиморфизми показва, че е малко вероятно генетични полиморфизми, съществували в общия предшественик на човека и шимпанзето, да бъдат съхранени в генома на съвременния човек, което е потвърдено от проведените проучвания (Perry GH, et al., 2006). Ето защо, тяхното намиране вероятно отразява появата на рекурентни CNV, а не запазване на ефекта от единично събитие в миналото. Това подсказва, че определени мотиви в ДНК последователността или особености на геномната архитектура, общи за двата генома, могат да предразполагат определени райони към структурна нестабилност и при двата биологични вида (Perry GH, et al., 2008).

Нормалните структурни варианти са предразполагащ фактор за възникване на вторични, асоциирани със заболявания хромозомни пренареждания, независимо че самите те не оказват неблагоприятен ефект върху фенотипа. Те са особености на локалната архитектура на генома, които улесняват възникването на допълнителни хромозомни пренареждания. Установено е, че редица полиморфни инверсии асоциират с по-висок риск за поява на рекурентни микроделеции / микродупликации в потомството на носителите. Например при около 30% от родителите на деца със синдром на Williams–Beuren (WBS) и при около 2/3 от родителите на деца с Angelman синдром (AS) се намират инверсии съответно в 7q11.23 (186) и 15q11q13 (Gimelli G, et al., 2003). Честотата на същите инверсии в популацията е съответно около 5% (за 7q11.23) и 9% (за 15q11q13).

1.5.6. Микроделеции-микродупликации

Молекулното кариотипиране е изиграло съществена роля за разкриването на кандидат-гени за познати синдроми и за откриването на нови геномни заболявания. Установяването на микроделеция в 8q12 при двама пациенти с CHARGE синдром и последващо секвениране на гените от най-малкия район на припокриване (SRO - shortest region of overlap) доведоха до разкриване на връзката между мутации в гена *CHD7* и CHARGE синдром (Vissers LE, et al., 2004). Прилагането на същата стратегия разкри, че:

- мутации в *ZNF674* гена са причината за една от формите на X-свързано несиндромно изоставане в умственото развитие (ИУР) (Lugtenberg D, et al., 2006);
- мутациите водещи до загуба на функция на *EHMT1* гена са в основата на фенотипа при 9q34 микроделеционния синдром (Kleefstra T, et al., 2006);
- мутации на двата алела на *B3GALTL* гена са причина за Peters-Plus синдром (Lesnik Oberstein SA, et al., 2006),
- мутациите в *TCF4* се срещат при пациенти с Pitt-Hopkins синдром (Zweier C, et al., 2007; Amiel J, et al., 2007) и др.

Освен идентифициране на нови гени асоциирани със заболявания, определянето на критичните хромозомни райони също има важен принос за установяване на корелации фенотип – генотип при известни микроделеционни синдроми. Молекулното кариотипиране позволява характеризиране на аберациите с изключително висока резолюция, като улеснява и ускорява определянето на минималния критичен район за конкретното заболяване (Schoumans J, et al., 2005; Swinkels ME, et al., 2008; Feenstra I, et al., 2007; Veltman JA, et al., 2003).

В миналото синдромите с изоставане в умственото развитие първо са били описвани подробно клинично, групирани са пациентите с добре очертани констелации от ключови симптоми и при някои е бил установен подлежащия хромозомен дефект. През последните години по-ползотворна е стратегията “genotype-first”, при която е точно обратното – ползват се методи с висока резолюция, позволяващи скриниране за дефекти на целия геном / транскриптом, идентифицират се пациентите със сходни генетични дефекти, след

което се сравняват фенотипните прояви при тях и може да се стигне до дефиниране на клиничен синдром (Shaffer LG, et al., 2007; Slavotinek AM., 2008). Такъв пример е микроделеционния синдром 17q21.31: първоначално генетичният дефект е установен при малък брой пациенти, впоследствие са разкрити и други болни със същата микроделеция, което е позволило подробно да се характеризира молекулният дефект и съответният фенотип (Koolen DA, et al., 2006; Sharp AJ, et al., 2006; Shaw-Smith C, et al., 2006; Koolen DA, et al., 2006).

Молекулното кариотипиране е изключително мощен инструмент за осъществяване на стратегията на обратната генетика. Скринирането на големи кохорти пациенти доведе до разкриването на постоянно нарастващ списък от нови микроделеционни / микродупликационни синдроми (Табл. 8)

Таблица 8. Микроделеционни / микродупликационни синдроми описани след 2006 г.

Име на синдром	Размер (Mb)	LCR	Източници
1q21.1 микроделеция	1.4	+	Mefford, H. et al (2008); Brunetti-Pierri, N. et al (2008)
1q41q42 микроделеция	1.2	-	Shaffer, L. et al (2007)
2p15p16.1 микроделеция	4.5	-	Rajcan-Separovic et al. (2007)
3q29 микродупликация	1.6	+	Lisi et al. (2008)
9q22.3 микроделеция	6.5	-	Redon R et al (2006)
12q14 микроделеция	2.6	-	Menten B et al (2007)
15q13.3 микроделеция	1.5	+	Sharp et al. (2008)
15q24 микроделеция	1.7	+	Sharp et al. (2007)
16p11.2p12.2 микроделеция	7.1	+	Ballif et al. (2007)
16p13.11 микроделеция / микродупликация	1.7	+	Ullmann R et al (2007)
17p11.2 микродупликация	3.7	+	Potocki et al. (2007)
17q12 микроделеция	1.5	+	Mefford et al. (2007)
17q21.31 микроделеция	0.5	+	Koolen et al. (2006)
19q13.11 микроделеция	2.9	-	Malan et al. (2009)
22q11.2 дистална микроделеция	1.4-2.1	+	Ben-Shachar et al. (2008)
Xq28 микродупликация	0.3-2.3	-	Vandewalle et al. (2009)

Mb: мегабази, LCR: low-copy repeat, +: има, -: няма

Познаването на механизма на NAHR (Lupski JR., 1998) в комбинация с анализ *in silico* на архитектурата на човешкия геном (Bailey JA, et al., 2001; Cheung VG, et al., 2001) позволява да се предвидят регионите, които са податливи на геномна нестабилност и този

подход е довел до идентифициране на нови геномни заболявания (Sharp AJ, et al., 2006). Още повече, тъй като LCR медираат, както делеции, така и дупликации, се очаква да се намират копийни варианти и от двата типа. Класически пример е 1.4 Mb дупликация на 17p12 при болест на Charcot-Marie-Tooth тип 1A (CMT1A) (Lupski JR, et al., 1991) и реципрочната делеция при наследствената невропатия с парализа при натиск (HNPP) (Chance PF, et al., 1993), които са първите заболявания за които е установено, че са резултат от NAHR между LCRs (Pentao L, et al., 1992).

При синдрома на Potocki-Lupski (Potocki L, et al., 2007; 2000) беше установена дупликация, реципрочна на делецията на 17p11.2, характерна за Smith-Magenis синдрома, а също и реципрочни дупликации на района в 22q11.2 (Ensenauer RE, et al., 2003), делетиран при DiGeorge/velocardiofacial синдром и 7q11.23 (Somerville et al., 2005; Van der Aa et al., 2009) района, делетиран при синдрома на Williams-Beuren.

1.6. Геномни проекти в постгеномната ера

Човешкият геномен проект е един от най-мощните проекти в науката. Той приключи 2000 г. и откри нови хоризонти за геномни анализи с приложение в различни области на медицината.

1.6.1. Проект TCGA (The Cancer Genome Atlas)

Проектът (TCGA) започна 2006 с цел да бъде спечелена битката с рака, да бъде подобрена диагнозата на онкологичните болести чрез задълбочено характеризиране на генетичната им основа и да се развива персонализирана терапия. Основна задача на TCGA проекта е да категоризира генетичните мутации, свързани с рака, чрез секвениране генома на тумори и биоинформационна обработка на данните. Той се ръководи от National Cancer Institute и the National Human Genome Research Institute с финансиране от правителството на USA. Първоначално започна като три годишно пилотно проучване на три типа карциноми: глиобластома, белодробен и овариален карцином. През 2009 г. той е разширен и навлезе във фаза II на реализация с цел до 2014 г. да бъде характеризиран генома на 20-22 различни типа карциноми.

Проектът включва 500 пациентски проби, анализирани с различни техники – експресионно профилиране, определяне на копийни варианти, SNP генотипиране, DNA метилационно профилиране на геноми, microRNA профили, екзомно секвениране на минимум 1,200 гени.

По проекта TCGA са секвенирани цели геноми на някои тумори, включително 6,000 кандидат гени и microRNA секвенции. Във фаза II, TCGA извърши цялостно екзомно секвениране на 80% от случаите и цялостно геномно секвениране на 80% от случаите по проекта.

1.6.2. Проект UK10K

Десет години по-късно Wellcome Trust започна нова грандиозна инициатива за изследване на 10,000 човешки геноми с цел разкриване на варианти, свързани с болести. Това е една от най-големите програми за геномно секвениране, която включва геномни анализи на 10,000 лица, от които 6000 души ще бъдат със значително наднормено тегло, болести на нервната система, аутизъм, шизофрения, сърдечно съдови и други. Останалите 4,000 генома ще бъдат на лица с подробна информация за тяхното здраве и развитие, които ще бъдат взети от две важни предишни проучвания на близнаци (TwinsUK - 11,000 близнаци, родени в UK в продължение на 18 години) и проучвания на родители и деца (ALSPAC проучване на 9,000 лица - Avon Longitudinal Study of Parents and Children – известни като Children of the 90s).

Проектът е известен като UK10K и ще бъде с продължителност 3 години, с финансиране от 10,500,000 £. Очаква се, че при реализирането му ще бъдат разкрити много нови редки генетични варианти, свързани със заболявания и ще допринесе за значително разширяване на познанията за молекулната патогенеза на редки и разпространени болести. Освен това се очаква, че вероятно ще бъдат идентифицирани нови няколко хиляди генетични варианти сред почти 3 милиона варианти, които всеки един индивид носи в своя геном и ще се завърши каталога на генетичните варианти в изследваните 4,000 лица.

1.6.3. Проект NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP)

Целта на проекта е да разкрие нови гени и механизми, които предразполагат към сърдечно-съдови заболявания, болести на белия дроб и кръвта чрез използване на NGS

секвениране на протеин-кодиращи райони на човешкия геном, за да се подобри диагнозата, поведението и терапията на тези тежки заболявания. В проекта участват изследователи от Seattle GO - University of Washington, Seattle, WA; BroadGO - Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA; WHISP - Ohio State University Medical Center, Columbus, OH; Lung GO - University of Washington, Seattle, WA; WashU GO - Washington University, St. Louis, MO; Heart GO - University of Virginia Health System, Charlottesville, VA; ChargeS GO - University of Texas Health Sciences Center at Houston.

Таргетната група са 200,000 пациенти от Америка с много добре характеризирани фенотип при предишни изследвания:

- Women's Health Initiative ([WHI](#))
- Framingham Heart Study ([FHS](#))
- Jackson Heart Study ([JHS](#))
- Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis ([MESA](#))
- Atherosclerosis Risk in Communities ([ARIC](#))
- Coronary Artery Risk Development in Young Adults ([CARDIA](#))
- Cardiovascular Health Study ([CHS](#))
- Lung Health Study ([LHS](#))
- COPD Genetic Epidemiology ([COPDGene](#))
- Severe Asthma Research Project ([SARP](#))
- Pulmonary Arterial Hypertension ([PAH](#))
- Acute Lung Injury (ALI)
- Cystic Fibrosis ([CF](#))
- [PennCATH](#)
- [Cleveland Clinic Genebank](#)
- Massachusetts General Hospital Premature Coronary Artery Disease Study([MGH PCAD](#))
- Heart Attack Risk in Puget Sound ([HARPS](#))
- Translational Research Underlying Disparities in Myocardial Infarction Patients' Health Status ([TRIUMPH](#))

1.7.Международни геномни консорциуми

1.7.1. The International Schizophrenia Consortium (ISC)

Консорциумът е създаден, за да извърши бързо идентифициране на генетичните причини, определящи предразположеност към шизофрения. Консорциумът включва изследователи от University of Aberdeen, Trinity College Dublin, Cardiff University, the University of Edinburgh, the University of Southern California, Massachusetts General Hospital, the Broad Institute of Harvard and MIT, the Karolinska Institutet, the University of North Carolina-Chapel Hill, University College London, включително и български учени. Това е един от най-

продуктивните консорциуми, който установи редки генетични нарушения, голям брой нови и полиморфни варианти, асоциирани с психични разстройства, определи нови молекулни механизми за развитие на шизофрения и промени представите за молекулната патогенеза на психиатричните състояния.

1.7.2. International Cancer Genome Consortium (ICGC)

Целта е да получи цялостна картина за геномни, транскриптомни и епигеномни нарушения при 50 различни туморни типа и/или подтипа, включително: рак на пикочния мехур, на кръвта, костите, мозъка, млечната жлеза, шийката на матката, дебело черво, хранопровод, стомах, глава и шия, черен дроб, жлъчни пътища, бял дроб, меланом, назофаринкс, панкреас, яйчник, простата, бъбреци и др.

В резултат на проекта се генерира сложен каталог на геномните аномалии – соматични мутации, абнормна експресия на гени, епигенетични модификатори.

1.7.3. Structural Genomic Consortium (SGC)

SGC има за цел да провежда изследвания в нова област на биологията и да разработва нова лекарствена терапия чрез фокусиране върху слабо проучени области на геномиката. Той се финансира от: AbbVie, Bayer, Boehringer Ingelheim, Genome Canada чрез Ontario Genomics Institute, GlaxoSmithKline, Janssen, Lilly Canada, Novartis Research Foundation, the Ontario Ministry of Economic Development and Innovation, Pfizer, Takeda, and Wellcome Trust.

1.7.4. International Consortium for Prostate Cancer Genetics (ICPCG)

ICPCG включва 16 работни групи от изследователи от 21 институти на Северна Америка, Европа и Австралия. Консорциума има богата ДНК банка от 17,000 DNA проби, включително 7014 от болни индивиди и 2558 фамилии с множество болни с простатен карцином. Целта е да бъдат идентифицирани кандидат гени за предразположеност чрез цялостно екзомно секвениране на 800 фамилни случая, от 475 неродствени семейства; да бъдат анализирани топ 1000 кандидат-гени чрез ресеквениране на кодиращите райони в независима извадка от 500 случая с наследствен простатен карцином и 500 контроли и да бъдат идентифицирани най-вероятните гени за предразположеност чрез валидиране на топ

100 гени в независима извадка от 1000 наследствени случаи с простатен карцином и 1000 контроли.

1.7.5. Rare Diseases Clinical Research Network (RDCRN)

Мрежата включва 22 различни консорциума, които работят за натрупване на нова информация за Редките болести, клиника, лечение, генетична определеност: Advancing Research And Treatment For Frontotemporal Lobar Degeneration Consortium (ARTFL); Autonomic Disorders Consortium; Brain Vascular Malformation Consortium; Brittle Bone Disorders (BBD); Chronic Graft Versus Host Disease Consortium (CGVHD); Consortium Of Eosinophilic Gastrointestinal Disease Researchers (CEGIR); CREATE: Clinical Research In ALS And Related Disorders For Therapeutic Development Consortium; Developmental Synaptopathies Consortium (DSC); Dystonia Coalition; Genetic Disorders Of Mucociliary Clearance; Inherited Neuropathies Consortium; Lysosomal Disease Network; NEPTUNE: Nephrotic Syndrome Study Network; North American Mitochondrial Disease Consortium; Porphyrias Consortium; Primary Immune Deficiency Treatment Consortium; Rare Kidney Stone Consortium; Rare Lung Diseases Consortium; Rett Syndrome, MECP2 Duplication, & Rett-Related Disorders Consortium; STAIR: Sterol And Isoprenoid Research Consortium; Urea Cycle Disorders Consortium; Vasculitis Clinical Research Consortium.

1.7.6. International Headache Genetics Consortium

Включва многонационални изследователски групи, които колаборират при изследване на генетичните основи на главоболието и свързани с него заболявания с цел да получат добре характеризирана генетична информация и да разработят нова бъдеща терапия. Консорциума е финансиран от Wellcome Trust (UK) и National Institutes of Health (US).

1.7.7. International Multiple Sclerosis (MS) Genetics Consortium

Функционира от 9 години. Целта е чрез генотипиране на 40,000 пациенти да бъдат разкрити разпространени генетични варианти и нови кандидат-гени за предразположеност към MS, нови молекулни пътища и мрежи.

1.8.Ново генерационно секвениране

Последният писък на модата в молекулните технологии е секвенирането от ново поколение (next-generation sequencing, NGS). Мощта на метода се състои във възможността да се извършва паралелно секвениране на милиони последователности, а не „само” на 4, 8, 16 или 96 ДНК последователности. Разработени са платформи, които ползват различни техники – 454 на Roche, Solexa на Illumina и SOLiD на Applied Biosystems, но всички те се основават на секвениране на имобилизирани, аранжирани в микроарей хиляди до милиони ДНК фрагменти чрез редуване на цикли от ензимно манипулиране и събиране на данни чрез заснемане на образа на микрочипа (Shendure J and Ji H, 2008; Shendure J, et al., 2005). Процесът включва приготвяне на библиотека от ДНК фрагменти чрез свързване на ДНК фрагментите със специфични адаптори (Mardis ER., 2008), клонална амплификация на ДНК фрагментите чрез PCR-базирани методи, като емулсионен PCR (Dressman D, et al., 2003) или bridge PCR (Adessi C, et al., 2000), избягвайки нуждата от трансформация на бактерии, както е при традиционното секвениране по Sanger. Това води до образуване на клъстери - „колонии” от имобилизирани ДНК фрагменти върху микроарея, които се подлагат на секвениране чрез синтез (Mitra RD and Church GM., 1999), като се ползват полимерази или лигази за цикличното удължаване на фрагментите. Тъй като клъстерите от ДНК фрагменти са имобилизирани върху плоска повърхност, за третиране на целия аррей са достатъчни малки количества реагенти – от порядъка на микролитри. Събирането на данните се прави на всеки цикъл, като се заснема целия аррей. В зависимост от платформата при едно пускане на машината могат да се прочетат мега – до около 600 гигабази нуклеотидни секвенции.

Секвенирането от ново поколение позволява получаване на повече данни за по-кратко време и снижаване на разходите за реактиви. По този начин геномът на Джеймс Уотсън беше секвениран за около 2 месеца при разход около 1% от този при традиционното секвениране с капилярна електрофореза (Wheeler DA, et al., 2008). Двата основни недостатъка на секвенирането от ново поколение са малката дължина на фрагментите за секвениране (~35-400 bp) и относително по-честите грешки, което затруднява асемблирането на последователността при de novo секвениране. Тези ограничения до голяма степен могат да бъдат преодоляни от разработените нови технологии за

секвениране на единични молекули известни като трето поколение секвениране или ново-ново поколение (next-next generation) (Gupta PK, 2008). Секвенирането от ново поколение има множество приложения, едно от които е картиране на структурни пренареждания, които включват копийни варианти, точки на разкъсване на балансирани транслокации и инверсии (Shendure J and Ji H., 2008; Mardis ER., 2008; Voelkerding KV, et al., 2009; Mardis ER., 2008; Chen W, et al., 2008). Korbelt et al., 2007 ползват секвениране от ново поколение за установяване на структурни варианти с размер > 3 kb. Процесът включва подготвяне и изолиране на фрагменти с paired ends с дължина 3-kb, секвенирането им с 454 технологията (Margulies M, et al., 2005) и компютърно картиране на разчетените фрагменти спрямо референтен геном (Korbelt JO, et al., 2007). Тази стратегия е приложена успешно за идентифициране и характеризиране на делеции, тандемни дупликации, инвертни дупликации, инверсии и междухромозомни пренареждания в туморна тъкан (Campbell PJ, et al., 2008).

1.9.Обобщение на литературните данни

Новите геномни технологии разкриват неподозирани възможности за изследване и разкриване на генетичните причини за редки моногенни болести и за определяне на генетична предразположеност към комплексни заболявания.

Болните от българската популация не са изследвани с NGS секвениране и затова информацията за патологичните генетични варианти, разпространени у нас е оскъдна, базирана само на данните от класическите методи за ДНК анализ.

Въвеждането, развитието и изпозването на новите технологии в България ще допринесе за характеризиране на генетични варианти, които се носят от здрави лица в нашата популация, за разкриване на нови варианти, свързани с различни заболявания, ще подобри диагнозата и прогнозата на Редки и на социално значими болести и ще отвори пътя за персонализирана терапия на пациентите.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел: Да се изследват възможностите на таргетното екзомно ресеквениране на панели от гени като аналитичен подход за установяване на генетични нарушения при пациенти с редки болести.

Задачи:

1. Да се въведе технологията за масивно паралелно секвениране от ново поколение (NGS).
2. Да се определи честотата и типа на вариантите в геномите на здрави индивиди чрез таргетно ресеквениране с генен панел, включващ 4813 гени
3. Да се селектират таргетни групи пациенти с редки генетични заболявания и да се подготвят биологични проби за таргетно ресеквениране.
4. Да се анализират генетичните нарушения при редки моногенни заболявания според типа на вариантите (патологични и вероятно патологични) разкрити при таргетно ресеквениране с панели, включващи:
 - 552 известни гена (асоциирани с тежки рецесивни заболявания)
 - 94 известни гена (асоциирани с предразположеност към туморни заболявания)
 - 4813 известни гена (асоциирани с моногенни заболявания и предразположения).
5. Да се предложи алгоритъм за генно профилиране при пациенти с редки моногенни болести

3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

3.1.Участници в проучването

Изследванията чрез секвениране от ново поколение са извършени в лаборатория „Геномика“ на СБАЛГАР „Д-р Малинов“ в периода 2013-2015 година.

В хода на проучването са изследвани общо 58 лица, разпределени в следните групи: 10 здрави възрастни без симптоми на редки моногенни заболявания (контролна група), 43 пациенти с моногенни или вероятно моногенни заболявания и 5 здрави родственици на пациенти с моногенни заболявания.

Всички участници са запознати с целта на генетичното изследване и са потвърдили писмено информираното си съгласие за извършване на анализа или това е направено от техен родител/пълномощен представител.

Биологичните проби на основната група пациенти с редки заболявания бяха предоставени от Националната генетична лаборатория, СБАЛАГ „Майчин дом“, Медицински университет София. Въз основа на водещите клинични симптоми разпределението на пациентите по клинични диагнози е както следва:

- **с неврологични и невромускулни заболявания:** общо 16 от които, 2 с прогресивна мускулна дистрофия тип Дюшен / Бекер, 7 със спастична квадриплегия (при 4 - и епилепсия), 1 с Атаксия-телангиектазия, 1 с предполагаема Спинална мускулна атрофия, 4 с епилепсия (1 с GEFS+, 1 с Епилепсия и хиперамониemia, 1 с Епилепсия и специфични разстройства в развитието на двигателната функция, 1 с Епилепсия), 1 с Аутизъм, ИНПР;
- **с метаболитни заболявания:** общо 14, от които 1 с Пропионова ацидурия, 1 с 3-метил-глутаконова ацидурия, 1 с Митохондриална енцефалопатия, 1 с Левциноза, 1 с Zellweger spectrum, 1 с Niemann–Pick type C, 1 с предполагаема болест на Rompre, 3 с Гликогеноза, 1 с предполагаема болест на Крабе, 3 с абнормен резултат от метаболитен скрининг, но неуточнено метаболитно заболяване;
- **с костно-ставни заболявания:** 3 с Obs. Osteogenesis imperfecta;
- **със сърдечно-съдови заболявания:** 1 с Дисекция на аортата;
- **с белодробни заболявания:** 2 с Кистозна фиброза

- **с кожни заболявания:** 1 с Булозна епидермолиза;
- **с множествени малформации:** 1 с Obs. Синдром на Noonan s, 1 с ПМС (двустранна аплазия на радиуси и палци, едностранна бъбречна агенезия), 1 с ИНПР. Obs. WBS, 1 с ПМС (аномалия на ЦНС, ВСМ). ИНПР;
- **други:** 1 с предполагаема Туберозна склероза, 1 с Изоставане в растежа и частична аниридия;

В изследването бяха включени също 5 здрави родственици на пациенти с редки моногенни заболявания: сестра на починал болен с Мукополизахаридоза тип IIIB (MPSIIIB, Sanfilippo B), родителите на дете починало от Интрахепатална прогресивна холестаза и родителите на дете починало от Булозна епидермолиза тип Herlitz.

Контролната група включва 10 лица (3 жени и 7 мъже) на възраст над 18 години (от 25 до 56 г.), неродствени помежду си, от български етнически произход, които нямат симптоми на тежки редки моногенни заболявания към момента на изследването.

3.2. Биологични проби

От всеки изследван е взета биологична проба за извличане на геномна ДНК. ДНК пробите на 43 от пациентите са предоставени от Националната генетична лаборатория, СБАЛАГ „Майчин дом“, Медицински университет София, а на десетте контролни лица и на 5 от пациентите биологичните проби са взети в СБАЛГАР „Д-р Малинов“. При 55 от изследваните ДНК е изолирана от венозна кръв взета чрез затворена вакутейнер система при спазване на стандартните процедури за стерилност. При трима пациенти ДНК е извлечена от тъкан: при един от букална лигавица, при един от кожна биопсия и при един от чернодробна тъкан включена в парафин. За изолирането на ДНК кръвта е събирана във вакутейнери с K2EDTA, а тъканните проби в контейнер със стерилен физиологичен разтвор. Изолирането на ДНК е извършвано не по-късно от 24 часа след взимането на биологичната проба. След изолирането е измервана концентрацията на ДНК във всяка проба, отделяна е 1-2 μ g ДНК (разтворена в TE буфер) за извършване на анализа, а останалото количество ДНК е банкирано и се съхранява съответно в ДНК банката на Националната генетична лаборатория и на СБАЛГАР „Д-р Малинов“.

3.3.Методи

В настоящата работа са използвани предимно молекулно генетични методи за лабораторен анализ – екстракция на ДНК, ДНК секвениране от ново поколение и SNP-кариотипиране.

3.3.1. Изолиране на ДНК

ДНК беше изолирана от кръв, използвайки кита на Qiagen QIAamp DNA Blood Mini Kit. Епруветките с кръв бяха центрофугирани за 10 минути на 2500 x g. Така кръвта се разделя на три фракции - горна, съдържаща плазма; средна, в която се концентрират левкоцитите, съдържащи клетъчни ядра; и долна, в която се концентрират безядрените еритроцити.

За процеса на изолиране на ДНК се взимат 200 µl от средната фракция на левкоцитите (buffy coat) и се смесват с 20 µl протеиназа К и 200 µl лизис буфер AL. Реакцията се вортексира за 15 сек и се инкубира за 10 мин на 56°C. След кратко центрофугиране се добавят 200 µl етанол (96–100%), следва вортексиране за 15 сек и прехвърляне на сместа в QIAamp Mini spin колона, поставена в събирателна епруетка. Колоната се центрофугира за 1 мин на 6000 x g и се прехвърля в нова събирателна епруетка. Към колоната се добавят 500 µl буфер AW1, центрофугира се за 1 мин на 6000 x g, след което отново се слага в нова събирателна епруетка. Добавят се 500 µl буфер AW2, след което пробата се центрофугира за 3 мин на пълна скорост (20000 x g). Елуатът се изхвърля. Следва центрофугиране за още 1 мин на максимална скорост за пълно изсушаване на колоната, след което колоната се слага в нова епендорф епруетка и се инкубира за 5 мин на стайна температура с елуиращ буфер АЕ. Следва центрофугиране за 1 мин на 6000 x g, при което се отделя пречистената ДНК. Количеството ѝ, както и качеството бяха измервани с NanoDrop 2000c (ThermoScientific) след изолирането. При наличие на замърсяване от протеини, соли или други контаминанти ($260/280 < 1.8$; $260/230 < 2.0$) пробите бяха пречиствани, използвайки кита NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up на Macherey-Nagel.

3.3.2. Таргетно ДНК ресеквениране от ново поколение

Екстрахираните ДНК проби бяха разпределяни в групи за секвениране с различни генни панели според клиничната симптоматика и работната клинична диагноза на пациентите. За таргетно ДНК ресеквениране е използвана технологията и апаратура на Illumina.

3.3.2.1. Генни панели използвани за таргетно ДНК ресеквениране

За изследването на всички пациенти, включени в този дисертационен труд, бяха използвани три различни секвенционни панела на Illumina - TruSight Cancer Panel, TruSight Inherited Disease Panel и TruSight One Panel. Всеки от тях включва кодиращата част на различен набор от гени. Дизайнът на всеки панел е спрямо версия NCBI37/hg19 на човешкия референтен геном.

TruSight Cancer (Illumina) генният панел включва 94 гена, мутации в които предразполагат към туморни заболявания (асоциирани предимно с редки фамилни ракови синдроми). Списък на гените в панела е показан в таблица №1А на Приложение 1 . В панела също така са включени и районите на 284 SNP-a, за които големи GWAS проучвания са показали, че са асоциирани с рак. Общият таргетен район на панела е 255 Kb.

TruSight Inherited Disease генният панел е предназначен за изследването на редки тежки моногенни заболявания с предимно рецесивен тип на унаследяване и начало в детска възраст. Таргетният район е 2.25 Mb, като включва екзоните на 552 гена (8801 екзона). Списък на гените в панела е показан в таблица №2А на Приложение 1.

В дизайна на **TruSight One** генния панел са включени олиго сонди, комплементарни на екзоните на 4813 гена (~62000 екзона), мутации в които водят до известни болестни състояния и предразположения, както и някои гени, които досега не са асоциирани със заболявания. В него са включени всички гени от гореспоменатите два по-малки панела. Таргетният район на панела е 12 Mb. Списък на гените в панела е показан в таблица №3А на Приложение 1

В таблица 9 са показани основните характеристики на ползваните генни панели и броят пациенти с редки заболявания изследвани със съответния панел.

Таблица 9. Основни характеристики на генните панели TruSight

Генен панел	TruSight Cancer	TruSight Inherited	TruSight One
Брой таргетни гени	94	552	4 813
Брой таргетни екзони	1 700	8 801	62 000
Общ размер на таргетния район	255 Kb	2.25 Mb	12 Mb
Брой изследвани пациенти	3	25	15
Брой изследвани здрави индивиди	-	3	12

3.3.2.2. Приготвяне на библиотеките за секвениране

За приготвяне на библиотеката от таргетни райони за всеки пациент, която впоследствие да бъде секвенирана, беше следван протоколът *TruSight Rapid Capture Sample Preparation guide (Revision A)*.

Нормализиране на ДНК

Първоначално концентрацията на всяка от ДНК пробите беше доведена до 10 ng/μl (измерване със спектрофотометър Nanodrop). След това точната концентрация на двойно-верижната ДНК в пробата бе измервана с Qubit 2.0 Fluorometric Quantitation System, използвайки Qubit dsDNA BR (Broad Range) Assay Kit. За повечето проби концентрацията варираше в диапазона 5-10 ng/μl - за тези, които не бяха в него, се правеше по-голяма или по-малка разредка от изходната ДНК.

Тагментация

Първата стъпка от процеса на приготвяне на библиотеката е тагментацията (тагване/маркиране + фрагментация), при която Nextera транспозоми начупват на случаен принцип геномната ДНК на фрагменти със средна дължина от 300 бази, добавяйки адапторни секвенции в двата края на всеки от тях (*Фиг. 6 А*).

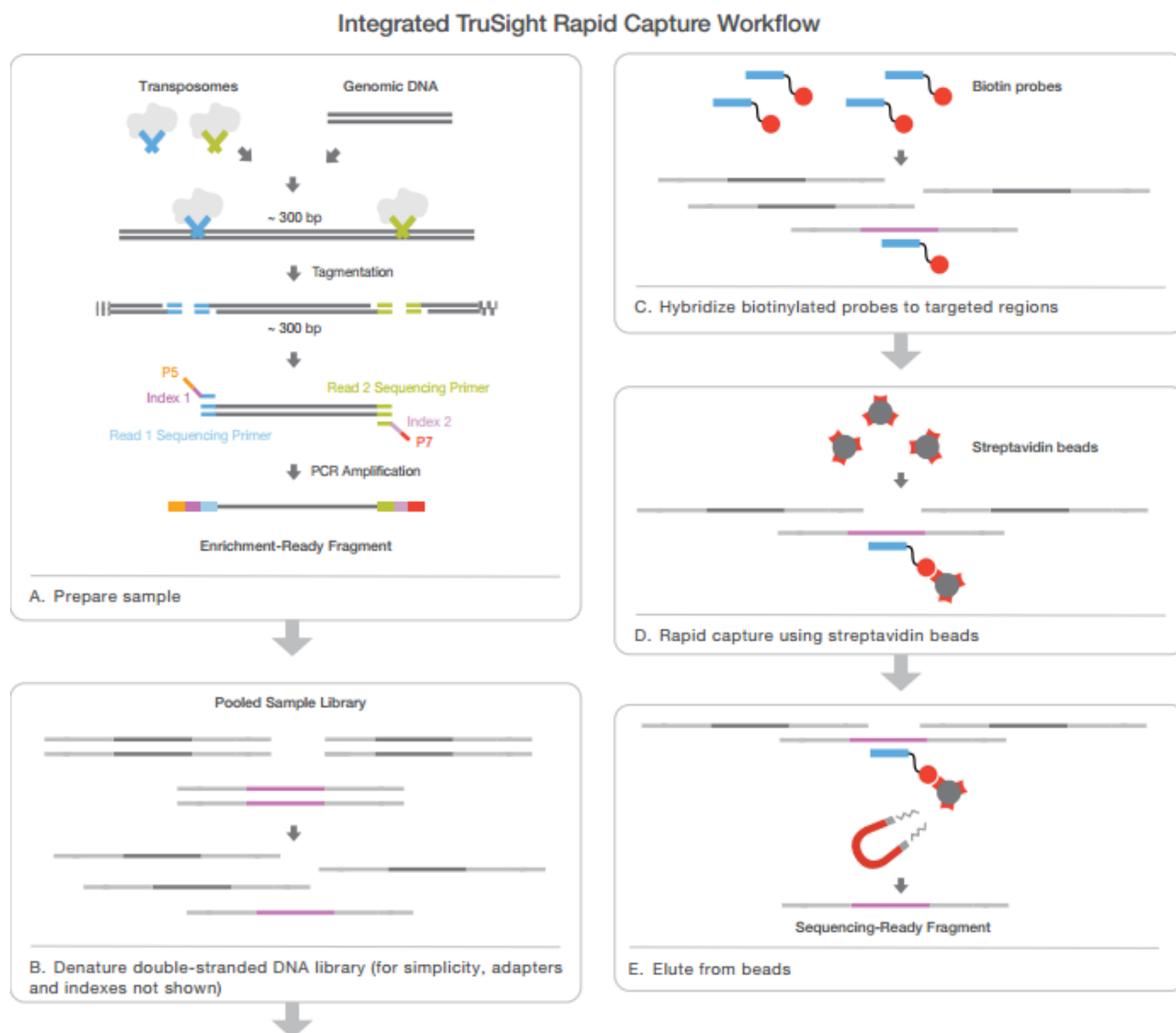
За реакцията се ползват 96-ямкови плаки. От всяка проба се взимат 50 ng начално количество ДНК и се накапват в отделна ямка. Към нея се добавя нужното количество ТЕ буфер, за да се достигне обем от 10 μl ДНК разтвор с концентрация 5 ng/μl. Към тях се добавят 25 μl Tagment DNA Buffer (TD) и 15 μl Tagment DNA Enzyme (TDE1), който съдържа Nextera транспозомите. Плаката се запечатва със залепящо фолио Microseal 'B'

(тази стъпка се повтаря винаги преди плаката да се вортексира, центрофугира или инкубира, след което фолиото се маха и изхвърля). Плаката, съдържаща ДНК и реагентите за тагментацията, се поставя на шейкър за 1 мин на 1800 rpm. Следва центрофугиране за 1 мин на 280 x g и инкубация за 10 мин на 58°C, след което фолиото се разлепя и се добавят 15 µl Stop Tagment Buffer (ST) към всяка ямка. Плаката се вортексира (1800 rpm, 1 мин), центрофугира се (280 x g, 1 мин) и се оставя на стайна температура за 4 мин за деактивация на тагментационната реакция.

Първо пречистване

По време на първото пречистване тагментираната ДНК се пречиства от транспозомите, за да не останат свързани с краищата на фрагментите.

Към всяка ямка се добавят 65 µl добре разтворени Sample Purification Beads (SPB), които преференциално се свързат само с ДНК фрагментите. Плаката се вортексира (1800 rpm, 1 мин) и се инкубира за 8 мин на стайна температура, след което се поставя за 2 мин на магнитна стойка, която утаява пречиствателните мъниста, свързани с ДНК. Супернатантата (130 µl) се премахва от всяка ямка, без да се нарушава интактността на утаените мъниста. Приготвя се пресен 80% етанол, разреждайки 100% EtOH с двойно дестилирана вода. Докато плаката е на магнита, се добавят бавно 200 µl 80% етанол. Без запечатване с фолио се изчаква 30 секунди, след което етанолът се премахва от ямките с пипета. Накапват се нови 200 µl етанол, последвани от 30 секунди инкубация, след което от ямките се премахва целият остатъчен етанол. Плаката се оставя незапечатана за 10 мин на стайна температура, за да изсъхне напълно от етанола. След това се маха от магнита и внимателно се добавят 22.5 µl Resuspension Buffer (RSB), без да се докосват мънистата с типчето на пипетата. Следва вортексиране (1800 rpm, 1 мин), инкубация (2 мин, стайна температура) и вортексиране (280 x g, 1 мин), след което плаката се поставя за 2 мин на магнитната стойка. Супернатантата съдържа отделената от пречиствателните мъниста ДНК. 20 µl от всяка ямка се прехвърлят в отделни 200-µl PCR епруветки, без да се влиза в контакт с утаените мъниста.



Фигура 6. Работната процедура за подготвяне на библиотеката за секвениране по протокола *TruSight Rapid Capture Sample Preparation guide*

Първа PCR амплификация

Първата PCR амплификация с лимитиран брой цикли размножава тагментираните ДНК фрагменти, като освен това добавя към краищата им уникална за всяка проба комбинация от индекси (i7 и i5) с цел мултиплексиране на секвенционната реакция, както и адапторни секвенции (P5 и P7), служещи по-късно за свързването на фрагментите с поточната (flow) клетка и генерирането на клъстери (Фиг. 6А).

Подбира се уникална комбинация от индексни праймери i7 (N701, N702, N703...) и i5 (E501, E502, E503...) за всяка проба от една секвенционна реакция. Всеки индекс се състои от 8 нуклеотида, които служат като баркод за всички секвенции на даден пациент. По

време на секвенирането MiSeq отчита базите гуанин (G) и тимин (T) със зелен лазер, а аденин (A) и цитозин (C) - с червен лазер. Двойките индекси за пробите, които впоследствие ще се комбинират в един пул, се избират така, че на всяка една от осемте позиции на индекс i7 и i5 да има поне един нуклеотид, четен от другия лазер.

Sample	Good Index 1		Bad Index 1	
1	701	TAAGGCGA	702	CGTACTAG
2	702	CGTACTAG	703	AGGCAGAA
3	704	TCCTGAGC	711	AAGAGGCA
		√√√√√√√√		x√xx√xx√

√=signal in both color

x=signal missing in one color channel

Фигура 7. Подход при избора на индекси за пробите: поддържане на цветови баланс при лазерното отчитане на базите за всяка индексова позиция (взета от Illumina, 2015)

Избраните индекси се размразяват, вортексират се за кратко и се центрофугират за няколко секунди на 600 x g. Към всяка от ДНК пробите се добавят 5 µl индекс i7, 5 µl индекс i5 и 20 µl Nextera Library Amplification Mix (NLM). Всяка епруветка се вортексира (1200 rpm, 1 мин) и центрофугира (280 x g, 1 мин), след което се слага в термален сайкълър с предварително загрят до 100°C капак и се пуска следната PCR програма:

- 72°C за 3 минути
- 98°C за 30 секунди
- 10 цикъла по:
 - 98°C за 10 секунди
 - 60°C за 30 секунди
 - 72°C за 30 секунди
- 72°C за 5 минути
- Изчакване на 10°C

Пречистване след първия PCR

Това пречистване се извършва за отстраняването на нежеланите реагенти от PCR реакцията.

След края на амплификацията всички епруветки се изваждат от термалния сайкълър и се центрофугират на 280 x g за 1 мин. Целият обем (50 µl) от всяка от тях се прехвърля в отделна ямка на нова плака. След продължително вортексиране (15 - 20 сек) на Sample Purification Beads към всяка ямка се добавят 90 µl от пречиствателните мъниста. Плаката се поставя на шейкър за 1 мин на 1800 rpm, след което се инкубира на стайна температура за 10 мин. Следва центрофугиране (280 x g, 1 мин) и поставяне на магнитната стойка за 2 мин. Супернатантата (140 µl) се отстранява, след което следват две последователни измивания с 200 µl прясно приготвен 80% етанол с по 30 сек изчакване след всяко от тях. След премахване на остатъчния етанол плаката отново се оставя за сушене за 10 мин на стайна температура, след което се маха от магнита и към всяка ямка се добавят 27 µl RSB. Плаката се вортексира (1800 rpm, 1 мин), инкубира се (2 мин, стайна температура), центрофугира се (280 x g, 1 мин) и отново се поставя за 2 мин на магнита. От всяка ямка се прехвърлят 25 µl (2 пипетирания по 12.5 µl) от супернатантата, съдържаща пречистените ДНК фрагменти, в отделна PCR епруветка.

Измерване на пробите след първия PCR

Концентрацията на ДНК на всяка проба беше измервана посредством Qubit 2.0 Fluorometric Quantitation System. Всички получени концентрации бяха в диапазона 20 - 150 ng/µl. Най-вероятно разминаването в концентрациите на различните проби се дължи на качеството, продължителността на съхранение и фрагментираността на изходната ДНК. Пробата, изолирана от парафиново блокче, беше с значително по-ниска концентрация в сравнение с тези, изолирани от кръв или букална лигавица.

Първа хибридизация

Преди първата хибридизация се приготвя обща ДНК библиотека (pool), съдържаща различно индексирани проби, която впоследствие да се пусне в една секвенционна реакция. От всяка проба се взимат 500 ng ДНК и се добавят в общия пул. Ако общият обем на смесените проби надвишава 40 µl, пулт се концентрира с помощта на вакуумен

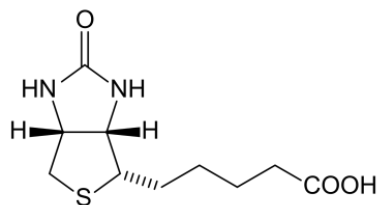
концентратор без прилагане на топлина. Ако обемът на пула е под 40 μl , се добавя необходимото количество RSB до 40 μl .

Капацитетът на секвенатора MiSeq и уникалното индексване на всяка проба позволява в едно секвениране да се комбинират подготвените библиотеки на различни индивиди. Броят на пробите, които могат да се секвенират едновременно, зависи от размера на таргетния район и желаната дълбочина на секвениране. В едно секвениране могат да се комбинират до 12 различни библиотеки подготвени с панела TruSight Cancer, до 6 – с TruSight Inherited Disease и до 3 – с TruSight One при желана средна дълбочина на секвениране около 100 х.

Преди приготвянето на хибридизационната реакция Enrichment Hybridization Buffer (ЕНВ) се вортексира продължително до пълното ресуспендиране на кристалите в него. След това към всеки приготвен пул (40 μl) се добавят 50 μl ЕНВ, както и 10 μl от специфичния за всеки панел TruSight Content Set (CSO), който съдържа набора от олигосонди, комплементарни на таргетните райони, включени в панела. Следва вортексиране на хибридизационната смес на 1200 rpm за 1 мин и центрофугиране (280 x g, 1 мин), след което пулът/пуловете се поставят в термален сайкълър на следната програма:

- 95°C за 10 минути (денатурация)
- 18 цикъла по една минута, започващи от 94°C, като всеки следващ цикъл температурата спада с 2°C
- 58°C за минимум 1.5 и максимум 24 часа

За оптимизиране на ефикасността на хибридизацията продължителността на последната стъпка при първата хибридизация за всеки пул беше между 15 и 20 часа. След денатурацията (*Фиг. 6 В*) комплементарните олигосонди се свързват само с ДНК фрагментите, съдържащи таргетни райони (*Фиг. 6 С*). Всяка олигосонда е биотинилирана - т.е. представлява нуклеотидна секвенция, към която ковалентно е прикрепена молекулата биотин (витамин В7) (*Фиг. 8*).



Фигура 8 Структурата на биотина, наричан още витамин В7, който е ковалентно свързан към нуклеотидните секвенции, комплементарни на таргетните райони от всеки панел

Първо извличане на таргетните райони (Capture)

По време на извличането на таргетните райони към хибридизационната реакция се добавят магнитни мъниста, към повърхността на които са прикрепени тетрамерни форми на белтъка стрептавидин. Той е с молекулна маса от 52.5 kDa и е изолиран от бактерията *Streptomyces avidinii*. Стрептавидинът и биотинът (Фиг.9) образуват една от най-силните нековалентни връзки в природата с дисоциационна константа (K_d) $\approx 10^{-14}$ mol/L (Green, 1975). Така стрептавидиновите магнитни мъниста се свързват с биотинилираните сонди, които от своя страна са се хибридизирали с таргетните райони (Фиг. 6 D).

След края на хибридизацията всеки пул се центрофугира (280 x g, 1 мин) и съдържанието му (~100 μ l) се прехвърля в отделна ямка на нова плака. След като бъдат добре вортексирани, към всеки пул се добавят 250 μ l Streptavidin Magnetic Beads (SMB). Плаката се вортексира (1200 rpm, 5 мин) и се инкубира на стайна температура за 25 мин. По време на тази стъпка се осъществява взаимодействието между стрептавидина и биотина. След инкубацията плаката се центрофугира (280 x g, 1 мин) и се поставя за 2 мин на магнитната стойка. Супернатантата се премахва, без да се влиза в контакт с магнитните мъниста, след което плаката се сваля от магнита.



Фигура 9 Триизмерна структура на тетрамерен стрептавидин с два свързани биотина.

На базата на това взаимодействие се основава принципът за изолиране на фрагментите, съдържащи таргетни райони, от останалите.

Следват две последователни измивания за отстраняване на неспецифични взаимодействия на стрептавидиновите мъниста и изолиране само на таргетните райони. Enrichment Wash

Solution (EWS) се темперира до стайна температура и се вортексира продължително. 200 µl от разтвора се добавят към утаените мъниста от всеки пул, след което плаката се слага на шейкър за 4 мин на 1800 rpm. След вортексирането библиотеките се ресуспендират допълнително чрез пипетиране на целия им обем 10-15 пъти. Плаката се инкубира за 30 мин на предварително загрят до 50°C термоблок. След инкубацията плаката се изважда и веднага се слага за 2 мин на магнитната стойка. Супернатантата се маха и плаката се сваля от магнита, след което наново се накапват 200 µl EWS и отново се повтарят същите последователни стъпки.

След повторното премахване на супернатантата след втората инкубация с EWS следва елуирането на таргетните райони от стрептавидин-биотиновия комплекс (Фиг 10 Е). За всеки пул се приготвя елуционен премикс, съдържащ 28.5 µl Enrichment Elution Buffer 1 (EE1) и 1.5 µl 2N NaOH (HP3). След кратко центрофугиране се добавят 23 µl от премикса към утаените стрептавидинови мъниста на всеки пул. Следва вортексиране на шейкър (1800 rpm, 2 мин), инкубация за 2 мин на стайна температура, при която става самото елуиране на ДНК фрагментите, и центрофугиране (280 x g, 1 мин). Плаката отново се поставя за 2 мин на магнит, като този път ДНК фрагментите не са свързани с утаените мъниста, а се намират в супернатантата. От нея се взимат 21 µl и се прехвърлят в нова PCR епруетка. Към тях се добавят 4 µl Elute Target Buffer 2 (ET2) за неутрализиране на елуирането. Обогатеният на таргетни райони пул се вортексира за 1 мин на 1800 rpm, след което се центрофугира (280 x g, 1 мин).

Втора хибридизация

След първото извличане на таргетните райони следва повторна хибридизация, при която елуираната библиотека отново се смесва с олигосонди за допълнително обогатяване и повишена специфичност на таргетните райони.

Към 25-те µl елуирана библиотеката се добавят 15 µl Resuspension Buffer, 50 µl EHB (след вортексиране и ресуспендиране на кристалите) и 10 µl от съответния TruSight Content Set (CSO), съдържащ олигосондите. Следва вортексиране на хибридизационната реакция (1200 rpm, 1 мин) и центрофугиране (280 x g, 1 мин), след което пулт се поставя в термален сайкълър на следната програма:

- 95°C за 10 минути (денатурация)

- 18 цикъла по една минута, започващи от 94°C, като всеки следващ цикъл температурата спада с 2°C
- 58°C за минимум 14.5 и максимум 24 часа

Второ извличане на таргетните райони (Capture)

Следва второ извличане на таргетните райони, при което се следват същите стъпки, както при първото.

Пречистване на обогатената библиотека

След второто извличане на таргетните райони елуираната библиотека се пречиства преди финалната PCR амплификация.

Обемът на библиотеката (25 µl) се прехвърля в нова ямка на плака. След продължително вортиране към библиотеката се добавят 45 µl Sample Purification Beads. Плаката се вортира (1800 rpm, 1 мин) и се инкубира за 10 мин на стайна температура, след което се центрофугира (280 x g, 1 мин) и се поставя на магнитна стойка за 2 мин. Супернатантата (70 µl) се премахва, след което се извършват две последователни измивания с 200 µl прясно приготвен 80% етанол с по 30 сек изчакване след всяко от тях. След премахване на остатъчния етанол плаката се оставя за 10 мин на стайна температура, за да изсъхнат утаените мъниста, след което се маха от магнита. Добавят се 27.5 µl RSB. Плаката се вортира (1800 rpm, 1 мин), инкубира се (2 мин, стайна температура), центрофугира се (280 x g, 1 мин) и отново се поставя за 2 мин на магнита. 25 µl (2 пипетираня по 12.5 µl) от супернатантата, съдържаща пречистените ДНК фрагменти, се прехвърлят в отделна PCR епруветка.

Втора PCR амплификация

По време на втората PCR амплификация се амплифицират специфично само таргетните райони, извлечени след двете хибридизации.

След кратко вортиране към библиотеката се добавят 5 µl PCR Primer Cocktail (PPC) и 20 µl Nextera Enrichment Amplification Mix (NEM). Следва вортиране (1200 rpm, 1 мин), центрофугиране (280 x g, 1 мин) и пускане на следната PCR програма:

- 98°C за 30 секунди
- 12 цикъла по:

- 98°C за 10 секунди
- 60°C за 30 секунди
- 72°C за 30 секунди
- 72°C за 5 минути
- Изчакване на 10°C

Пречистване след втория PCR

По време на тази стъпка амплифицираната библиотека, съдържаща таргетните райони, се пречиства финално преди секвенирането.

PCR епруветката се вади от термалния сайкълър и се центрофугира (280 x g, 1 мин), след което съдържанието ѝ (50 µl) се прехвърля в нова ямка на плака. Добавят се 90 µl Sample Purification Beads. Плаката се вортексира (1800 rpm, 1 мин) и се инкубира за 10 мин на стайна температура. Следва центрофугиране (280 x g, 1 мин) и поставяне на магнитната стойка за 2 мин. Супернатантата (140 µl) се премахва, след което утаените мъниста се промиват два последователни пъти с 200 µl прясно приготвен 80% етанол с по 30 сек изчакване след всяко от тях. След премахване на етанола плаката се инкубира за 10 мин на стайна температура, за да изсъхнат утаените мъниста, след което се маха от магнита. Добавят се 32 µl RSB. Следва вортексиране (1800 rpm, 1 мин), инкубация (2 мин, стайна температура), центрофугиране (280 x g, 1 мин) и поставяне на плаката за 2 мин на магнитната стойка. 30 µl (2 пипетириания по 15 µl) от супернатантата, съдържаща таргетните ДНК фрагменти, се прехвърлят в отделна PCR епруветка. С тази стъпка завършва процесът на приготвяне на библиотеките за секвениране.

Определяне на концентрацията на библиотеките за секвениране

Преди зареждане на секвенционната реакция е необходимо да се определи концентрацията на всяка от приготвените библиотеки. Използван бе протоколът *KAPA Library Quantification Kit for Illumina platforms* на KAPA Biosystems.

Приготвят се две разредки на приготвената библиотека - 1:1000 и 1:2000. 1 µl от библиотеката се смесва с 999 µl RSB. След 15 сек вортексиране се взимат 100 µl от

първата разредка (1:1000) и се смесват с 100 μl RSB, за да се получи втората разредка от 1:2000.

Реагентът 10X Primer Premix съдържа праймери, комплементарни на адапторните райони в краищата на всеки фрагмент от библиотеката. 1 ml 10X Primer Premix се смесва с 5 ml 2X KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix, за да се приготви финалният мастър микс. В реакционната смес за определяне на концентрацията се смесват 12 μl мастър микс, 4 μl PCR-grade H_2O и 4 μl от разредките на библиотеката или от ДНК стандартите. Използват се 6 ДНК стандарти със следните концентрации: 20 pM/ μl , 2 pM/ μl , 0.2 pM/ μl , 0.02 pM/ μl , 0.002 pM/ μl и 0.0002 pM/ μl . В 48-ямякова плака се накапват по три реакции за всяка от двете разредки на библиотеката и за всеки от шестте стандарта. Пуска се и една негативна контрола, в която вместо ДНК се добавя RSB. Плаката се поставя в qPCR система Illumina Ego и се пуска следната програма:

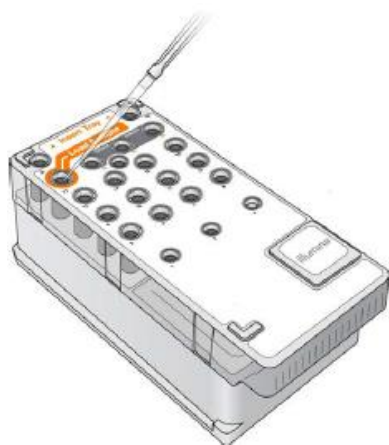
- 95°C за 5 минути
- 35 цикъла по:
 - 95°C за 30 секунди
 - 60°C за 45 секунди

За изчисляване на концентрацията на библиотеката бе ползвана по-малката разредка от 1:1000. Концентрацията се изчислява по формулата: $C \times 452/500 \times 1000$, където C е концентрацията на разредката, установена от qPCR-а, 452 е дължината в бази на стандартите, а 500 бази е средната дължина на фрагментите от приготвените библиотеки.

Подготовка за секвениране

За всяко от секвениранията беше използван MiSeq Reagent Kit v2, включващ стандартна поточна (flow) клетка за 500 цикъла. При всяко секвениране flow клетката беше зареждана с концентрация в диапазона 15-25 pM/ μl . Подобни концентрации дават оптимална гъстота на клъстърите по време на секвенирането. След определяне на концентрацията всяка от библиотеките е разреждана до 3-5 pM/ μl . За денатурация бе ползвана 0.2 N NaOH. 5 μl от приготвената библиотека се смесва с 5 μl 0.2N NaOH. Сместа се инкубира за 5 мин на стайна температура, след което към нея се добавя 990 μl хибридизационен буфер HT1. Полученият 1 ml се накапва в предварително размразената на лед реагентна касета (Фиг.

10), съдържаща необходимите реагенти за секвенирането. Използвани бяха MiSeq Reagent Kit v2. След изплакване поточната клетка (Фиг.11), на която се извършва клъстер генерирането и разчитането на базите, се поставя на мястото си в MiSeq апарата. Поставят се също и PR бутилката, съдържаща буфер за изплакване, и реагентната касета, след което се дава начало на секвенирането от контролния софтуер.



Фигура 10 Реагентната касета с резервоара, в който се добавя приготвената библиотека от таргетни секвенции



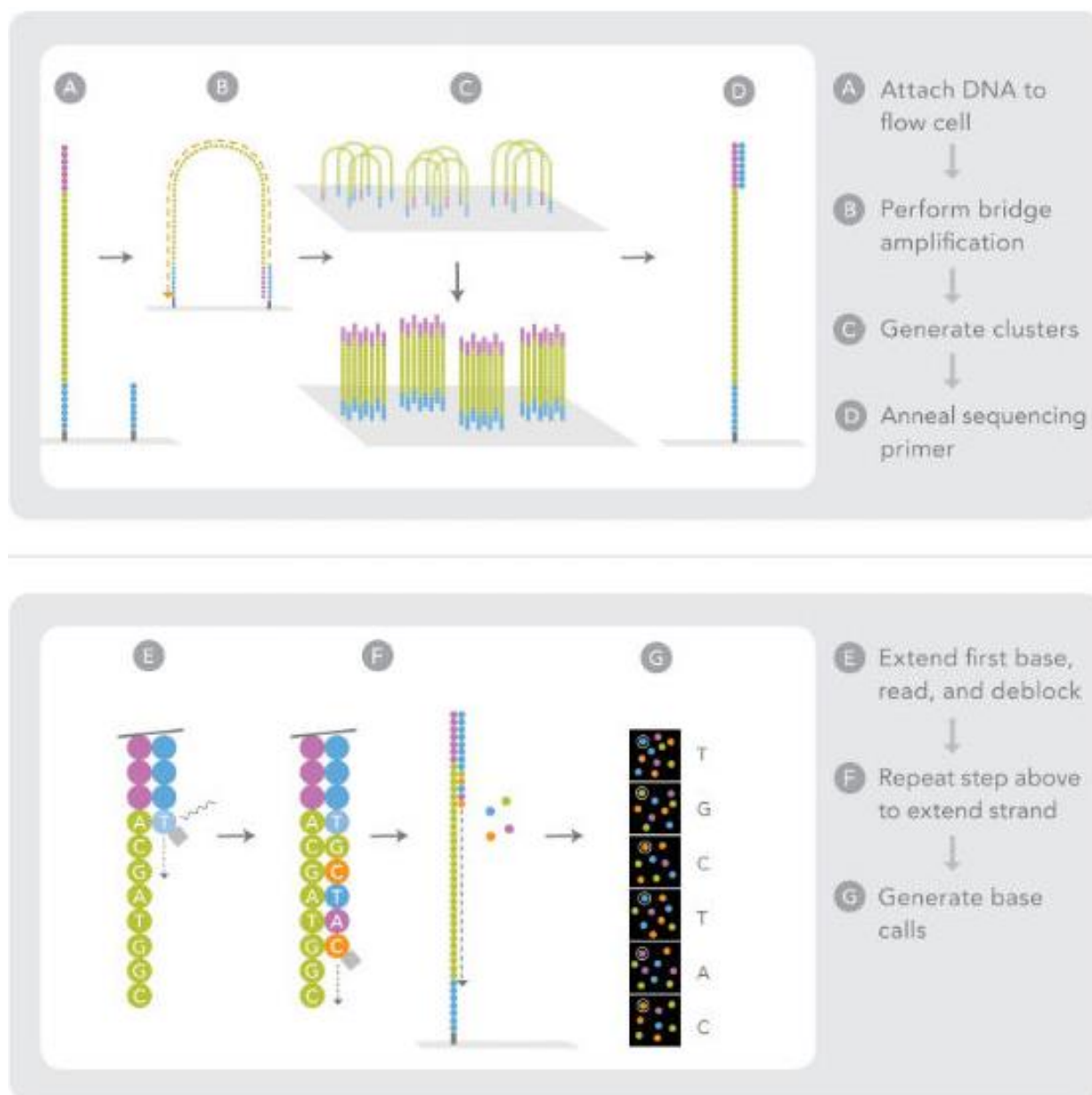
Фигура 11 Поточната клетка, на която се извършва целият процес на секвениране, заедно с държача

3.3.2.3. Секвениране

В началото на процеса на секвенирането чрез микроканалчета подготвените ДНК фрагменти навлизат в поточната клетка. По повърхността ѝ ковалентно са фиксирани огромен брой олигонуклеотиди, комплементарни на адапторните секвенции, добавени по време на приготвянето на библиотеките. ДНК фрагментите се закрепят за поточната клетка (Фиг. 12А), след което чрез така наречената мостова (bridge) амплификация (Фиг. 12В) се генерират клъстери. Така се създават голям брой клъстери, всеки съдържащ хиляди копия на един специфичен ДНК фрагмент (Фиг. 12С). След генерирането на клъстерите започва самото разчитане на нуклеотидната последователност. Секвенционни

праймери, комплементарни на част от адапторната секвенция, се хибридизират с намножените фрагменти (Фиг. 12D). Секвенирането се извършва по време на синтез (sequencing-by-synthesis) чрез използването на dNTP-та, всеки от които е свързан с флуоресцентно белязан терминатор. При инкорпориране на дадена база (Фиг. 12E) флуоресцентният сигнал се отчита от лазер и базата се идентифицира. След това терминаторът се отстранява, за да позволи инкорпорирането на следващата флуоресцентно белязана база и удължаването на веригата (Фиг. 12F). Крайният резултат е генерирането на секвенции с висока степен на прецизност (Фиг. 12G).

След приключване на разчитането на базите започва първичният анализ на получените секвенции от самия секвенатор чрез софтуера MiSeq Reporter, който извършва демултиплексиране и разпределяне на секвенциите за всеки един от пациентите в отделна директория. Освен това получените секвенции се подравняват с референтния човешки геном (версия GRCh37) и несъответствията се отчитат като варианти. За подравняване на последователностите спрямо референтния геном е ползван алгоритъма на Burrows-Wheeler (Li H, Durbin R. 2009) или Isaac, а за идентифициране на вариантите (еднонуклеотидни замени, делеции / инсерции с дължина до 25 бази) - приложението GATK Variant Caller или Isaac Variant Caller. Данните от всяко секвениране бяха също така качвани и в облака на Illumina - BaseSpace, където впоследствие могат да се извършват различен тип допълнителни анализи.



Фигура 12 Стъпките в процеса на секвениране с технологията на Illumina (адаптирана от Illumina, 2008)

3.4. Анализ на данните

За визуализация на получените прочити от секвенирането беше използвана програмата GenomeBrowse (ver.2.0.7) на Golden Helix. За филтруване на вариантите беше използван софтуерът Variant Studio (ver.2.1) на Illumina. Програмата предлага различни критерии за

филтриране на вариантите като честота в различни популации и функционално последствие и дава възможност за генериране на собствена база данни с анотация на установените варианти. При търсене на патологични мутации филтрите бяха нагласяни на ниска глобална честота $<1\%$ и отчитане само на вариантите с постигнато висококачествено секвениране на нуклеотидната секвенция ($Q>30$, минимална дълбочина на секвениране >20). Честоти на варианти също така бяха сверявани и с базата данни на Exome Variant Server на NHLBI Exome Sequencing Project. За оценка на варианти с потенциален ефект върху сплайсинга на иРНК беше ползвано приложението Human Splicing Finder v.3.0 (<http://www.umd.be/HSF3/>).

Също така ползвани бяха и базите данни: ClinVar, COSMIC, OMIM, UniProt.

ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) съдържа информация за връзката на определен човешки вариант с конкретен фенотип. Базата данни дава сведения за клиничната значимост на вариантите, като също така цитира и проучванията, в които вариантът е бил изследван, както и заключението на колектива.

COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) е база данни, в която се регистрират соматични мутации, детектирани в различни видове туморна тъкан.

OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) (<http://www.omim.org/>) включва обширен каталог на известните гени и болести с генетична компонента, наблюдавани при човека. Базата данни дава подробна информация за конкретните генетични дефекти при дадено заболяване.

UniProt (<http://www.uniprot.org/>) е каталог, съсредоточен върху протеините от различни организми. Включва информация за аминокиселинната последователност, различните генни транскрипти, функционалните домени на протеините, както и за детектирани варианти в секвенцията.

За оценка на потенциалните функционални последствия на варианти, които водят до аминокиселинна замяна в протеина и не са анотирани в ClinVar, COSMIC, OMIM, HGMD или в локус специфичните бази данни, е ползвано приложението MetaSVM Pred.

MetaSVM Pred (<https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP/>): представлява бинарна обобщена предикция, основана на SVM (Support vector machine, support vector networks), категоризираща конкретния вариант като "T(olerated)" (толериран) или "D(amaging)"

(вреден). Границата между двете категории "D" и "T" е 0. Граничната стойност на ранга между "D" и "T" е 0.83357. Оценката на ефекта на варианта обобщава оценките на 10 предиктора: SIFT, PolyPhen-2 HDIV, PolyPhen-2 HVAR, GERP++, MutationTaster, Mutation Assessor, FATHMM, LRT, SiPhy, PhyloP и отчита честотата на варианта наблюдавана в популациите изследвани по проекта 1000 генома (<http://www.1000genomes.org/>). Стойностите за ранга варират от 0 до 1, като по-голяма стойност показва, че еднонуклеотидния вариант е по-вероятно да е вреден (Liu et al. 2011; Liu et al. 2013).

3.5. Критерии за класифициране на установените редки и нови генетични варианти

Съставена е собствена база данни с редки варианти (с популационна честота по-малка от 1%). Секвенирането при пациентите и здравите индивиди е извършено с гении панели, включващи предимно гени, асоциирани с конкретни фенотипи. Секвенционните варианти са класифицирани в 5 категории: патологични, вероятно патологични, бенигнени, вероятно бенигнени и варианти с неизвестно клинично значение, като са приложени следните критерии:

Патологични варианти (в гени асоциирани с конкретен болестен фенотип):

А) Варианти, които по предикция водят до загуба на функция на кодиращия протеин (независимо от това дали са съобщавани преди при пациенти със заболяването):

- с изместване на рамката на четене (frameshift)
- с образуване на преждевременен стоп-кодон (nonsense)
- променящи консервативните места за сплайсинг на границата екзон-интрон (в интрон на позиция +1, +2 и -1, -2)
- променящи инициаторния кодон
- променящи обичайния стоп-кодон

Б) Варианти, водещи до замяна на една аминокиселина с друга (missense), отговарящи на едно от следните условия

- с подходящ функционален анализ е потвърдено, че вариантът води до намалена функция на протеина (загуба на функция), или до променена функция на протеина (gain of function)
- има литературни данни, че вариантът води до болестен фенотип
- вариантът е установяван при множество индивиди засегнати от заболяването и показва косегрегация с болестта в много семейства
- потвърдено чрез функционален анализ нарушение на сплайсинга (за интронни и синонимни варианти)

Вероятно патологични варианти:

За рецесивни състояния:

- диагнозата е потвърдена чрез биохимичен анализ или фенотипът на пациента е специфичен за заболяването;
- вариантът е локализиран в хомоложната хромозома (транс) спрямо друг известен патологичен или вероятно патологичен вариант;
- вариантът засяга еволюционно консервирана нуклеотидна и/или аминокиселинна позиция;
- вариантът не присъства в dbSNP, EVS (Exome Variant Server) или в друга публична база данни с честота съответстваща на бенигнен вариант;

За доминантни състояния:

- вариантът ко-сегрегира с фенотипа в изследваното семейство;
- изследване на родителите показва, че вариантът е възникнал de novo;
- вариантът не присъства в dbSNP, EVS (Exome Variant Server) или в друга публична база данни с честота съответстваща на бенигнен вариант;

Бенигнени варианти:

- вариантът е публикуван в dbSNP, EVS, локус специфични бази данни или присъства в собствената база данни с честота по-висока от очакваната за патологичен алел въз основа на разпространението на заболяването в популацията и типа на унаследяване;

- вариантът е наблюдаван в контролна популация с висока честота, несъответна за патологичен вариант;
- има литературни данни в подкрепа на неутралния характер на варианта;

Вероятно бенигнени варианти:

- вариантът е откриван при множество индивиди без изява на фенотипа в хетерозиготно (за доминантни заболявания) или в хомозиготно състояние (за рецесивни заболявания);
- вариантът е откриван скачен с известен патологичен алел при множество неродствени индивиди;
- вариантът е откриван при членове на семейството не проявяващи фенотипа (за доминантни заболявания);

Варианти с неизвестно клинично значение:

- ако вариантът не отговаря на критериите за класификация в някоя от другите четири категории, се определя като вариант с неизвестно клинично значение;
- вариантът не е публикуван в HGMD, локус специфични бази данни, не е съобщаван в литературата, dbSNP или EVS;
- вариантът е публикуван в dbSNP или EVS, но алелната честота е недостатъчна да се изключи клинична значимост, като се отчита типа на унаследяване и тежестта на заболяването;
- вариантът е наблюдаван при един индивид и данните за сегрегация и/или функционален анализ са недостатъчни;
- вариантът е наблюдаван при един индивид, но клиничната информация е недостатъчна;
- варианти, за които информацията е противоречива;

вариантите в гени, за които е неизвестно дали са свързани със заболявания;

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

4.1.NGS анализ на здрави индивиди с TruSight One панел

Изследването с NGS технология на редки болести стартира с анализ на ДНК проби на 10 здрави лица, приети за контроли. Целта е да се въведе метода за секвениране от ново поколение чрез платформата на Illumina и да се получат изходни данни за лица от българската популация по отношение броя и вида на генетичните варианти при секвениране на генен панел от 4813 таргетни гена (TruSight One, Illumina). Резултатите от подобно изследване биха били полезни както за оптимизиране условията на работа, проверка на възпроизводимостта на метода (количество и качество на получените секвенции), така и за оптимизиране подхода за анализ на резултатите. Контролната извадка е много малка, за да послужи за определяне на алелни/генотипни честоти, но може да даде ориентир за най-честите полиморфни алелни варианти в нашата популация. Болшинството гени, включени в панела, не са изследвани досега при българи и алелните/генотипните честоти дори на полиморфни варианти в тях са неизвестни.

Изследването показва, че всеки носи средно 3,98% редки варианти. Средно 0,98% от установените варианти не са аотирани в dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) и вероятно част от тях са нови. При всеки средно 0,05% от откритите варианти са аотирани като известни патологични, асоциирани с моногенни заболявания и предразположения, а други 0,05% - с фармакогенетични дефекти (Табл 10, 11). Установени са и варианти, които предразполагат към заболявания, проявяващи се в зряла възраст (Табл 12).

4.1.1. Патологични варианти и фармакогенетични дефекти, установени в контролната група индивиди

В контролната група бяха установени 48 различни варианти, категоризирани като патологични, в гени, асоциирани с конкретен фенотип на моногенно заболяване или предразположение (Табл. 12). Петнадесет от вариантите са асоциирани с автозомно доминантни фенотипи, 29 – с автозомно-рецесивни фенотипи, един – с X-свързан рецесивен фенотип, а три от вариантите - както с доминантен, така и с рецесивен фенотип.

Таблица 10. Среден брой и характеристика на вариантите, които се носят от здрави индивиди, изследвани с TruSight One панел

№	Общ брой	Редки <1%		Без номер в dbSNP		Известни патологични		Вероятно патологични		Известни фармакогенетични дефекти	
		бр	%	бр	%	бр	%	бр	%	бр	%
1	6165	178	2.88	46	0.74	3	0.04	3	0.04	2	0.03
2	6536	334	5.11	53	0.81	4	0.06	5	0.07	4	0.06
3	8147	354	4.34	80	0.98	4	0.04	9	0.11	5	0.06
4	8533	420	4.92	97	1.13	7	0.08	18	0.21	3	0.03
5	8399	371	4.41	97	1.15	4	0.04	9	0.10	4	0.04
6	7881	250	3.17	54	0.68	5	0.06	16	0.20	3	0.03
7	6788	214	3.15	64	0.94	6	0.08	17	0.25	2	0.02
8	5679	183	3.22	52	0.91	3	0.05	9	0.15	3	0.05
9	7677	273	3.55	84	1.09	2	0.02	7	0.09	7	0.09
10	7795	355	4.55	96	1.23	4	0.05	13	0.16	3	0.03
Средно	7360	293.2	3.98	72.3	0.98	4.2	0.05	10.6	0.14	3.6	0.05

Таблица 11. Генетични варианти, според ефекта на генетичното нарушение върху структурата на кодиращия протеин или иРНК (TruSight One панел)

№	Missense	Frame shift	Inframe del / ins	Splice AS / DS	Non-sense	Stop lost	Initiation codon
1	2134	34	22 / 15	2 / 3	18	5	2
2	2250	26	21 / 22	2 / 4	18	7	1
3	2749	38	25 / 27	5 / 3	18	8	1
4	2973	41	26 / 19	4 / 7	23	6	3
5	2876	35	32 / 29	7 / 5	20	9	1
6	2753	34	19 / 20	3 / 3	27	7	4
7	2351	36	17 / 16	4 / 3	21	7	3
8	1973	26	17 / 16	4 / 4	16	6	2
9	2595	37	16 / 19	5 / 2	21	6	3
10	2641	32	24 / 20	7 / 6	17	6	3
Средно	2529.5	33.9	21.9 / 20.3	4.3 / 4	19.9	6.7	2.3

Missense – вариант, водещ до замяна на аминокиселина в полипептидната верига, frameshift – вариант водещ до изместване на рамката на четене, in frame del/ins – инсерционно-делеционен вариант със запазване на рамката на четене, Splice AS/DS – вариант променящ акцепторното (AS) или донорното сплайс място (DS), non-sense – нуклеотидна замяна, водеща до замяна на кодон, кодиращ аминокиселина със стоп-кодон, stop lost – нуклеотидна замяна, водеща до замяна на стоп-кодон с такъв кодиращ аминокиселина, Initiation codon – нуклеотидна замяна, водеща до замяна на старт-кодона с друг;

Таблица 12. Патологични варианти, асоциирани с моногенни заболявания, установени при възрастни контроли:

Ген	Хр №	Вариант	Генотип (бр. инд.)		Асоцииран фенотип	Унаследяване	MAF NHLBI ESP6500
			M/N	M/M			
ABCA4	1	c.6148G>C, p.Val2050Leu, rs41292677	2	0	Stargardt disease 1	AP	G: 0.003691
ABCA4	1	c.1964T>G, p.Phe655Cys, rs200692438	1	0	Stargardt disease 1	AP	C: 0.000154
ADA	20	c.22G>A, p.Asp8Asn, rs11555565, rs73598374	3	0	Adenosine deaminase 2 allozyme	AP	T: 0.030801
AMPD1	1	c.133C>T, p.Gln45Ter, rs17602729	2	0	Muscle AMP deaminase deficiency	AP	A: 0.094586
BBS2	16	c.209G>A, p.Ser70Asn, rs4784677	1	0	Bardet-Biedl syndrome 2	AP	T: 0.00554
BTBD	3	c.1368A>C, p.Gln456His, rs80338685	1	0	Biotinidase deficiency	AP	C: 0.001
C8B	1	c.1282C>T, p.Arg428Ter, rs41286844	1	0	Complement component 8 deficiency type 2	AP	A: 0.001198
CACNB4	2	c.311G>T, p.Cys104Phe, rs1805031	1	0	Episodic ataxia, type 5; Epilepsy, generalized idiopathic 9	АД	A: 0.000739
CHIT1	1	c.304G>A, p.Gly102Ser, rs2297950	1	2	Chitotriosidase deficiency	AP	T: 0.285253
COL18A1	21	c.4318G>A, p.Asp1440Asn, rs12483377	3	0	Knobloch syndrome 1	AP	A: 0.071022
COL4A5	X	c.4246C>T, p.Arg1416Cys, rs104886270	1	0	Alport syndrome	XP	T: 0.000095
COL5A1	9	c.1588G>A, p.Gly530Ser, rs61735045	1	0	Ehlers-Danlos syndrome, type 2	АД	A: 0.031601
CPN1	10	c.533G>A, p.Gly178Asp, rs61751507	2	0	Anaphylotoxin inactivator deficiency	AP	T: 0.035445
CREBBP	16	c.2728A>G, p.Thr910Ala, rs143247685	1	0	Rubinstein-Taybi syndrome;	АД	C: 0.002309
CSRP3	11	c.136A>C, p.Ser46Arg, rs137852765	1	0	Familial hypertrophic cardiomyopathy 12	АД	G: 0.000231
CYP11B2	8	c.1157T>C,	2	0	Corticosterone	AP	G:

		p.Val386Ala, rs61757294			methyloxidase type 1/ type 2 deficiency		0.072274
DHCR7	11	c.724C>T, p.Arg242Cys, rs80338856	1	0	Smith-Lemli-Opitz syndrome	AP	A: 0.000154
ERCC4	16	c.2395C>T, p.Arg799Trp, rs121913049	1	0	Xeroderma pigmentosum, type f	AP	T: 0.00077
FOLR1	11	c.493+2T>C, rs144637717	1	0	Neurodegeneration due to cerebral folate transport deficiency	AP	C: 0.002079
GALT	9	c.1132A>G, p.Ile378Val, rs111033819	1	0	Deficiency of UDPglucose- hexose-1-phosphate uridylyltransferase	AP	G: 0.000231
GJA5	1	c.795dupC, p.Asp266ArgfsTer3	1	0	Atrial fibrillation, familial, 11;	АД	na
GNPAT	1	c.1556A>G, p.Asp519Gly, rs11558492	4	2	Rhizomelic chondrodysplasia punctate type 2	AP	G: 0.167154
GNRHR	4	c.317A>G, p.Gln106Arg, rs104893836	1	0	Hypogonadotropic hypogonadism 7 without anosmia: Isolated lutropin deficiency	AP	C: 0.002537
GORAB	1	c.995T>G, p.Leu332Ter, rs145659887	1	0	Geroderma osteodysplasticum	AP	G: 0.000077
HARS2	5	c.586_587delAT, p.Met196ValfsTer2	1	0	?Perrault syndrome 2	AP	na
HEXA	15	c.805G>A, p.Gly269Ser, rs121907954	1	0	Gm2-gangliosidosis, adult	AP	T: 0.000308
HEXB	5	c.185C>T, p.Ser62Leu, rs820878	1	0	Sandhoff disease, infantile type	AP	T: 0.030658
HPD	12	c.97G>A, p.Ala33Thr, rs1154510	2	0	4-Alpha- hydroxyphenylpyruvate hydroxylase deficiency	АД, AP	T: 0.099108
HPS5	11	c.3293C>T, p.Thr1098Ile, rs61884288	1	0	Hermansky-Pudlak syndrome 5	AP	A: 0.027264
INSR	19	c.3034G>A, p.Val1012Met, rs1799816	1	0	Diabetes mellitus type 2	АД	T: 0.006382
KRT81	12	c.846T>A, p.Tyr282Ter, rs138597671	1	0	Monilethrix	АД	T: 0.001307
LPL	8	c.953A>G, p.Asn318Ser, rs268	1	0	Hyperlipidemia, familial combined	АД	G: 0.013378
MEFV	16	c.2084A>G, p.Lys695Arg, rs104895094	1	0	Familial Mediterranean fever	AP	C: 0.00254
NLRP7	19	c.1549C>T, p.Gln517Ter	1	0	Hydatidiform mole, recurrent, 1	AP	na
OTOA	16	c.1644T>G,	1	0	Deafness, autosomal	AP	na

p.Tyr548Ter					recessive 22		
PKP1	1	c.1295+1G>A	1	0	Ectodermal dysplasia/ skin fragility syndrome;	AP	na
RP1	8	c.1118C>T, p.Thr373Ile, rs77775126	1	0	Retinitis pigmentosa 1	АД, AP	T: 0.011687
RYR1	19	c.13673G>A, p.Arg4558Gln, rs118192130	1	0	Central core disease	АД, AP	A: 0.000077
SCN9A	2	c.2971G>T, p.Val991Leu, rs4369876	1	0	Neuropathy, small fiber	АД	A: 0.00357
SCN9A	2	c.2794A>C, p.Met932Leu, rs12478318	1	0	Neuropathy, small fiber	АД	G: 0.003383
SCNN1A	12	c.1654T>C, p.Trp552Arg (p.Trp493Arg), rs5742912	1	0	Bronchiectasis with or without elevated sweat chloride 2	АД	G: 0.017453
SCNN1G	16	c.547G>A, p.Gly183Ser, rs5736	1	0	Bronchiectasis with or without elevated sweat chloride 3	АД	A: 0.012698
SEC23A	14	c.2104A>G, p.Met702Val, rs138568622	1	0	Craniolenticulosutural dysplasia;	AP	C: 0.000308
SH3TC2	5	c.505T>C, p.Tyr169His, rs80359890	1	0	Mononeuropathy of the median nerve, mild: Charcot-Marie-Tooth disease, type 4C;	АД, AP	G: 0.002384
SLC6A20	3	c.596C>T, p.Thr199Met, rs17279437	1	0	Iminoglycinuria, digenic: Hyperglycinuria	AP	A: 0.073244
SLC9A3R1	17	c.673G>A, p.Glu225Lys, rs119486097	1	0	Nephrolithiasis/ osteoporosis hypophosphatemic, 2	АД	A: 0.002384
SPTA1	1	c.2909C>A, p.Ala970Asp, rs35948326	2	0	Spherocytosis, type 3	AP	T: 0.03613
WFS1	4	c.1123C>T, p.Arg375Cys, rs200095753	1	0	Wolfram-like syndrome, {Diabetes mellitus, noninsulin-dependent, association with};	АД	na

В колонката „Генотип“ е посочен броят на изследваните лица, които са хетерозиготни носители (M/N) и хомозиготи (M/M) по съответния минорен алел. MAF NHLBI ESP6500 – глобална честота на минорния алел публикувана в базата данни на NHLBI Exome Sequencing Project, посоченият нуклеотид съответства на минорния алел в геномната ДНК; na – вариантът не е установяван при лицата изследвани по проекта NHLBI ESP6500; АД – автозомно доминантен тип на унаследяване, AP – автозомно-рецесивен тип на унаследяване, XP – X-свързан рецесивен тип на унаследяване;

Таблица 13. Генетични варианти, асоциирани с фармакогенетични дефекти, установени при възрастни контроли.

Ген	Хр №	Вариант	Генотип		Асоцииран ФГД	Унаследяване	MAF
			M/N	M/M			
ADRB1	10	c.1165G>C p.Gly389Arg rs1801253	5	2	Congestive heart failure and beta-blocker response, modifier of		G: 0.2983
ADRB2	5	c.491C>T p.Thr164Ile rs1800888	1	0	Beta-2-adrenoreceptor agonist, reduced response to		T: 0.0040
CYP2C9	10	c.430C>T p.Arg144Cys rs1799853	4	0	Warfarin response	AP	T: 0.0479
CYP2C9	10	c.1075A>C, p.Ile359Leu rs1057910	2	0	Warfarin response, Glipizide poor metabolizer, Tolbutamide poor metabolizer, Phenytoin response	AP	C: 0.0485
CYP2D6	22	c.506-1G>A, CYP2D6*4, rs3892097	1*	0	Debrisoquine, poor metabolism of	AP	T: 0.15105
CYP2D6	22	c.100C>T p.Pro34Ser, CYP2D6*10 rs1065852	1*	0	Debrisoquine, poor metabolism of	AP	A: 0.18853
DPYD	1	c.85T>C p.Cys29Arg rs1801265	2	4	Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency, 5-@FLUOROURACIL TOXICITY	AP	G: 0.2602
ITPA	20	c.94C>A p.Pro32Thr rs111069069, rs1127354	1	0	Inosine triphosphatase deficiency, Thiopurine drug toxicity	AP	A: 0.0895
MTHFR	1	c.1286A>C p.Glu429Ala rs1801131	4	2	MTHFR deficiency, thermolabile type	AP	G: 0.25957
MTHFR	1	c.665C>T p.Ala222Val rs1801133	1	0	MTHFR deficiency, thermolabile type	AP	A: 0.2454
NAT2	8	c.341T>C p.Ile114Thr rs1801280	3	1	Slow acetylator due to N-acetyltransferase enzyme variant	AP	C: 0.2927
NAT2	8	c.590G>A p.Arg197Gln rs1799930	6	0	Slow acetylator due to N-acetyltransferase enzyme variant	AP	A: 0.2650
NAT2	8	c.803G=, p.Arg268= rs1208	3	1	Slow acetylator due to N-acetyltransferase enzyme variant	AP	G: 0.3229
NAT2	8	c.857G>A p.Gly286Glu rs1799931	2	0	Slow acetylator due to N-acetyltransferase enzyme variant	AP	A: 0.02294

В колонката „Генотип“ е посочен броят на изследваните лица, които са хетерозиготни носители (M/N) и хомозиготи (M/M) по съответния минорен алел. ФГД – Фармако-генетичен дефект, MAF – глобална честота на минорния алел публикувана в базата данни на NHLBI Exome Sequencing Project, посоченият нуклеотид съответства на минорния алел в геномната ДНК; АД – автозомно доминантен тип на унаследяване, AP – автозомно-рецесивен тип на унаследяване, ХР – Х-свързан рецесивен тип на унаследяване, * - двата алела са установени при едно и също лице;

Пет от вариантите (*ABCA4* p.Val2050Leu, *AMPD1* p.Gln45Ter, *CPN1* p.Gly178Asp, *CYP11B2* p.Val386Ala, *HPD* p.Ala33Thr) са установени при двама от изследваните, два варианта (*ADA* p.Asp8Asn, *COL18A1* p.Asp1440Asn) - при трима и един (*GNPAT* p.Asp519Gly) – при шестима, което показва, че някои алели, определяни като патологични, вероятно са чести в нашата популация. Пет от вариантите вероятно са нови, тъй като не са съобщавани досега в специализираните бази данни: *GJA5* p.Asp266ArgfsTer3, *HARS2* p.Met196ValfsTer2, *NLRP7* p.Gln517Ter, *OTOA* p.Tyr548Ter, *PKP1* c.1295+1G>A.

Изследването на контролите разкри общо 14 различни полиморфни алела в 8 гена, асоциирани с фармакогенетични дефекти (табл. 13). Полиморфни алели в гена *NAT2*, свързани с намалена ензимна активност, бяха установени при всички изследвани контроли, като един от изследваните се оказва носител на 4 минорни алели (един в хомозиготно състояние и други два в хетерозиготно).

4.2. Дискусия на резултатите от NGS изследване на здрави индивиди

Прилагането на масивно паралелно секвениране има потенциала да разкрие едновременно множество генетични варианти в последователността на ДНК, включително такива, които са асоциирани с редки заболявания и през последните години доведе до откриване на нови генетични заболявания (Lee H et al, 2014; Yang Y et al, 2014; Xiaolin Z et al, 2015) и разкриване на неизвестни допреди това генни дефекти в познати гени (Nellist M et al, 2015; Wang Y et al, 2012; Qin W et al, 2010; Ylikallio E et al, 2014).

Изследването на контролни индивиди в нашето проучване чрез таргетно екзонно секвениране на 4813 гени показва възпроизводимост на резултатите, по отношение на обем и качество на генерираните секвенции, но също така разкри някои от проблемите, които съпътстват анализа на получените данни. Установихме, че в зависимост от приложените алгоритми (MSR, BWA, Isaac) за подравняване на секвенциите спрямо референтния геном, се получават различия в броя на установените варианти (главно по отношение на регистрираните in/del варианти). За преодоляване на този проблем и минимизиране на фалшиво-позитивни находки допълнително бяха анализирани районите, показали различия, чрез визуална инспекция на генерираните *.bam файлове. Някои особености в

архитектурата на човешкия геном са източник за генериране на подобни разлики в резултатите, получени при масивно паралелно секвениране, като например хомополимерни райони близо до границите екзон-интрон, микросателитни ДНК последователности, присъствие на псевдогени и копийни варианти.

Изследването на контролите установи наличие на патологични варианти, в гени асоциирани с моногенни заболявания при всичките 10 изследвани лица, но повечето варианти са свързани с рецесивно унаследявани белези и нямат пряко значение за здравето на носещите ги в хетерозиготно състояние. От друга страна, разкриването на рецесивни патологични алели може да даде информация за генетичния товар в популацията, към която принадлежат изследваните. Получената информация е полезна също и в контекста на профилактиране на редките генетични болести в семействата на идентифицираните носители.

При 9 от контролите бяха установени варианти, асоциирани с доминантни фенотипи, като се касае за заболявания изявяващи се в зряла възраст (хипертрофична кардиомиопатия, фамилно предсърдно мъждене), доминантни предразположения към мултифакторни заболявания (захарен диабет тип 2, фамилна комбинирана хиперлипидемия, бронхиектазия, нефролитиаза, дегенерация на ретината, епилепсия) и доминантни фенотипи, които обикновено не водят до инвалидизация (мононевропатия на медианния нерв, Neuropathy, small fiber, Central core disease) и могат да останат клинично неразпознати.

4.3.NGS изследване на пациенти с Редки болести

4.3.1. Дизайн на изследването

Разнообразната етиология, вариабилността на клиничните прояви и ниската популационна честота на индивидуалните нозологични единици, причислявани към редките болести, ги прави труден обект за изследване. В същото време, разкриването на етиологията при моногенните редки заболявания, дава шанс на болните за адекватно планиране на лечението (ако такова е възможно) и на семействата им за планиране на репродукцията и избягване раждането на деца с инвалидизиращи нелечими заболявания. Основният критерий за включване на пациенти в настоящото проучване беше наличие на или съмнение за заболяване с моногенна етиология. Обект на изследването са пациенти с различни водещи клинични симптоми и на различна възраст, тъй като искахме да проверим приложимостта на новите технологии за масивно паралелно секвениране при условия максимално близки до ежедневната клинична практика в генетичните лаборатории.

В изследването са включени общо 43 пациенти, чиито диагнози условно могат да се причислят към следните групи заболявания: неврологични и невромускулни, сърдечно-съдови, метаболитни, костно-ставни, белодробни, кожни, множествени малформации и други. Като подход за генетично изследване приложихме масивно паралелно ресеквениране на панели от множество гени (от 94 до 4813 таргетни гени). Безспорно едновременното изследване на множество таргетни гени увеличава шанса за разкриване на генетичен вариант, каузално свързан с фенотипа, но шансът за успех зависи от това, дали съответният ген е наличен в панела и дали технологията позволява установяване на конкретния тип мутация / мутации (ако такава е налична). Независимо, че при прилагане на масивно паралелно секвениране се генерира огромен обем данни във вид на ДНК последователности, методът понастоящем е неприложим за разкриване на тринуклеотидни експанзии и не се ползва рутинно за установяване на генни /екзонни делеции и дупликации. Друго ключово условие за успешно прилагане на тази технология в практиката е критична оценка на връзката между установения генотип и фенотипа на конкретния пациент. Някои редки моногенни болести имат строго специфичен разпознаваем клиничен фенотип и прилагането на съответните клинични критерии е

достатъчно надеждно за поставяне на диагнозата. Нещо повече – в някои случаи над 95% от пациентите с конкретен фенотип споделят един и същи генетичен дефект. По-честата ситуация в клиничната практика е обратната – фенотипът е пъстър и не позволява да вместим пациента в рамките на една конкретна диагноза или фенотипът е специфичен, но може да се дължи на различни етиологични фактори (генетични и средови). Ето защо, разпределихме пациентите в две групи, в зависимост от очакваната генетична хетерогенност.

1 група: пациенти със специфичен фенотип и клинична диагноза съответстваща на конкретно моногенно заболяване, отговарящо на следните условия:

- не е наблюдавана локусна хетерогенност, но е наблюдавана алелна хетерогенност или има локусна хетерогенност, но броят на локусите, асоциирани със заболяването, е относително малък
- фенотипът на пациента е специфичен за заболяването
- налице са данни от лабораторни, образни и други изследвания, подкрепящи работната клинична диагноза
- фамилните данни съответстват на очаквания тип на унаследяване

В първа група са включени 17 пациенти и 5 здрави родственици на пациенти с диагнози, отговарящи на изброените критерии. В таблица 14 са представени данните за клинична диагноза и ползван генен панел.

Таблица 14. Пациенти от 1-ва група по клинични диагнози и приложен генен панел.

№	Пол	Инициали /възраст	Клинична диагноза	Ген/и асоцииран/и с фенотипа	Генен панел
Белодробни болести					
1	ж	ТЖ	Кистозна фиброза	<i>CFTR</i>	TSI
2	м	АТ	Кистозна фиброза	<i>CFTR</i>	TSI
Неврологични и невромускулни заболявания					
3	м	ИБ /4 г	DMD	<i>DMD</i>	TSI
4	м	ИМ / 6 г	DMD / BMD	<i>DMD</i>	TSI
13	м	ТДТ / п	Атаксия-телангиектазия	<i>ATM</i>	TSC
Метаболитни болести					
5	ж	МВ / 3 г	Пропионова ацидурия	<i>PCCA, PCCB</i>	TSI
6	ж	ДУА / 7 г	3-метил-глутаконова ацидурия	<i>DNAJC19, SERAC1, AUH, CLPB, OPA3, TAZ</i>	TSI

7	ж	КМК / п	Митохондриална енцефалопатия, дефицит на комплекси I, III и IV	14 гена (към декември 2014 г.)	TSI
8	ж	АД / п	Левциноза	BCKDHA, BCKDHB, DBT	TSI
9	м	ХХ / п	Zellweger spectrum	>12 гена (PEX1, PEX10, PEX11B, PEX12, PEX13, PEX14, PEX16, PEX19, PEX2, PEX26, PEX3, PEX5, PEX6)	TSO
14	м	ХП / 3 г	Гликогеноза	G6PC, AGL, GAA, GBE1, SLC37A4, PYGL, PHKA1, PHKA2, PHKG2, PHKB, LAMP2, PFKM	TSI
15	м	ТД / 6 г	Гликогеноза+	G6PC, AGL, GAA, GBE1, SLC37A4, PYGL, PHKA1, PHKA2, PHKG2, PHKB, LAMP2, PFKM	TSI
16	ж	ЕС / 1 г	Гликогеноза	G6PC, AGL, GAA, GBE1, SLC37A4, PYGL, PHKA1, PHKA2, PHKG2, PHKB, LAMP2, PFKM	TSO
17	ж	ХМ / п	Niemann–Pick type C	NPC1	TSI
Сърдечно-съдови заболявания					
10	м	ФВ / 15 г	Дисекация на аортата	ACTA2, FBN1, MYH11, MYLK, PRKG1, SMAD3, TGFB1, TGFB2	TSO
Костно- ставни заболявания					
11	ж	ИП / 2 г	Osteogenesis imperfecta	COL1A1, COL1A2, CRTAP, P3H1	TSO
Кожни заболявания					
12	ж	МБ / 1г 6м	Булозна епидермолиза, дистрофична?	COL7A1, LAMC2, LAMB3, COL17A1, ITGB4, LAMA3, KRT14, KRT5, DSP, PLEC1	TSI
Здрави родственици на болни					
1а	ж	ТТ / 32 г	Сестра на болен с MPS-III B (Sanfilippo B)	NAGLU	TSI
2а	ж	ХБ / 33 г	Родител на дете с Интрахепатална холестаза	ATP8B1, ABCB11, ABCB4, TJP2	TSO
3а	м	ВБ / 33 г	Родител на дете с Интрахепатална холестаза	ATP8B1, ABCB11, ABCB4, TJP2	TSO
4а	ж	ЕП / 27 г	Родител на дете с Булозна епидермолиза, тип Herlitz	LAMC2, LAMB3, LAMA3	TSI
5а	м	ВП / 29 г	Родител на дете с Булозна епидермолиза, тип Herlitz	LAMC2, LAMB3, LAMA3	TSI

TSI – TruSight Inherited, TSC – Tru Sight Cancer, TSO – TruSight One

2 група: пациенти с фенотип, предполагащ локусна хетерогенност и неизвестна диагноза:

- фенотип съответстващ на моногенно заболяване, но данните за фенотипа са непълни или противоречиви

- данните от лабораторни изследвания съответстват частично или не съответстват на работната клинична диагноза
- отхвърлена е началната работна клинична диагноза, въз основа на проведено изследване (лабораторно, образно)

Втора група включва 26 пациенти (табл. 15).

Таблица 15. Пациенти от 2-ра група по клинични диагнози и приложен генен панел.

№	Пол	Инициали / възраст	Работна клинична диагноза	Допълнителни данни	Генен панел
Неврологични и невромускулни заболявания					
21	м	ММК / п	Obs. SMA	Не са установени делеции в <i>SMN1</i>	TSO
27	ж	ФИЗ / 3 г	Епилепсия. Специфични разстройства в развитието на двигателната функция Obs. Rett s-me	Не са установени мутации в <i>MECP2</i> и <i>SCN1A</i>	TSO
29	м	МГ / 7 г	Епилепсия	Не са установени мутации в <i>SCN1A</i>	TSO
30	ж	ГМ / 7 г	GEFS+	Не са установени мутации в <i>SCN1A</i>	TSO
43	м	МН / 3 г	Епилепсия. Преходна хиперамониемия	Повишен аланин и цитрулин в кръв; неспецифични промени в профила на ацилкарнитини в кръв	TSI
31	м	БЙ / 6 г	Аутизъм. ИНПР.	Нормален кариотип, нормален метаболитен профил, FgaX(-), SNP-array – дупликация в Xq28 с неизвестен ефект	TSO
36	м	РРР	Спастична квадрипареза	Не е установена мутация <i>PDHX</i> p.R446*	TSI
37	м	ИХС	Спастична квадрипареза	Не е установена мутация <i>PDHX</i> p.R446*	TSI
38	м	ИТМ	Спастична квадрипареза	Не е установена мутация <i>PDHX</i> p.R446*	TSI
39	м	ММ	Спастична квадрипареза, епилепсия	Не е установена мутация <i>PDHX</i> p.R446*	TSI
40	м	ЮС	Спастична квадрипареза, епилепсия	Не е установена мутация <i>PDHX</i> p.R446*	TSI
41	м	СБ	Спастична квадрипареза, епилепсия	Не е установена мутация <i>PDHX</i> p.R446*	TSI
42	м	СМ	Спастична квадрипареза, епилепсия	Не е установена мутация <i>PDHX</i> p.R446*	TSI
Метаболитни заболявания					
22	ж	ПЯ / п	Obs. Болест на Крабе	Отхвърлена болест на Крабе	TSI
23	ж	ДБ / п	Тирозинемия тип 1?	Абнормен профил на органични киселини в урина	TSI
24	ж	ХР / п	Obs. Pompe	Не са установени мутации в гена <i>GAA</i>	TSO
33	м	ИЯ / 5 г	Метаболитно заболяване - неуточнено	Неспецифични промени в	TSI

метаболитния профил				
34	м	АД / 2 г	ПМС. Метаболитно заболяване - неуточнено	Неспецифични промени в метаболитния профил, хипоплазия на езика TSI
Костно-ставни заболявания				
18	м	КН / 32	Osteogenesis imperfecta	11 фрактури на дълги кости, нисък ръст, съхранен слух TSO
28	м	НК / п	Obs. Osteogenesis imperfecta	Наличие на костни деформации, перинатална смърт, но не са установени фрактури при аутопсията TSO
Множествени малформации				
19	ж	ЖВ / п	Obs. DiGeorge s-me Obs. Noonan s-me	Не са установени патологични микроделеции / микродупликации при SNParray TSO
25	м	ТОП	ПМС - двустранна аплазия на радиус и палци, едностранна бъбречна агенезия	Не са установени патологични микроделеции / микродупликации при SNParray TSC
32	м	ИЖ / 5 г	ИНПР. Obs. WBS	Хиперкалциемия, отхвърлен е синдром на Williams-Beuren TSO
35	м	ЛГ / 7 г	ПМС. ИНПР	АВСД, Dandy-Walker вариант, aCGH – нормален резултат TSI
Други				
20	ж	АМ / 4 г	Obs. Tuberous sclerosis	Хиперпигментни петна по кожата, единично хипопигментно петно, фебрилен гърч TSC
26	м	БТ / 3	Изооставане в растежа. Частична аниридия.	Нормален резултат от aCGH TSO

TSI – TruSight Inherited, TSC – Tru Sight Cancer, TSO – TruSight One, п - починал

14 от пациентите са изследвани с генен панел, включващ 4813 гена. Изследването показва, че всеки носи средно 4,89% редки варианти. Средно 1,14% от установените варианти не са анотирани в dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) и вероятно част от тях са нови. При всеки средно 0,06% от откритите варианти са анотирани като известни патологични, асоциирани с моногенни заболявания и предразположения, а други 0,06% - с фармакогенетични дефекти. Не се наблюдават значими разлики между контролите и пациентите по отношение на общите характеристики на установените генетични варианти (таблици 16 и 17).

Таблица 16. Среден брой и характеристика на вариантите, установени при пациенти, изследвани с TruSight One панел

№	Общ брой варианти	Редки <1%		Без номер в dbSNP		Известни патологични		Вероятно патологични		Известни фармакогенетични дефекти	
		бр	%	бр	%	бр	%	бр	%	бр	%
9	8433	464	5.50	94	1.11	4	0.05	11	0.13	4	0.05
10	8304	412	4.96	80	0.96	9	0.11	11	0.13	3	0.04
11	8625	427	4.95	91	1.06	3	0.03	10	0.12	8	0.09
18	8139	329	4.04	83	1.02	7	0.09	10	0.12	5	0.06
19	7854	412	5.25	107	1.36	7	0.09	10	0.13	4	0.05
21	7770	252	3.24	62	0.80	4	0.05	9	0.12	5	0.06
24	8558	441	5.15	95	1.11	3	0.04	11	0.13	5	0.06
26	3794	280	7.38	68	1.79	4	0.11	15	0.40	2	0.05
27	7334	381	5.19	86	1.17	4	0.05	15	0.20	5	0.07
28	7939	352	4.43	83	1.05	2	0.03	18	0.23	3	0.04
29	8307	457	5.50	133	1.60	3	0.04	16	0.19	4	0.05
30	8241	460	5.58	103	1.25	2	0.02	7	0.08	7	0.08
31	8191	366	4.47	94	1.15	4	0.05	11	0.13	6	0.07
32	8126	329	4.05	76	0.94	5	0.06	17	0.21	4	0.05
Средно	7829.6	383.0	4.89	89.6	1.14	4.36	0.06	12.2	0.16	4.64	0.06

Таблица 17. Генетични варианти, според ефекта на генетичното нарушение върху структурата на кодиращия протеин или иРНК, установени при пациенти, изследвани с панел включващ 4813 гена

№	Missense	Frameshift	In frame del / ins	Splice AS / DS	Non-sense	Stop lost	Init. codon
9	2867	36	34 / 33	7 / 7	25	7	3
10	2766	34	26 / 36	6 / 4	19	6	5
11	2983	34	36 / 32	5 / 6	26	6	2
18	2750	36	29 / 34	7 / 4	14	7	2
19	2652	33	33 / 27	3 / 5	20	9	2
21	2710	32	14 / 25	4 / 5	21	9	5
24	3012	40	38 / 34	5 / 5	25	9	2
26	1394	12	11 / 15	3 / 3	14	4	2
27	2526	30	31 / 22	6 / 2	20	7	3
28	2693	33	25 / 22	6 / 5	21	7	3
29	2776	39	33 / 34	8 / 4	17	8	2
30	2723	38	40 / 28	9 / 4	15	8	3
31	2757	34	27 / 29	8 / 6	20	9	5
32	2720	35	29 / 34	7 / 2	23	6	3
Средно	2831.5	34	32 / 33.6	6 / 5.6	23.3	6.3	3.3

4.3.2. Патологични и вероятно патологични варианти при пациенти с редки болести

При пациентите от двете групи беше извършено таргетно ресеквениране на генни панели включващи от 94 до 4813 таргетни гени. Дизайнът на панелите позволява анализ на екзоните и екзон-интронните граници, но не включва 5'- и 3'- нетранслируемите райони на гените. За всеки пациент бяха анализирани и класифицирани установените генетични варианти, като за категоризиране на вариантите бяха приложени критериите, описани в раздел Материали и методи. В хода на проведеното изследване беше създадена собствена база данни с анотация на 13507 редки варианти (с глобална популационна честота <1%), включваща хромозомна позиция, референтна последователност, последователност на варианта, тип на варианта, класификация и допълнителна информация за съответния ген, транскрипт, протеин и асоциирано заболяване (ако има такова). Установените патологични и вероятно патологични варианти бяха валидирани чрез секвениране по Сангер. Секвениране по Сангер е приложено и при сегрегационния анализ на вариантите в засегнатите семейства. Сангер секвенирането е извършено в Националната генетична лаборатория, СБАЛАГ „Майчин дом“, Медицински университет София.

Известни патологични и вероятно патологични варианти, асоциирани с клиничния фенотип са установени при 11 от изследваните 17 пациенти от 1-ва група (табл. 18) и при 12 от изследваните 26 пациенти от 2-ра група (табл. 19). 8 от класифицираните като патологични варианти при пациентите от двете групи не са съобщавани досега в медицинската литература, не са публикувани в специализираните бази данни и вероятно са нови (в таблиците тези варианти са отбелязани със задебелен шрифт). Освен това при пациентите от двете групи е установено носителство на известни патологични варианти, които нямат пряка връзка с водещите клинични прояви, но са асоциирани с други моногенни заболявания. Известни патологични и вероятно патологични варианти, които не са пряко свързани с клиничния фенотип са установени при 14 от пациентите от 1-ва група и при 23 от пациентите от 2-ра група (таблицы 20 и 21).

Таблица 18. Патологични варианти, асоциирани с клиничния фенотип, установен при пациентите от 1-ва група.

№	Пол	Клинична диагноза	Резултат Ген / вариант	Генотип	Съответствие с кл. фенотип
1	ж	CF	<i>CFTR</i> : c.1520_1522delTCT, p.Phe508del и ?	хетерозигот	? само един алел
2	м	CF	<i>CFTR</i> : c.1520_1522delTCT, p.Phe508del и c.4046G>A, p.Gly1349Asp	съставен хетерозигот	да
3	м	DMD	<i>DMD</i>: g.31986568C>A, c.6502G>T, p.Glu2168Ter	хемизигот	да
4	м	DMD / BMD	<i>DMD</i> : g.31496398T>C, c.8762A>G, p.His2921Arg	хемизигот	да/не?
5	ж	Пропионова ацидурия	<i>PCCA</i> : g.100953860A>G c.1209+3A>G,	хомозигот	да
8	ж	Левциноза	<i>BCKDHA</i> : g.41928659G>A, c.979G>A, p.Glu327Lys	хомозигот	да
9	м	Zellweger spectrum	<i>HSD17B4</i> : g.118788316G>A, NM_001199291.1: c.-133G>A, NM_000414.3: c.46G>A, NP_000405.1: p.Gly16Ser, rs137853096	хомозигот	да
10	м	Дисекция на аортата	<i>ACTA2</i> : g. 90699300G>A, c.772C>T, p.Arg258Cys	хетерозигот	да
11	ж	Osteogenesis imperfecta	<i>COL1A1</i>: g.48266792delA, NM_000088.3: c.2775delT, NP_000079.2: p.Gly926ValfsTer182	хетерозигот	да
12	ж	Булозна епидермолиза	<i>COL7A1</i> : g.48626135G>A; c.2527C>T, p.Arg843Ter и g.48630971T>C; c.425A>G, p.Lys142Arg	съставен хетерозигот	да
13	м	Атаксия- телангиектазия	<i>ATM</i> : g.108190745_108190746delAG, c.6412_6413delAG, p.Glu2139IlefsTer6	хомозигот	да
16	ж	Гликогеноза	<i>PHKG2</i>: g.30764780A>T, NM_000294.2: c.458A>T, NP_000285.1: p.Asp153Val и g.30764800_30764802delCTC, NM_000294.2: c.478_480delCTC, NP_000285.1: p.Leu160del	съставен хетерозигот	да

17	ж	Niemann–Pick type C	NPC1: g.21116755T>C, NM_000271.4: c.3127A>G, NP_000262.2: p.Thr1043Ala и g.21118574_21118575delCT, NM_000271.4: c.2972_2973delAG p.Gln991Argfs	съставен хетерозигот	да
----	---	---------------------	--	-------------------------	----

Вариантите със задебелен шрифт не са регистрирани досега.

Таблица 19. Патологични варианти, асоциирани с клиничния фенотип, установени при пациентите от 2-ра група.

№	Пол	Работна клинична диагноза	Резултат ген / вариант	Генотип	Асоцииран фенотип
18	м	Osteogenesis imperfecta	PHEX: g.22132604C>T, NM_000444.4: c.1202C>T, NP_000435.3: p.Pro401Leu, rs145778165	хемизигот	Х-свързан витамин Д резистентен хипофосфатемичен рахит
20	ж	Obs. Tuberous sclerosis	FANCA: p.Ser1088Phe и g.89833576G>C, NM_000135.2:c.2574C>G, p.Ser858Arg	съставен хетерозигот	Анемия на Fanconi тип А
24	ж	Obs. Pompe	HADHA: NM_000182.4: c.1528G>C, NP_000173.2: p.Glu510Gln и NM_000182.4: c.871C>T, NP_000173.2: p.Arg291Ter	съставен хетерозигот	Trifunctional protein deficiency
25	м	ПМС - двустранна аплазия на радиус и палци, едностранна бъбречна агенезия	FANCD2: g.10106488_10106490delCCT, NM_033084.3: c.2097_2099delCCT, NP_149075.2:p.Leu700del	хомозигот	Анемия на Fanconi тип D
26	м	Изооставане в растежа. Частична аниридия.	GHR: NM_000163.4:c.535C>T, p.Arg179Cys, rs121909362	хетерозигот	? Идиопатичен нисък ръст
27	ж	Епилепсия. Специфични разстройства в развитието на двигателната функция Obs. Rett s-me	CLCN1 g.143036380_143036393delTACC CTGCGGAGGC, NM_000083.2: c.1436_1449delTACCCTGCGGA GGC, NP_000074.2: p.Pro480HisfsTer24	хетерозигот	? Myotonia congenita, dominant 160800, Myotonia congenita, recessive 255700
30	ж	GEFS+	SCN8A: g.52200885G>A, NM_014191.3:	хетерозигот	Epileptic encephalopathy, early

			c.5615G>A, NP_055006.1: p.Arg1872Gln		infantile, 13, Cognitive impairment with or without cerebellar ataxia
32	м	ИНПР. Obs. WBS	RPS6KA3: g.20195135G>A, NM_004586.2: c.913C>T, NP_004577.1: p.Arg305Ter	хемизигот	Coffin-Lowry syndrome
35	м	ПМС. ИНПР	MKS1: NM_017777.3: c.1115_1117delCCT, NP_060247.2: p.Ser372del	хомозигот	Синдром на Meckel тип 1 и Bardet-Biedl 13
36	м	Спастична квадрипареза	RNASEH2B: g.51519581G>A, NM_024570.3: c.529G>A, NP_078846.2: p.Alala177Thr	хомозигот	С-м на Aicardi-Goutieres тип 2
37	м	Спастична квадрипареза	IDS: g.148564708G>A, NM_000202.5: c.1222C>T, NP_000193.1: p.Pro408Ser	хемизигот	Mucopolysaccharidosis II?
38	м	Спастична квадрипареза	AP1S2: g.15864056A>T, NM_003916.3: c.258T>A, NP_003907.3: p.Tyr86Ter	хемизигот	Mental retardation, X-linked syndromic 5

Вариантите със задебелен шрифт не са регистрирани досега.

Таблица 20. Патологични и вероятно патологични варианти, асоциирани с други генетични заболявания, установени при пациентите от 1-ва група.

№	По л	Диагноза	Ген, вариант	Генотип	Асоцииран фенотип/ унаследяване
1	ж	Кистозна фиброза	PRSS12 Chr 4: g.119203396G>A, NM_003619.3: c.2323C>T, NP_003610.2: p.Arg775Ter, rs201069442	хетерозигот	Mental retardation, autosomal recessive 1, AP
2	м	Кистозна фиброза	ALG6 Chr 1: g.63872032T>C, NM_013339.3: c.391T>C, NP_037471.2: p.Tyr131His, rs35383149	хетерозигот	Congenital disorder of glycosylation type 1C, AP
			SUOX Chr 12: g.56398531G>A, NM_000456.2: c.1358G>A, NP_000447.2: p.Gly453Asp, rs76537761	хетерозигот	Sulfite oxidase deficiency, AP
4	м	Прогресивна мускулна	MAN2B1 Chr 19: g.12760746G>A,	хетерозигот	Mannosidosis, alpha-, types I and II, AP

		дистрофия тип Duchenne	NM_000528.3: c.2248C>T, NP_000519.2: p.Arg750Trp, rs80338680		
			<i>MKS1</i> Chr 17: g.56285514_56285516delAGG, NM_017777.3: c.1115_1117delCCT, NP_060247.2: p.Ser372del	хетерозигот	Bardet-Biedl syndrome 13, Meckel syndrome 1, AP
5	ж	Пропионова ацидурия	<i>CFTR</i> Chr 7: g.117251649T>G, NM_000492.3: c.3154T>G, NP_000483.3: p.Phe1052Val, rs150212784	хетерозигот	Cystic fibrosis, AP
			<i>PNPO</i> Chr 17: g.46024036G>A, NM_018129.3: c.674G>A, NP_060599.1: p.Arg225His	хетерозигот	Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase deficiency, AP
6	ж	3-метил-глутаконова ацидурия	<i>COG8</i> Chr 16: g.69368876G>A, NM_032382.4: c.961C>T, NP_115758.3: p.Gln321Ter	хетерозигот	Congenital disorder of glycosylation, type IIh, AP
			<i>NDUFS8</i> Chr 11: g.67799619A>G, NM_002496.3: c.1A>G, NP_002487.1: p.Met1Val	хетерозигот	Leigh syndrome due to mitochondrial complex I deficiency, AP
			<i>CDH23</i> Chr 10: g.73563128G>A, NM_022124.5: c.7823G>A, NP_071407.4: p.Arg2608His, rs202052174	хетерозигот	Deafness, autosomal recessive 12, Usher syndrome, type 1D, AP
7	ж	Мито-хондриална енцефало-патия	<i>SCNN1B</i> Chr 16: g.23360165C>G, NM_000336.2: c.245C>G, NP_000327.2: p.Ser82Cys, rs35731153	хетерозигот	Bronchiectasis with or without elevated sweat chloride 1, АД
8	ж	Левциноза	<i>NBN</i> Chr 8: g.90990521T>C, NM_002485.4: c.511A>G, NP_002476.2: p.Ile171Val, rs61754966	хетерозигот	Aplastic anemia, AP
9	м	Zellweger spectrum	<i>TRIOBP</i> Chr 22: g.38131357G>T, NM_001039141.2: c.5014G>T, NP_001034230.1: p.Gly1672Ter, rs200045032	хетерозигот	Deafness 28, AP
			<i>KCNK18</i> Chr 10: g.118969065_118969066delCT, NM_181840.1:	хетерозигот	Migraine with aura, 13

			c.410_411delCT, NP_862823.1: p.Phe139TrpfsTer25		
			<i>MYBPC3</i> Chr 11: g.47360209G>A, NM_000256.3: c.2170C>T, NP_000247.2: p.Arg724Trp, rs200399246	хетерозигот	Familial hypertrophic cardiomyopathy 4
10	м	Дисекция на аортата	<i>CPT2</i> Chr 1: g.53668099C>T, NM_000098.2: c.338C>T, NP_000089.1: p.Ser113Leu, rs74315294, rs17355168	хетерозигот	Carnitine palmitoyltransferase II deficiency, AP
			<i>IL36RN</i> Chr 2: g.113820124C>T, NM_173170.1: c.338C>T, NP_775262.1: p.Ser113Leu, rs144478519	хетерозигот	Psoriasis 14, pustular
			<i>SI</i> Chr 3: g.164764786A>C, NM_001041.3: c.1730T>G, NP_001032.2: p.Val577Gly, rs121912615	хетерозигот	Sucrase-isomaltase deficiency
			<i>RAD50</i> Chr 5: g.131953939_131953940delAG , NM_005732.3: c.3342_3343delAG, NP_005723.2: p.Glu1115ThrfsTer11	хетерозигот	Nijmegen breakage syndrome-like disorder, AP
			<i>TGFBI</i> Chr 5: g.135398363G>C, NM_000358.2: c.1998G>C, NP_000349.1: p.Arg666Ser, rs121909217	хетерозигот	Corneal epithelial dystrophy
			<i>ASS1</i> Chr 9: g.133370313C>T, NM_054012.3: c.1030C>T, NP_446464.1: p.Arg344Ter	хетерозигот	Citrullinemia type I, AP
			<i>GDF3</i> Chr 12: g.7842773G>A, NM_020634.1: c.796C>T, NP_065685.1: p.Arg266Cys, rs140926412	хетерозигот	Microphthalmia, isolated, with coloboma 6, AP
			<i>PKD1</i> Chr 16: g.2168022C>A, NM_001009944.2: c.971G>T, NP_001009944.2: p.Arg324Leu, rs199476099	хетерозигот	Polycystic kidney disease, adult type I, АД
11	ж	Osteogenesis imperfecta	<i>MEFV</i> Chr 16: g.3293447C>G,	хетерозигот	Familial Mediterranean fever,

			NM_000243.2: c.2040G>C, NP_000234.1: p.Met680Ile, rs28940580		AP
			<i>HARS2</i> Chr 5: g.140075168C>T, NM_012208.2: c.475C>T, NP_036340.1: p.Arg159Ter	хетерозигот	?Perrault syndrome 2, AP
			<i>NEUROG3</i> Chr 10: g.71332332G>T, NM_020999.3: c.468C>A, NP_066279.2: p.Cys156Ter, rs199756893	хетерозигот	Diarrhea 4, malabsorptive, congenital, AP
			<i>PDE6C</i> Chr 10: g.95381740C>T, NM_006204.3: c.775C>T, NP_006195.3: p.Arg259Ter	хетерозигот	Cone dystrophy 4
			<i>GCH1</i> Chr 14: g.55310817T>C, NM_000161.2: c.671A>G, NP_000152.1: p.Lys224Arg, rs41298442	хетерозигот	Dystonia, dopa- responsive, with or without hyperphenylalaninemi a, AP
12	ж	Дистрофична булозна епидермолиза	<i>NPHP3</i> Chr 3: g.132423185C>A, NM_153240.4: c.1381G>T, NP_694972.3: p.Glu461Ter, rs119456961	хетерозигот	Meckel syndrome 7, Nephronophthisis 3, Renal-hepatic- pancreatic dysplasia 1, AP
14	м	Гликогеноза	<i>DHCR7</i> Chr 11: g.71155998T>C, NM_001163817.1: c.1A>G, NP_001157289.1: p.Met1Val, rs104886033	хетерозигот	Smith-Lemli-Opitz syndrome, AP
16	ж	Гликогеноза	<i>F10</i> Chr 13: g.113795286G>A, NM_000504.3: c.424G>A, NP_000495.1: p.Glu142Lys, rs61753266	хетерозигот	Factor X deficiency, AP
			<i>SERPINA6</i> Chr 14: g.94780642A>T, NM_001756.3: c.344T>A, NP_001747.2: p.Leu115His, rs113418909	хетерозигот	Corticosteroid-binding globulin deficiency
			<i>FH</i> Chr 1: g.241661228_241661230dupTT T, NM_000143.3: c.1431_1433dupAAA, NP_000134.2: p.Lys477dup, rs367543046	хетерозигот	Fumarase deficiency, AP
			<i>VWF</i> Chr 12:	хетерозигот	von Willibrand disease, type 3, AP

			g.6155900_6155901delAG, NM_000552.3: c.2269_2270delCT, NP_000543.2: p.Leu757ValfsTer22, rs61748465		
17	ж	Niemann–Pick type C	CD96 Chr 3: g.111366452_111366453delTT, NM_198196.2: c.1588_1589delTT, NP_937839.1: p.Phe530LeufsTer46	хетерозигот	C syndrome, AP
			PKHD1 Chr 6: g.51947315delG, NM_138694.3: c.156delC, NP_619639.3: p.Asn53ThrfsTer11	хетерозигот	Polycystic kidney and hepatic disease, AP
			KCNJ2 Chr 17: g.68171457G>A, NM_000891.2: c.277G>A, NP_000882.1: p.Val93Ile, rs147750704	хетерозигот	Atrial fibrillation, familial, 9
			ANTXR2 Chr 4: g.80905972C>T, NM_001145794.1: c.1086+1G>A	хетерозигот	Hyaline fibromatosis syndrome, AP
			FOLR1 Chr 11: g.71906793T>C, NM_016725.2: c.493+2T>C, rs144637717	хетерозигот	Neurodegeneration due to cerebral folate transport deficiency, AP

Таблица 21. Патологични и вероятно патологични варианти, асоциирани с други генетични заболявания, установени при пациентите от 2-ра група.

№	Пол	Работна клинична диагноза	Ген / вариант	Генотип	Асоцииран фенотип / унаследяване
18	м	Osteogenesis imperfecta	BEST1 chr 11: g.61730157_61730158 delAA, NM_001139443.1: c.1351_1352delAA, NP_001132915.1: p.Ser452PhefsTer2	хетерозигот	Vitreoretinopathy, АД; Bestrophinopathy, AP
			GALC chr 14: g.88452941T>C, NM_000153.3: c.334A>G, NP_000144.2: p.Thr112Ala, rs147313927	хетерозигот	Krabbe disease, AP
			HEXA chr 15: g.72643569T>C, NM_000520.4: c.577A>G, NP_000511.2: p.Met193Val	хетерозигот	GM2-gangliosidosis, Tay-Sachs disease, AP
			CDC6 chr 17: g.38450658G>C, NM_001254.3: c.986G>C, NP_001245.1: p.Arg329Thr	хетерозигот	Meier-Gorlin syndrome 5, AP
			SEC23B chr 20: g.18491519C>T, NM_006363.4: c.40C>T, NP_006354.2: p.Arg14Trp, rs121918222	хетерозигот	Dyserythropoietic anemia, congenital, type II, AP
19	ж	Obs. DiGeorge s-me Obs. Noonan s-me	CPT2 chr 1: g.53666450T>C, NM_000098.2: c.212T>C, NP_000089.1: p.Leu71Pro и chr 1: g.53676371T>C, NM_000098.2: c.1025T>C, NP_000089.1: p.Met342Thr, rs144658100	съставен хетерозигот	CPT II deficiency, lethal neonatal, AP
			OTOA chr16: g.21747639G>T, NM_144672.3: c.2359G>T, NP_653273.3: p.Glu787Ter, rs200988634	хетерозигот	Deafness, 22, AP
			PKD1 chr 16: g.2168022C>A, NM_001009944.2: c.971G>T, NP_001009944.2: p.Arg324Leu, rs199476099	хетерозигот	Polycystic kidney disease, adult type, АД
			NAGA chr 22: g.42457056C>T, NM_000262.2: c.973G>A,	хетерозигот	Schindler disease, AP

			NP_000253.1: p.Glu325Lys, rs121434529		
21	м	Obs. SMA	MUT chr 6: g.49426868delG, NM_000255.3: c.312delC, NP_000246.2: p.Trp105GlyfsTer75	хетерозигот	Methylmalonic aciduria, mut(0) type, AP, нов вариант
			GJB2 chr 13: g.20763686delC, NM_004004.5: c.35delG, NP_003995.2: p.Gly12ValfsTer2, rs1801002, rs80338939	хетерозигот	Deafness, autosomal dominant 3A, Deafness, autosomal recessive 1A, Keratitis-ichthyosis-deafness syndrome
			PC chr 11: g.66617567G>C, NM_022172.2: c.2739C>G, NP_071504.2: p.Ile913Met, rs145489836	хетерозигот	Pyruvate carboxylase deficiency, AP
			MEFV chr 16: g.3293447C>G, NM_000243.2: c.2040G>C, NP_000234.1: p.Met680Ile, rs28940580	хетерозигот	Familial Mediterranean fever, AP
22	ж	Метаболитно заболяване. Болест на Крабе	SGSH chr 17: g.78186041C>T, NM_000199.3:c.778G>A, NP_000190.1:p.Ala260Thr	хетерозигот	Mucopolysaccharidosis type IIIA, AP
23	ж	Тирозинемия тип 1?	TAT chr 16: g.71604215C>T, NM_000353.2: c.998G>A, NP_000344.1: p.Arg333His	хетерозигот	Tyrosinemia, type II, AP
24	ж	Obs. Болест на Помпе	HBB chr 11: g.5248004G>A, NM_000518.4:c.118C>T, NP_000509.1:p.Gln40Ter rs11549407	хетерозигот	Beta-zero-thalassemia, AP
			AMPD1 Chr 1: g.115236057G>A, NM_000036.2:c.133C>T NP_000027.2:p.Gln45Ter rs17602729	хомозигот	Muscle AMP deaminase deficiency, AP
26	м	Изоставане в растежа. Частична аниридия.	ASPM chr 1: g.197069701T>C, NM_018136.4: c.8680A>G, NP_060606.3: p.Arg2894Gly	хетерозигот	Microcephaly 5, primary, AP
			SGCA chr 17: g.48245770C>A, NM_000023.2: c.421C>A, NP_000014.1: p.Arg141Ser, rs35130237	хетерозигот	Muscular dystrophy, limb-girdle, type 2D, AP

27	ж	Эпилепсия. Специфични разстройства в развитието на двигателната функция Obs. Rett s-me	<i>AGRN</i> chr1: g.984265C>A, NM_198576.3: c.4124C>A, NP_940978.2: p.Pro1375Gln	хетерозигот	Myasthenic syndrome, congenital, 8, AP
			<i>PRSS1</i> chr 7: g.142458531C>T, NM_002769.4: c.166C>T, NP_002760.1: p.Gln56Ter, rs147366981	хетерозигот	Pancreatitis, hereditary, АД; Trypsinogen deficiency, AP
			<i>PSPH</i> chr 7: g.56087292delC, NM_004577.3: c.275+1delG, rs139106189	хетерозигот	Phosphoserine phosphatase deficiency, AP
			<i>MTR</i> chr 1: g.237025584C>T, NM_000254.2: c.2245C>T, NP_000245.2: p.Pro749Ser, rs142250261	хетерозигот	Homocystinuria- megaloblastic anemia, cblG complementation type, AP
28	м	Obs. Osteogenesis imperfecta	<i>SKI</i> chr 1: g.2237568A>T, NM_003036.3: c.1877A>T, NP_003027.1: p.Lys626Met	хомозигот	Shprintzen- Goldberg syndrome, АД
29	м	Эпилепсия	<i>MPO</i> chr 17: g.56350828_56350841 delGGGTTGGGTTCAT, NM_000250.1: c.1555_1568 delATGGAACCCAACCC, NP_000241.1: p.Met519ProfsTer21	хетерозигот	Myeloperoxidase deficiency, AP
			<i>POLR3A</i> chr 10: g.79743726delA, NM_007055.3: c.3381delT, NP_008986.2: p.Phe1127LeufsTer14	хетерозигот	Leukodystrophy, hypomyelinating, 7, with or without oligodontia and/ or hypogonadotropic hypogonadism, AP
			<i>TSEN54</i> chr 17: g.73518201A>T, NM_207346.2: c.1039A>T, NP_997229.2: p.Lys347Ter, rs143604970	хетерозигот	Pontocerebellar hypoplasia type 2A, 4, AP
			<i>WDR72</i> chr 15: g.53901711T>C, NM_182758.2: c.2951A>G, NP_877435.2: p.Gln984Arg	хетерозигот	Amelogenesis imperfecta, type IIA3
30	ж	GEFS+	<i>BSND</i> chr 1: g.55474212G>A, NM_057176.2: c.874G>A, NP_476517.1: p.Glu292Lys	хетерозигот	Bartter syndrome, type 4a, Sensorineural deafness with mild renal dysfunction, AP
			<i>C7orf10, SUGCT</i> chr 7: g.40228168C>T, NM_001193311.1: c.322C>T,	хетерозигот	Glutaric aciduria III, AP

			NP_001180240.1: p.Arg108Ter, rs137852862		
31	м	Аутизъм.	<i>ATR</i> chr 3: g.142281732C>T, NM_001184.3: c.512G>A, NP_001175.2: p.Trp171Ter	хетерозигот	?Cutaneous telangiectasia and cancer syndrome, familial, АД; Seckel syndrome 1, AP
			<i>CD36</i> chr 7: g.80300413C>A, NM_001001547.2: c.939C>A, NP_001001547.1: p.Cys313Ter	хетерозигот	Platelet glycoprotein IV deficiency, AP
			<i>GIGYF2</i> chr 2: g.233712225_233712226insCG, NM_001103147.1: c.3691_3692insCG, NP_001096617.1: p.Gln1232HisfsTer25	хетерозигот	{Parkinson disease 11}, АД
			<i>NDUFS2</i> chr 1: g.161183265G>A, NM_004550.4: c.1212G>A, (p.=), rs145959971	хетерозигот	Mitochondrial complex I deficiency, AP
			<i>PTPRF</i> chr 1: g.44079289G>A, NM_002840.3: c.3974G>A, NP_002831.2: p.Gly1325Asp	хетерозигот	?Breasts and/or nipples, aplasia or hypoplasia of, 2, AP
32	м	ИНПР. Obs. WBS	<i>NDUFA11</i> chr 19: g.5896466C>A, NM_001193375.1: c.311G>T, NP_001180304.1: p.Arg104Leu, rs199842745	хетерозигот	Mitochondrial complex I deficiency, AP
			<i>CFTR</i> chr 7: g.117144344C>T, NM_000492.3: c.91C>T, NP_000483.3: p.Arg31Cys, rs1800073	хетерозигот	Cystic fibrosis, AP
33	м	Метаболично заболяване - неуточнено	<i>MMACHC</i> chr 2: g.45973216_45973217insA, NM_015506.2: c.270_271insA, NP_056321.2: p.Arg91LysfsTer14	хетерозигот	Methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type, AP
			<i>CFTR</i> chr 7: g.117251649T>G, NM_000492.3: c.3154T>G, NP_000483.3: p.Phe1052Val, rs150212784	хетерозигот	Cystic fibrosis
			<i>F8</i> chr X: g.154156921C>T, NM_000132.3: c.5144G>A, NP_000123.1: p.Arg1715Gln	хемизигот	Hereditary factor VIII deficiency disease, XP
34	м	ПМС.	<i>POMT1</i>	хетерозигот	Muscular dystrophy-

		Метаболично заболяване - неуточнено	chr 9: g.134394834C>G, NM_007171.3: c.1611C>G, NP_009102.3: p.Ser537Arg, rs150367385		dystroglycanopathy, AP
			<i>DYNC2H1</i> chr 11: g.103006615A>G, NM_001080463.1: c.2512A>G, NP_001073932.1: p.Thr838Ala	хомозигот	Short-rib thoracic dysplasia 3 with or without polydactyly, AP
35	м	ПМС. ИНПР	<i>PRSS12</i> chr 4: g.119234443G>A, NM_003619.3: c.1402C>T, NP_003610.2: p.Arg468Ter	хетерозигот	Mental retardation, 1, AP
			<i>PLEC</i> chr 8: g.144996976C>T, NM_201380.2: c.7532G>A, NP_958782.1: p.Arg2511Gln, rs201417343	хетерозигот	Epidermolysis bullosa simplex, АД, AP
			<i>CDH23</i> chr 10: g.73437218C>T, NM_022124.5: c.1520C>T, NP_071407.4: p.Ser507Leu, rs201584731	хетерозигот	Deafness, 12, Usher syndrome, type 1D, AP, ДГ
36	м	Спастична квадрипареза	<i>GBA</i> chr 1: g.155205634T>C, NM_001005741.2: c.1226A>G, NP_001005741.1: p.Asn409Ser, rs76763715	хетерозигот	Gaucher disease, type I, AP;
			<i>MMACHC</i> chr 2: g.45973128G>A, NM_015506.2: c.182G>A, NP_056321.2: p.Arg61Gln, rs201777449	хетерозигот	Methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type, AP
			<i>DYNC2H1</i> chr 11: g.103026190G>C, NM_001080463.1: c.3704G>C, NP_001073932.1: p.Arg1235Thr	хетерозигот	Short-rib thoracic dysplasia 3 with or without polydactyly, AP
			<i>CLCN7</i> chr 16: g.1498996C>T, NM_001287.5: c.1768G>A, NP_001278.1: p.Ala590Thr	хетерозигот	Osteopetrosis 2, АД, Osteopetrosis 4, AP
			<i>MEFV</i> chr 16: g.3293310A>G, NM_000243.2: c.2177T>C, NP_000234.1: p.Val726Ala, rs28940579	хетерозигот	Familial Mediterranean fever, AP
37	м	Спастична квадрипареза	<i>PTEN</i> chr 10: g.89720730G>A, NM_000314.4: c.881G>A, NP_000305.3: p.Ser294Asn	хетерозигот	VATER association with macrocephaly and ventriculomegaly, AP?; PTEN hamartoma

					syndromes, АД
			<i>CPT1A</i> chr 11: g.68542863G>A, NM_001876.3: c.1496C>T, NP_001867.2: p.Ala499Val	хетерозигот	CPT deficiency, hepatic, type IA, AP
			<i>CLCN7</i> chr 16: g.1498996C>T, NM_001287.5: c.1768G>A, NP_001278.1: p.Ala590Thr	хетерозигот	Osteopetrosis, 2, АД; Osteopetrosis, 4, AP
			<i>ARSA</i> chr 22: g.51065404A>C, NM_001085426.2: c.542T>G, NP_001078895.2: p.Ile181Ser, rs74315457	хетерозигот	Metachromatic leukodystrophy, AP
38	м	Спастична квадрипареза	<i>VPS13B</i> chr 8: g.100568695G>T, NM_017890.4: c.4838G>T, NP_060360.3: p.Gly1613Val	хетерозигот	Cohen syndrome, AP
			<i>SMPD1</i> chr 11: g.6414531T>G, NM_000543.4: c.1177T>G, NP_000534.3: p.Trp393Gly, rs120074125	хетерозигот	Niemann-pick disease, intermediate, protracted neurovisceral, AP
			<i>CPT1A</i> chr 11: g.68542863G>A, NM_001876.3: c.1496C>T, NP_001867.2: p.Ala499Val	хетерозигот	CPT deficiency, hepatic, type IA, AP
			<i>DYNC2H1</i> chr 11: g.103026190G>C, NM_001080463.1: c.3704G>C, NP_001073932.1: p.Arg1235Thr	хетерозигот	Short-rib thoracic dysplasia 3 with or without polydactyly, AP
39	м	Спастична квадрипареза, эпилепсия	<i>PYGM</i> chr 11: g.64525251C>T, NM_005609.2: c.660G>A, (p.=), rs142234258	хетерозигот	McArdle disease, AP
40	м	Спастична квадрипареза, эпилепсия	<i>PLEC</i> chr 8: g.144998219G>A, NM_201380.2: c.6289C>T, NP_958782.1: p.Arg2097Cys	хетерозигот	Epidermolysis bullosa simplex, АД, AP
			<i>CPT1A</i> chr 11: g.68542863G>A, NM_001876.3: c.1496C>T, NP_001867.2: p.Ala499Val	хетерозигот	CPT deficiency, hepatic, type IA, AP
			<i>VDR</i> chr 12: g.48240458C>T, NM_001017536.1: c.1039G>A, NP_001017536.1: p.Val347Ile, rs144756403	хетерозигот	Rickets, vitamin D- resistant, type IIA, AP
			<i>NPC2</i>	хетерозигот	Niemann-Pick disease,

			chr 14: g.74953134C>T, NM_006432.3: c.88G>A, NP_006423.1: p.Val30Met, rs151220873		type C2, AP
			<i>PYGM</i> chr 11: g.64525251C>T, NM_005609.2: c.660G>A, (p.=), rs142234258	хетерозигот	McArdle disease, AP
			<i>G6PD</i> chr X: g.153762634G>A, NM_000402.3: c.653C>T, NP_000393.4: p.Ser218Phe, rs5030868	хемизигот	G6PD Mediterranean, XP
41	м	Спастична квадрипареза, епилепсия	<i>ETHE1</i> chr 19: g.44031251G>T, NM_014297.3: c.79C>A, NP_055112.2: p.Gln27Lys	хетерозигот	Ethylmalonic encephalopathy, AP
42	м	Спастична квадрипареза, епилепсия	<i>DYNC2H1</i> chr 11: g.103026190G>C, NM_001080463.1: c.3704G>C, NP_001073932.1: p.Arg1235Thr	хетерозигот	Short-rib thoracic dysplasia 3 with or without polydactyly, AP
			<i>ABCA3</i> chr16: g.2369821G>T, NM_001089.2: c.634C>A, NP_001080.2: p.Leu212Met, rs139695699	хетерозигот	Surfactant metabolism dysfunction, pulmonary, 3, AP
			<i>TAT</i> chr 16: g.71603836T>C, NM_000353.2: c.1046A>G, NP_000344.1: p.Asn349Ser, rs138304751	хетерозигот	Tyrosinemia, type II, AP
43	м	Епилепсия. Преходна хипер- амониемия	<i>CPS1</i> chr 2: g.211469907G>T, NM_001122633.2: c.1936G>T, NP_001116105.1: p.Ala646Ser, rs142693704	хетерозигот	Carbamoylphosphate synthetase I deficiency, AP

4.3.3. Патологични и вероятно патологични варианти при родственици на пациенти с редки болести

В три семейства, в които пробандите не бяха достъпни за генетичен анализ, бяха изследвани здрави родственици от първа степен на болните. И в трите семейства пробандите са загинали от моногенни заболявания, които според приложените критерии ги отнасят към 1-ва група. Патологични и вероятно патологични варианти, асоциирани с конкретния фенотип, бяха установени и в трите семейства (табл. 22).

Таблица 22. Патологични и вероятно патологични варианти, установени при здрави родственици на болни.

№	Диагноза на пробанда	Роднинска връзка с пробанда	Резултат ген, вариант, генотип
1a	MPS-III B (Sanfilippo B)	сестра	NAGLU: chr17: g. 40695196A>G, NM_000263.3:c.1172A>G, NP_000254.2:p.Tyr391Cys , хетерозигот
2a	Прогресивна интрахепатална холестаза	майка	? Вероятна делеция на <i>ABCB11</i>
3a	Прогресивна интрахепатална холестаза	баща	<i>ABCB11</i> chr2: g.169787209A>T, NM_003742.2:c.3377T>A, NP_003733.2:p.Leu1126Ter , хетерозигот
4a	Булозна епидермолиза	майка	<i>LAMB3:</i> c.1133-22G>A , хетерозигот
5a	Булозна епидермолиза	баща	<i>LAMB3:</i> c.1133-22G>A , хетерозигот

Вариантите със задебелен шрифт не са регистрирани досега.

4.4.Обсъждане на резултатите от NGS анализа на пациенти с Редки генетични болести

През последните години секвенирането от ново поколение прогресивно заменя традиционните технологии за ДНК диагностика. Вместо традиционния подход за изследване „ген-по-ген“, технологията позволява едновременно „прочитане“ на големи набори от гени. Нещо повече, научният прогрес бързо разширява групата на "генетичните заболявания“. В сравнение с предходната "революция" в молекулярна диагностика - въвеждането на микрочипове като инструмент за установяване на геномни копийни варианти - NGS засяга много повече аспекти на рутинната генетична диагностика (de Vries BBA, Pfundt R, Leisink M et al, 2005). Рязкото намаляване на цената, съчетано с увеличен добив на данни за кратък период от време, превърна задача, като секвениране генома на един индивид, от проект изискващ многогодишните усилия на множество лаборатории, в „лабораторен тест“, който може да се осъществи в една лаборатория за обозримо кратък период. Основното предизвикателство по отношение на секвенирането от ново поколение не е самата технология, а интерпретацията на данните, получени с тази технология и ползването им в контекста на конкретно клинично приложение.

NGS анализът на пациентите с клинични симптоми на редки генетични заболявания показва, че приложението на новите технологии има капацитета да подобри съществено генетичната диагностика на болестите, които се характеризират с алелна и локусна хетерогенност. При изследваните пациенти този анализ разкри нови генни мутации с патологичен ефект и съпътстващи неочаквани абнормни находки, свързани със странични клинични проблеми.

В хода на настоящото проучване са изследвани общо 43 лица засегнати от различни заболявания с предполагаема моногенна етиология. Пациентите бяха разпределени в две групи в зависимост от очакваната генетична хетерогенност. В 1-ва група бяха включени лицата, чиито клинични симптоми и съответно работни диагнози, са еднозначно асоциирани с известни моногенни заболявания без локусна хетерогенност или с ограничена локусна хетерогенност, докато във 2-ра група бяха включени пациенти с подозиран моногенен дефект, но на практика неизвестна диагноза и очаквана изразена локусна хетерогенност (> 20 различни гена). Сравнението на резултатите в двете групи

показа, че по-голям шанс за достигане до етиологична диагноза имат пациентите с клинично разпознаваем фенотип на заболявания с относително хомогенна генетична етиология (еднозначна генетична диагноза е установена при ~64% в група 1 (11 от 17 изследвани) срещу ~38 % във 2-ра група (10 от 26 изследвани). Патологични генни варианти, съответстващи на конкретна диагноза на моногенно заболяване, асоциирани с клиничните симптоми са установени общо при 48% от изследваните пациенти. При пациенти № 9, 10 и 16, като и при здравите родственици на болни (1а, 3а, 4а и 5а) резултатът от анализа позволи прецизиране на диагнозата и провеждане на адекватна генетична консултация. При 4 (~23%) пациенти от 1-ва група, етиологичната причина за болестния фенотип не беше установена (пациенти № 6, 7, 14 и 15). При пациент №1 беше намерен само един патологичен алел, асоцииран с клиничния фенотип, в хетерозиготно състояние, което при болести с автозомно рецесивен тип на унаследяване не дава възможност еднозначно да се потвърди или отхвърли работната клинична диагноза. Резултатът на пациент №1 е фалшиво негативен и ако данните от ДНК секвенционния анализ се интерпретират независимо от фенотипа, този резултат би довел до погрешно заключение, че пациент №1 е само носител на муковисцидоза, но не болен.

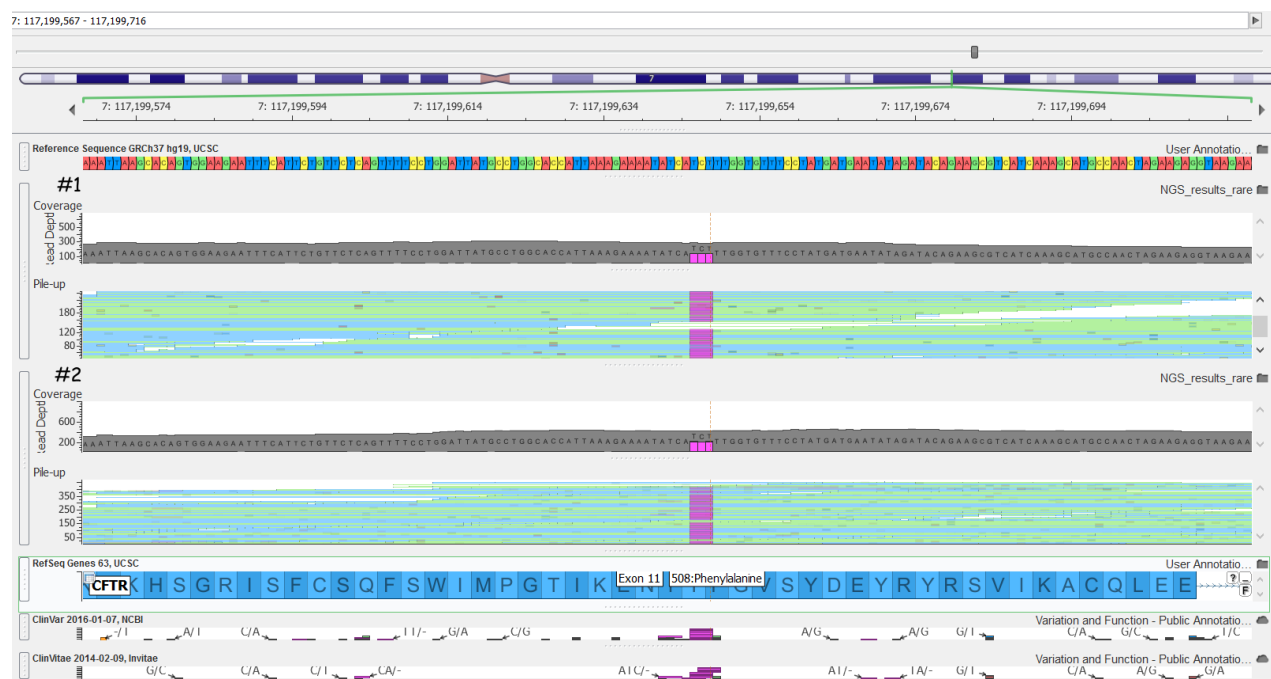
4.4.1. Обсъждане на установените патологични ДНК варианти при пациенти от 1-ва група

- *Патологични варианти в гена CFTR, при пациенти с фенотип на Кистозна фиброза*

Пациенти 1 и 2 са с клинична диагноза Муковисцидоза. При ДНК скрининг за мутации в *CFTR* гена и при двамата пациенти е установена само по една мутация, асоциирана с болестния фенотип (p.Phe508del) в хетерозиготно състояние.

ДНК секвенционният анализ от ново поколение доведе до установяване и на втората патогенна мутация при пациент 2 - *CFTR*: p.Gly1349Asp. Резултатът е потвърден със секвениране по Сангер. Мутацията е известна и е съобщавана при пациенти с муковисцидоза. Замяната на глицин с аспартат в позиция 1349 на *CFTR* протеина нарушава структурата на втория нуклеотид-свързващ домен (*NBD2*) и се отнася към клас 3 мутациите (Logan, J., 1994).

На фигура 13 е представен екзон 11 на *CFTR* гена при пациенти № 1 и 2. Делетираните нуклеотиди са маркирани.



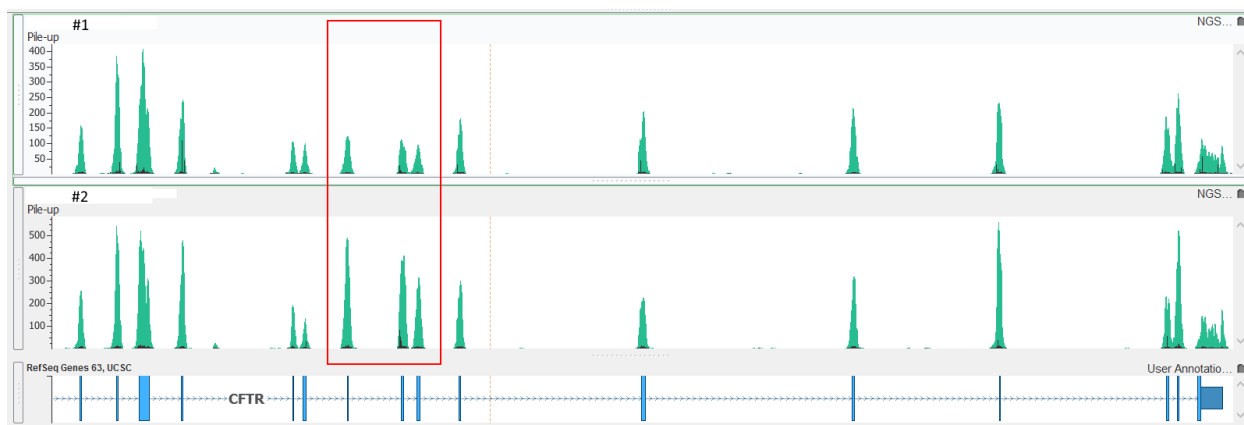
Фигура 13 Мутация в *CFTR*: p.Phe508del

На фигура 14 е представен екзон 25 на гена *CFTR* при пациент №2. Замененият нуклеотид е маркиран.



Фигура 14 Мутация *CFTR*: p.Gly1349Asp

При ДНК анализа чрез секвениране на пациент 1 не беше установена втора патологична мутация в кодиращата последователност на гена *CFTR*. Последващо изследване чрез MLPA (в НГЛ) установи хетерозиготна делеция на 18-ти до 20-ти екзони на гена *CFTR* при пациента. Audrezet и съавт. (2004) при изследване на кохорта от 39 подробно характеризирани пациенти с класическа форма на муковисцидоза и поне един неизвестен алел, намират големи пренареждания на *CFTR* гена от типа на екзонни делеции / дупликации в 16% от изследваните. При сравнение на данните от секвенирането на пациент 1 с данните на други пациенти, изследвани със същия генен панел се установява разлика в съотношението на броя прочити за екзоните, обхванати от делецията и съседните екзони с нормален брой копия (фигура 15). Вероятно в бъдеще данните от NGS анализ ще могат да се ползват за разкриване на генни / екзонни делеции / дупликации.



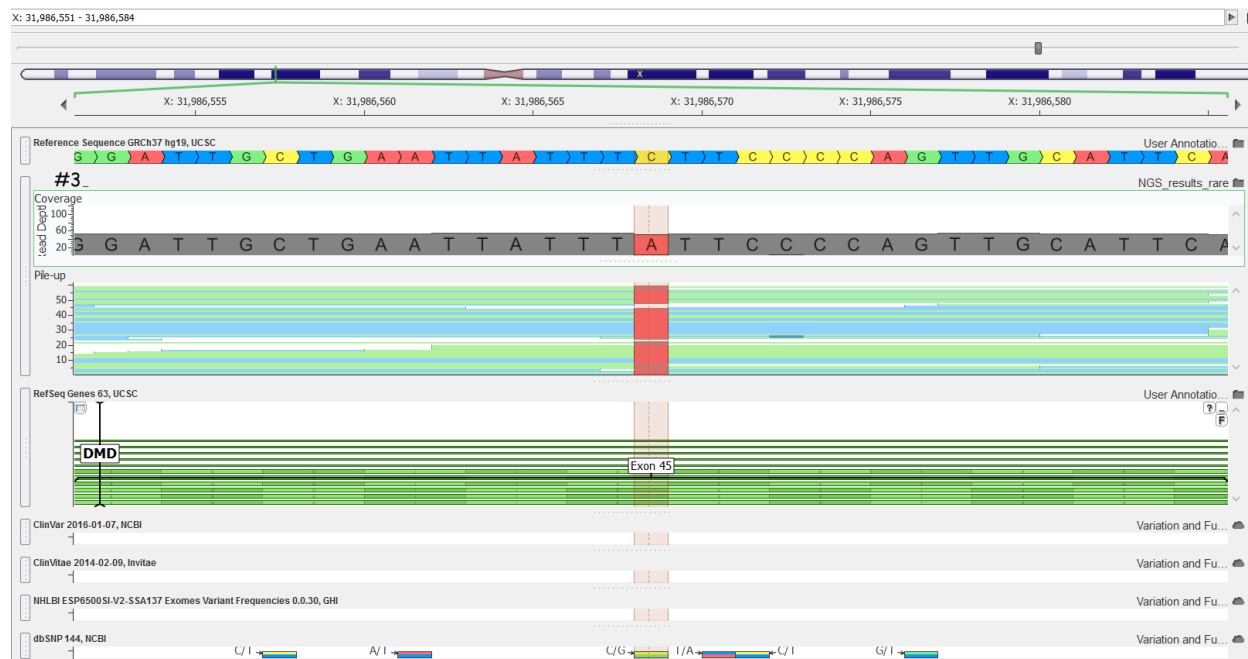
Фигура 15. Показва визуално данните от секвенирането за пациенти №1 и 2 в участъка от 12-ти до 27-ми екзон на гена *CFTR*. С червено са оградени екзоните, обхванати от делецията при пациент №1 (екзон 18-20). В зелено са представени ДНК фрагментите на пациенти № 1 и 2, картирани спрямо референтната ДНК последователност на гена *CFTR*.

- **Патологични варианти в гена *DMD* при пациенти с фенотип на мускулна дистрофия**

Двама от изследваните пациенти (3 и 4) от 1-ва група са момчета с клинични данни за мускулна дистрофия тип Дюшен и негативен резултат от проведен ДНК анализ за делеции/дупликации в *DMD* гена и за най-честите мутации в *CAPN3* гена.

При пациент 3 е установена точкова мутация в дистрофиновия ген *DMD*: g.31986568C>A, c.6502G>T, p.Glu2168Ter в хемизиготно състояние.

Мутацията представлява замяна на цитозин с аденин в позиция 31986568 в X-хромозомата. Вариантът води до възникване на преждевременен стоп-кодон в 45-ти екзон, вследствие на замяна на първата база в кодон 2168, кодиращ аминокиселината глутамин (Gln). Мутацията не е регистрирана досега. Вариантът е класифициран като патологичен, тъй като формирането на стоп-кодон в кодиращата последователност би довело до синтез на белтъчен продукт със скъсена аминокиселинна верига. Мутацията засяга централния домен на дистрофина (спектрин подобен мотив 17). Други нонсенс мутации в *DMD* гена са съобщавани при пациенти с вариабилен по тежест фенотип на дистрофинопатия (Bulman, D. E., et al, 1991; Tran, V. K., et al, 2007; Buzin, C. H., et al, 2005; Ginjaar, I. B., et al, 2000; Winnard, A. V., et al, 1992; Roberts, R. G., et al, 1992). Клиничните симптоми на пациент №3 са типични за прогресивна мускулна дистрофия тип Дюшен: мускулна слабост с предимно засягане на проксималните мускулни групи, лесна уморяемост, повишена серумна креатинкиназа - >1000 UI/l и задълбочаване на симптомите с напредване на възрастта.



Фигура 16 Мутация в дистрофиновия ген *DMD*: g.31986568C>A, c.6502G>T, p.Glu2168Ter

На фигура 16 е представен 45-ти екзон на *DMD* гена с генна мутация при пациент №3. Замененият нуклеотид е маркиран.

При пациент 4 е установен генетичен вариант в *DMD* гена, водещ до замяна на единична аминокиселина с друга в полипептидната верига на дистрофина: chrX: g.31496398T>C, NM_004006.2:c.8762A>G, NP_003997.1:p.His2921Arg. На фигура 17 е представена мутацията в 59-ти екзон на *DMD* гена. Замененият нуклеотид е маркиран.



Фигура 17 Мутация в дистрофиновия ген *DMD*: chrX: g.31496398T>C, NM_004006.2:c.8762A>G, NP_003997.1:p.His2921Arg. при пациент 4

Установеният вариант *DMD*: p.His2921Arg е в хемизиготно състояние. Генната мутация представлява замяна на тимидин с цитозин в позиция 31496398 на X-хромозомата, водеща до замяна на аминокиселината хистидин (His) с аргинин (Arg) в позиция 2921 на белтъчния продукт на гена *DMD*. Вариантът е регистриран в OMIM като патологичен, асоцииран с фенотип на „Мускулна дистрофия тип Бекер“ (OMIM: 300377.0063; dbSNP: 1800279; Lenk U., et al, 1994). Допускаме, че е възможно мутацията да е бенигнен вариант, тъй като се открива с честота над 1% при европейците изследвани по проекта NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), като 48 от тях са мъже хемизиготи. При пациент 4 не бяха установени известни патологични варианти в ДНК последователността на други гени, асоциирани с фенотип на мускулна дистрофия. Все пак

панелът ползван при секвенирането не включва всички гени, чиито мутации се асоциират с фенотип на мускулна дистрофия и анализът не може да изключи наличие на екзонни делеции / дупликации в гените с нормална ДНК последователност.

При същия пациент е установено хетерозиготно носителство на 2 патологични варианта в гени, асоциирани с други автозомно-рецесивни моногенни заболявания:

а) *MAN2B1*:c.2248C>T: конкретният вариант в гена *MAN2B1* е асоцииран с фенотип на дефицит на алфа-манозидаза и е описан при хомозиготни пациенти със заболяването (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV0000001755.1/>).

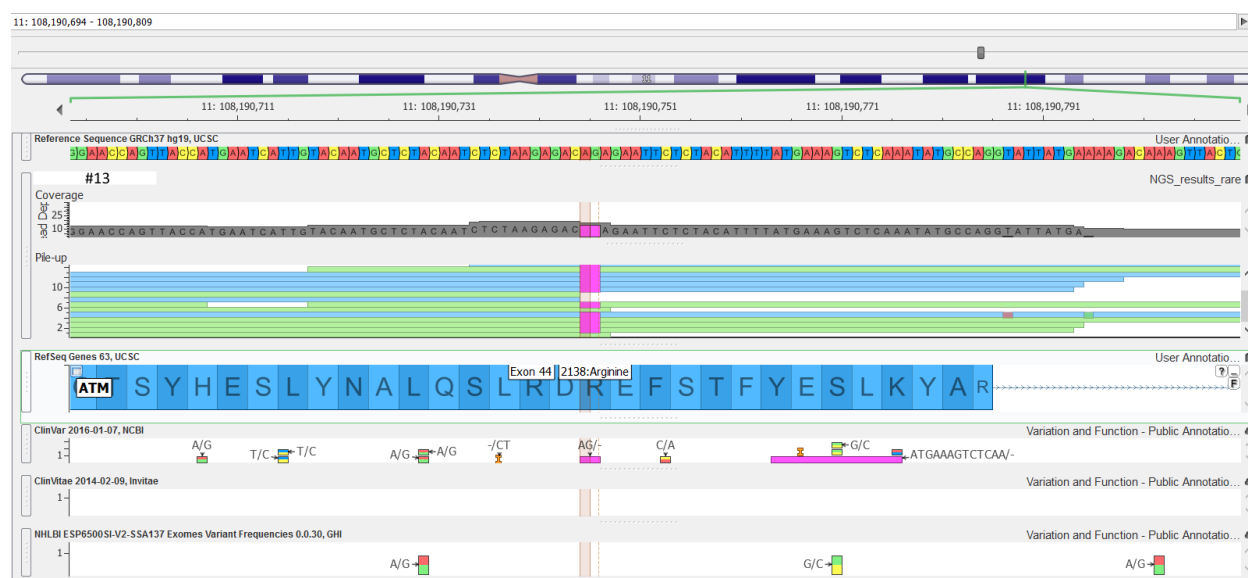
б) *MKS1*: p.Ser372del: вариантът е с екстремно ниска глобална популационна честота и е открит в хомозиготно състояние при пациент (№35) с тежък клиничен фенотип от спектъра на синдрома на Meckel, включващ вентрикуларен септален дефект на сърцето, аномалия на ЦНС, дисморфизъм и интелектуален дефицит.

При двамата изследвани пациенти с фенотип на мускулна дистрофия тип пояс-крайник са установени варианти в кодиращата последователност на дистрофиновия ген, подкрепящи клиничната диагноза: миссенс мутация в екзон 59 при пациент 4, свързана с мускулна дистрофия тип Бекер и нова патологична нонсенс мутация в екзон 45 при пациент 3. Вариантите са потвърдени чрез секвениране по Сангер в Националната генетична лаборатория (НГЛ).

- **Патологичен вариант *ATM*, p.Glu2139IlefsTer6**

Вариантът е установен при пациент 13 в хомозиготно състояние. Пациент №13 от група 1 е момче, починало на 10 годишна възраст, с типични клинични прояви на Атаксия-телангиектазия. Генетичният анализ е извършен с ДНК проба, изолирана от тъкан включена в парафин. При пациента е установен един патологичен вариант в гена *ATM* (NM_000051.3:c.6412_6413delAG, p.Glu2139IlefsTer6) в хомозиготно състояние. Вариантът представлява делеция на две нуклеотидни бази (А и G) в позиция 108190745-108190746 на 11-та хромозома (фигура 18). Делецията засяга нуклеотидната последователност на 44-ти екзон на гена. Вариантът води до замяна на аминокиселината глутамат (в позиция 2139 на протеина) с изолевцин, изместване на рамката на четене, образуване на преждевременен стоп-кодон в новата рамка на четене. Промяната засяга

функционално важен район на протеина – FAT домена. Вариантът е намиран при пациенти с класически фенотип на Атаксия-телангиекатазия (McConville et al., 1996). Естеството на варианта предполага, че е патогенен и в хомозиготно състояние би довел до заболяване. При ДНК анализа на пациент №13 прави впечатление общо по-малкия добив на данни и съответно по-малък брой прочити в таргетните райони (средно около 30, срещу средно 50-100 при останалите изследвани контроли и пациенти), както и по-малката средна дължина на секвенираните ДНК фрагменти – всичко това са особености, които вероятно се дължат на обработката на тъканта с формалин преди включването и в парафин.



Фигура 18 Мутация *ATM*, p.Glu2139IlefsTer6 при пациент 13.

При пациента са установени няколко полиморфни бенигнни варианта (rs664982 T/T, rs664143 G/G, rs72110550 -/-, rs659243 G/G) в участъка от 31-ви до 63-ти екзон на *ATM*, като всички те се откриват в хомозиготно състояние. Пациентът е хетерозиготен по полиморфния вариант rs672655 A/G, който е локализиран в 15-ти интрон. Тази находка би могла да означава, че пациентът не е същински хомозигот, а носи втори патогенен алел, който е делеция обхващаща значителна част от гена *ATM*. Патологичният вариант е потвърден чрез Сангер секвениране на екзон 44 и двамата родители са изследвани за носителство на мутацията. Вариантът *ATM*, p.Glu2139IlefsTer6 е установен само при единия родител. Не е провеждан MLPA или qPCR анализ за установяване на вътрегенни делеции / дупликации на *ATM*. Смята се, че големите пренареждания на *ATM* гена са рядко

срещани (Wright, J. Et al, 1996, Concannon, P. et al, 1997), но е възможно подобен тип патологични алели да са с по-висока честота у нас.

Девет от пациентите от група 1 са изследвани чрез NGS във връзка с проявен фенотип на метаболитно заболяване (пациенти 5, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 16 и 17). Патологични варианти, потвърждаващи клиничната диагноза са установени при 5 от изследваните. При четирима пациенти (един с 3-метил-глутаконова ацидурия (6), един с Митохондриална енцефалопатия, дефицит на комплекси I, III и IV (7) и при двама с Гликогеноза (14 и 15) не бяха установени патологични варианти, асоциирани с фенотипа в гените от панела TruSight Inherited.

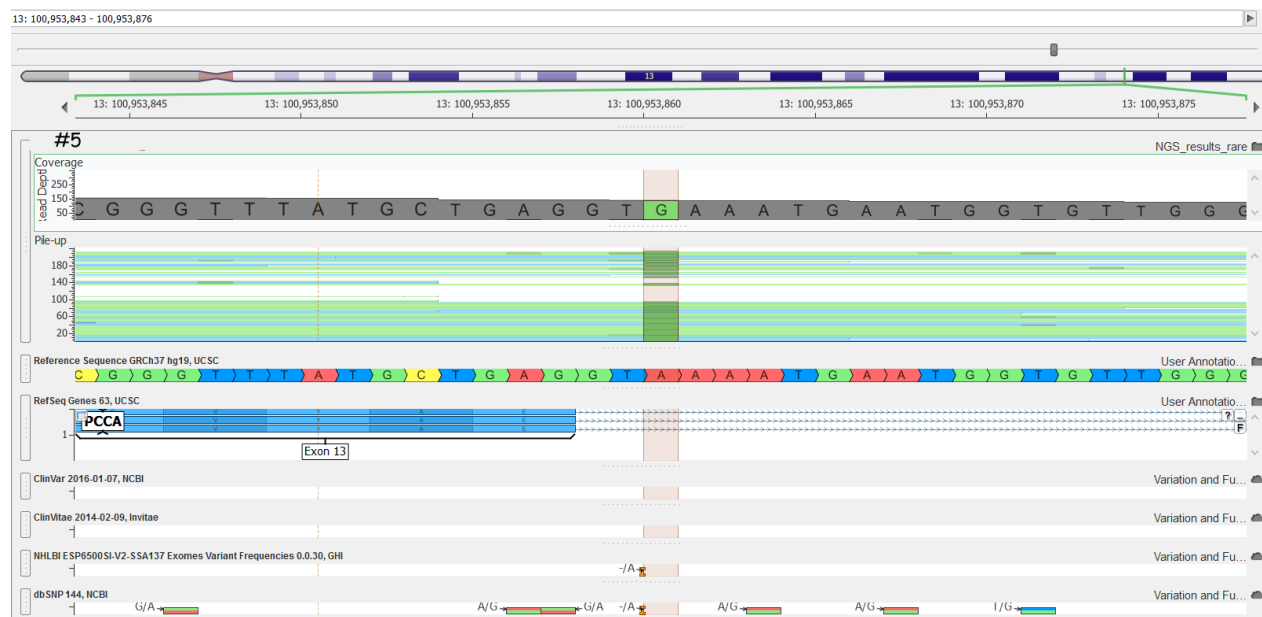
При пациентите с метаболитни заболявания се очаква прилагането на методи за молекулярна ДНК диагностика, дори ако се прилага традиционната стратегия на изследване „ген-по-ген“, да доведе до разкриване на подлежащия генетичен дефект. Това очакване се основава на факта, че за голяма част от метаболитните болести с разпознаваем фенотип, най-честите подлежащи генетични дефекти са вече известни.

- **Патологичен вариант *PCCA*: g.100953860A>G c.1209+3A>G**

Вариантът е установен в хомозиготно състояние при момиче на 2 години и 10 месеца (пациент 5). Клиничните симптоми включват мускулна хипотония, гърчове, атаксия, лицев дисморфизъм, остеопороза, регистрирана е метаболитна ацидоза и хиперамониемия. При проведен метаболитен скрининг са установени промени в профила на аминокиселини и ацилкарнитини в кръв и в профила на органични киселини в урина, съответстващи на пропионова ацидемия. Пропионовата ацидемия (OMIM # 606054) е една от най-честите органични ацидемии и се дължи на дефицит на ензима пропионил-СоА карбоксилаза (PCC, E.C.6.4.1.3). Заболяването се унаследява автозомно-рецесивно, като причина за фенотипа са мутации в един от двата гена, *PCCA* (OMIM 232000) или *PCCB* (OMIM 232050), кодиращи съответно α и β субединиците на ензима. Заболяването може да бъде фатално с презентация в неонаталния период, макар че при някои пациенти изявата е по-късна и протичането е по-леко (Fenton et al.2001). Пропионовата ацидемия е хетерогенна на генетично ниво, особено при пациенти от бялата раса. В гена *PCCA* не са

установени преобладаващи мутации, докато болестните алели в гена *PCCB* са относително малко на брой.

При пациентката е установена хомозиготна замяна на аденин с гуанин в позиция 100953860 на 13-та хромозома: *PCCA* (*Propionyl-CoA carboxylase, alpha subunit*): с.1209+3A>G. Установеният вариант е известен патологичен и се смята, че нарушава процеса на съзряване на мРНК на гена *PCCA*, като води до отпадане на екзон 13 и намален синтез на белтъчни молекули със съхранена ензимна активност (Lourdes R. et al., 2006). Мутацията *PCCA*: с.1209+3A> G е транзиция, засягаща консенсусната последователност на 5'-донорното сплайс място на екзон 13. При изследване на cDNA е наблюдавано „пропускане“ на екзон 13, което предполага синтез на скъсен протеин с вътрешна делеция на 48 аминокиселини. Тази мутация е била установена при двама пациенти от турски произход и при един пациент от Афганистан. При пациентката не са доказани други патологични мутации в гените *PCCA* и *PCCB*. Конкретната мутация е свързана с вариабилен клиничен фенотип и относително по-леко протичане на заболяването, тъй като при носителите на този вариант е установено образуване на малко количество нормални мРНК молекули дори и при хомозиготи (Desviat LR et al 2006).



Фигура 19 Мутация *PCCA*: с.1209+3A>G при пациент 5

На фигура 19 е представен участъкът от екзон 13 и 5' границата екзон-интрон на гена *PCCA* при пациент 5. Замененият нуклеотид е маркиран.

- **Патологичен вариант *BCKDHA*: g.41928659G>A, c.979G>A, p.Glu327Lys**

Вариантът е установен при пациент №8. При пациентката е установена хомозиготна замяна на нуклеотида гуанин с аденин в кодиращата последователност на гена *BCKDHA* в позиция 41928659 на 19-та хромозома. Генът *BCKDHA* кодира E1-алфа субединицата на дехидрогеназния комплекс, който катализира окислително декарбоксилиране на алфа-кето киселините с разклонена верига (получени от изолевцин, валин и левцин) (Wynn, 1998.). Комплексът се състои от 3 каталитични компонента: E1 - хетеротетрамерна декарбоксилаза от две алфа и две бета субединици ($\alpha_2\beta_2$), E2 – дихидролипоил-трансацилаза съставена от 24 еднакви субединици и E3 – дихидролипоамид-дехидрогеназа, която е хомодимер. E1 е тиамин пирофосфат-зависим ензим. Комплексът включва също и два регулаторни ензима: киназа и фосфоорилаза. Патологичните варианти във всеки от гените *BCKDHA*, *BCKDHB* и *DBT*, кодиращи съответно E1 α , E1 β и E2 каталитичните компоненти на дехидрогеназния комплекс на алфа-кетокиселините с разклонена верига са причина за заболяването левциноза (MSUD, Урина с мирис на кленов сироп). В зависимост от това, в кой от гените се откриват мутации, генетичните подтипове на заболяването са: тип Ia (MIM# 608348) – при мутации в *BCKDHA*; тип Ib (MIM# 248611) - при мутации в *BCKDHB*, тип II (MIM# 248610) – при мутации в *DBT* и тип III (MIM# 238331) – при мутации в *DLD* (кодиращ E3 субединицата) (Chuang, 2001). Мутацията открита при пациент №8 е позната и е наблюдавана при един съставен хетерозигот с вариантна форма на заболяването и остатъчната ензимна активност около 2,5% от нормалната (Rodríguez-Pombo P, 2006). Нуклеотидната замяна води до промяна в консервативен район на белтъчния продукт на гена *BCKDHA*: на 327-ма позиция в аминокиселинната верига глутамин се заменя с лизин. Смята се, че вариантът нарушава α - α' взаимодействието в ензимния комплекс. На фигура 20 е представен участъкът от екзон 7 на гена *BCKDHA* при пациентката. При пациент 8 симптомите на заболяването са регистрирани още през първата седмица след раждането и са включвали мускулна хипотония, летаргия, хипогликемия и странна миризма на урината. При проведения селективен метаболитен скрининг е установен профил характерен за заболяването Левциноза и е започнато лечение. Независимо, че в резултат на лечението е постигнато подобрене на метаболитните отклонения (нормализиране на стойностите на валин и намаляване на стойностите на левцин и изолевцин в кръвта), детето е починало. Ранната

презентация на симптомите, както и ранната смърт на пациентката показват, че установеният патологичен вариант p.Glu327Lys, вероятно е асоцииран с най-тежката неонатална форма на заболяването. По-лекият фенотип, регистриран при пациентката на Rodríguez-Pombo P (2006), вероятно се дължи на това, че тя е била съставен хетерозигот и вторият патологичен алел вероятно не нарушава в такава степен ензимната функция на E1.



Фигура 20 Вариант *BCKDHA*, p.Glu327Lys при пациент 8. Замененият нуклеотид е маркиран в червено.

- **Патологичен вариант *HSD17B4*: g.118788316G>A, NM_001199291.1: c.-133G>A, NM_000414.3: c.46G>A, NP_000405.1: p.Gly16Ser, rs137853096**

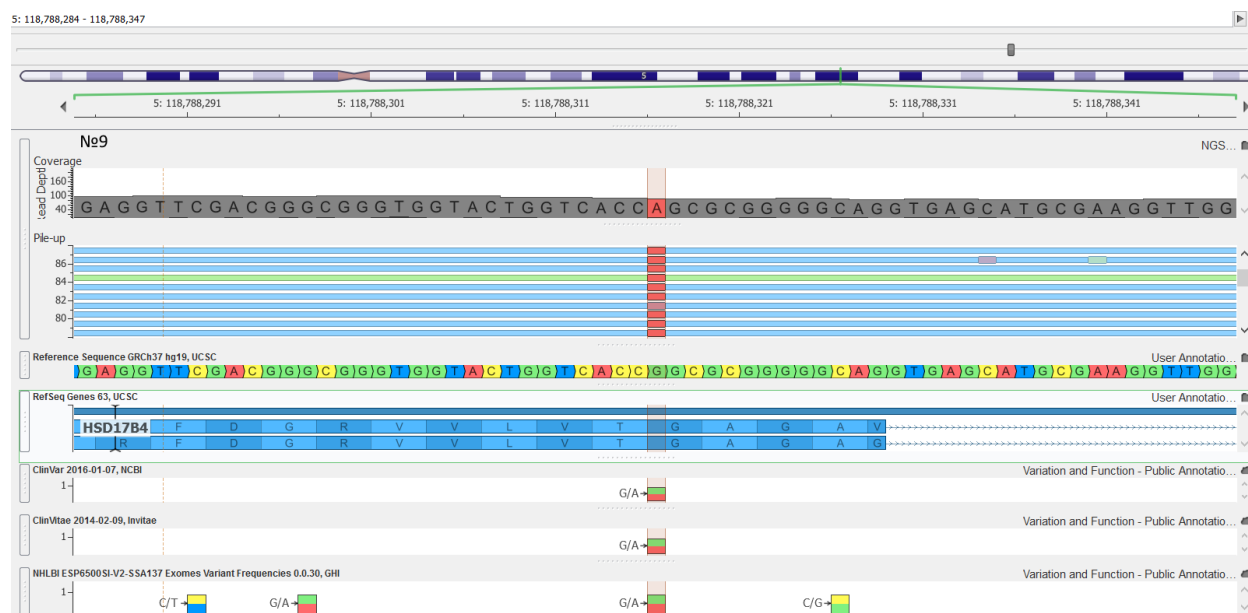
Вариантът е открит при пациент 9. Пациент 9 е момче от турски етнически произход, родено от трета бременност, протекла с хиперемезис. Детето е родено на термин с нормални ръст и тегло (2890 г / 50 см), без данни за перинатална асфиксия. От раждането са налице подчертана мускулна хипотония, липса на неонатални рефлексии, клонични гърчове и орални автоматизми. При ТФЕ и КТ на ЦНС е регистриран мозъчен оток и идириктни данни за агенезия на Corpus callosum. Установен е дисморфизъм: долихоцефална конфигурация на главата, голяма фонтанела 3x3 см, отворена малка фонтанела, дълъг тесен гръден кош. При селективен метаболитен скрининг са установени екстремно повишени стойности на мастните киселини с много дълга верига в кръв (C26:0 – 19,85 $\mu\text{mol/l}$; C26:0/C22:0 – 4,55; C24:0/C22:0 – 1,76). Симптомите и находките от

метаболитния скрининг съответстват на пероксизомно заболяване от спектъра на Zellweger. Детето е починало на възраст 11 месеца.

Нарушенията от спектъра на Zellweger са група редки генетични мултисистемни болести, които се дължат на дефекти в биогенезата на пероксизомите или по-рядко на дефицит на единични пероксизомни ензими. Фенотипната изява е вариабилна: синдром на Zellweger е най-тежката форма на заболяването, неонаталната адренолевкодистрофия е междинна форма, и инфантилната болест на Refsum е най-леката форма. Симптомите включват неврологични дефицити, мускулна хипотония, загуба на слуха, нарушения в зрението, чернодробна и бъбречна дисфункция. Заболяването обикновено води до тежки животозастрашаващи усложнения още по време на най-ранното детство, макар че някои пациенти с по-лека форма могат да доживеят до зряла възраст. При пациент 9 не са установени патологични варианти в гените, асоциирани с дефекти в биогенезата на пероксизомите, но се установи мутация в ген кодиращ пероксизомен ензим - *HSD17B4*.

Патологичният вариант представлява хомозиготна нуклеотидна замяна на гуанин с аденин в позиция 118788316 на 5-та хромозома. Промяната засяга кодиращата последователност на гена *HSD17B4* и води до замяна на гуанин с аденин в кодон 16 (на ниво мРНК) и до продукция на протеин с аминокиселинна замяна (глицинът на 16-та позиция е заменен със серин). Вариантът е известен и е наблюдаван при пациенти с дефицит на D-бифункционалния протеин в пероксизомите (<http://www.omim.org/entry/261515>). Генът *HSD17B4* кодира ензим участващ в бета-окислението на мастните киселини в пероксизомите. Мултифункционалният протеин 2, познат още като D-бифункционален протеин, катализира втората (хидратация) и третата (дехидрогениране) реакции на пероксизомното бета-окисление на мастните киселини. Двете ензимни активности на протеина, еноил-CoA-хидратаза и D-3-хидроксиацил-CoA дехидрогеназа, са есенциални за окислението на широк кръг от пероксизомни субстрати (висши мастни киселини (с много дълга верига), мастни киселини с разклонена верига, прекурсори на жлъчните киселини)(van Grunsven EG et al, 1998; van Grunsven EG et al, 1999). Конкретният вариант, засяга структурата на NAD(+) свързващ домен и води до пълна загуба на D-3-хидроксиацил-CoA дехидрогеназната активност на ензима. D-бифункционалният протеин катализира формирането на 3-кетоацил-CoA междинни метаболити от мастните киселини с права и 2-метил-разклонена верига и скъсяването на холестерола при образуване на

жлъчни киселини. Клиничните прояви на дефицита на D-бифункционалния протеин са подобни на тези при болестите с нарушена биогенеза на пероксизомите (включително X-свързана адренолевкодистрофия, синдром на Zellweger и неонатална адренолевкодистрофия). Заболяването е тежко и се характеризира с мускулна хипотония с ранно начало, гърчове, лицев дисморфизъм, загуба на слуха, нарушено зрение, изоставане в невропсихичното развитие (тежка степен), полимикрогирия, хипо-/аплазия на Corpus callosum, дисмиелинизация, забавено провеждане на импулсите в периферните нерви, повечето пациенти загиват преди 2-годишна възраст. На фигура 21 е представен участъкът от екзон 1 на гена *HSD17B4* при пациент 9. Вариантът е потвърден със секвениране по Сангер и е установен в хетерозиготно състояние при всеки от родителите.



Фигура 21 Мутация *HSD17B4* p.Gly16Ser при пациент 9.

- **Патологични варианти в гена *PHKG2* p.Asp153Val и p.Leu160del**

Вариантите са установени при пациент 16. Пациент 16 е момиче на 1 г. с клинична диагноза чернодробна гликогеноза. Детето е от български етнически произход, родено от втора нормално протекла бременност, с нормални тегло и ръст при раждането и с нормално ранно развитие. При преглед по повод фебрилитет (без други оплаквания) е установена хепатомегалия. Детето е хоспитализирано като е потвърдено наличието на хепато-спленомегалия. Обективно са установени: макулозен обрив по тялото, увеличена

подкожна мастна тъкан, четирипръстна бразда на едната длан, ставна свръхподвижност, кукленски фациес. От проведените лабораторни изследвания са установени данни за тромбоцитопения, левкоцитопения с неутропения и лимфоцитоза, цитолиза и холестаза (ALAT – 316-496 IU/l; ASAT – 617-722 IU/l; GGTP – 250 IU/l; LDH – 680-1047 IU/l), повишени триглицериди и алфафетопротейн в кръв, нормални стойности в кръвта на глюкоза, билирубин, холестерол, креатинин, общ белтък и албумин, електролити, амилаза, пикочна киселина, алфа1-антитрипсин. При образни изследвания (УЗИ и КТ) е регистрирана хепатомегалия, увеличена плътност на чернодробния паренхим, с данни за дифузен процес, без данни портална хипертония, спленомегалия – с повишена плътност на паренхима, останалите коремни органи (панкреас, бъбреци, надбъбреци) са с нормална топка и размери. Проведена е чернодробна биопсия и хистологичният резултат е потвърдил съмнението за гликогеноза.

При проведения ДНК анализ чрез секвениране с панела TruSight One бяха установени два вероятно патологични варианта в гена *PHKG2*: p.Asp153Val и p.Leu160del, в хетерозиготно състояние (съставен хетерозигот).

Генът *PHKG2* кодира чернодробната и тестикуларната изоформа на гама-субединицата на ензима фосфорилазокиназа. Патологичните варианти в гена се проявяват фенотипно при хомозиготи и при съставни хетерозиготи като автозомно рецесивна форма на гликогеноза тип IXc (Glycogen storage disease IXc, <http://omim.org/entry/613027>). Клинично заболяването се характеризира с натрупване на гликоген в черния дроб, забавен растеж по време на детството, но достигане на нормален ръст при възрастни, хипогликемия и кетоза при гладуване, хепатомегалия, спленомегалия, чернодробна фиброза, която може да прогресира до цироза, повишени чернодробни трансаминази, повишени серумни триглицериди (Bali, D. S. et al. 2014.; Albash B et al, 2014). Активността на ензима в мускулите е умерено понижена до нормална. Може да има забавено моторно развитие, но като цяло няма засягане на мускулите и сърцето. Симптомите се проявяват в ранното детство, като има тенденция за нормализиране на биохимичните отклонения с възрастта. При пациентката двата варианта засягат последователността на 6-ти екзон на гена. Единият вариант е трансверзия на А с Т и води до аминокиселинна замяна в белтъчния продукт - p.Asp153Val. Вариантът е известен и е с екстремно ниска популационна честота (по данни на ExAC MAF=0.000008236(T)). Функционалните предиктори го оценяват като

потенциално патогенен (MetaSVM Pred: Damaging, със скор 1), което не е изненадващо като се има предвид, че това е активния център на ензима. Вторият вариант не е съобщаван досега. Втората мутация е делеция на три двойки бази, запазваща рамката на четене, но водеща до загуба на левцин на 160-та позиция в протеина. От резултата на пациентката се установи, че тя е съставен хетерозигот. При установяване на варианти с близка геномна локализация, както е в случая, е възможно да се определи фазата на скаченост, дори и без да бъдат изследвани родителите, което е едно от предимствата на масивното паралелно секвениране в сравнение със секвенирането по Sanger. На фигура 22 е представен участъкът от на екзон 6 на *PHKG2* при пациентката.



Фигура 22 Съставно хетерозиготно носителство на *PHKG2* p.Asp153Val и p.Leu160del при пациент 16.

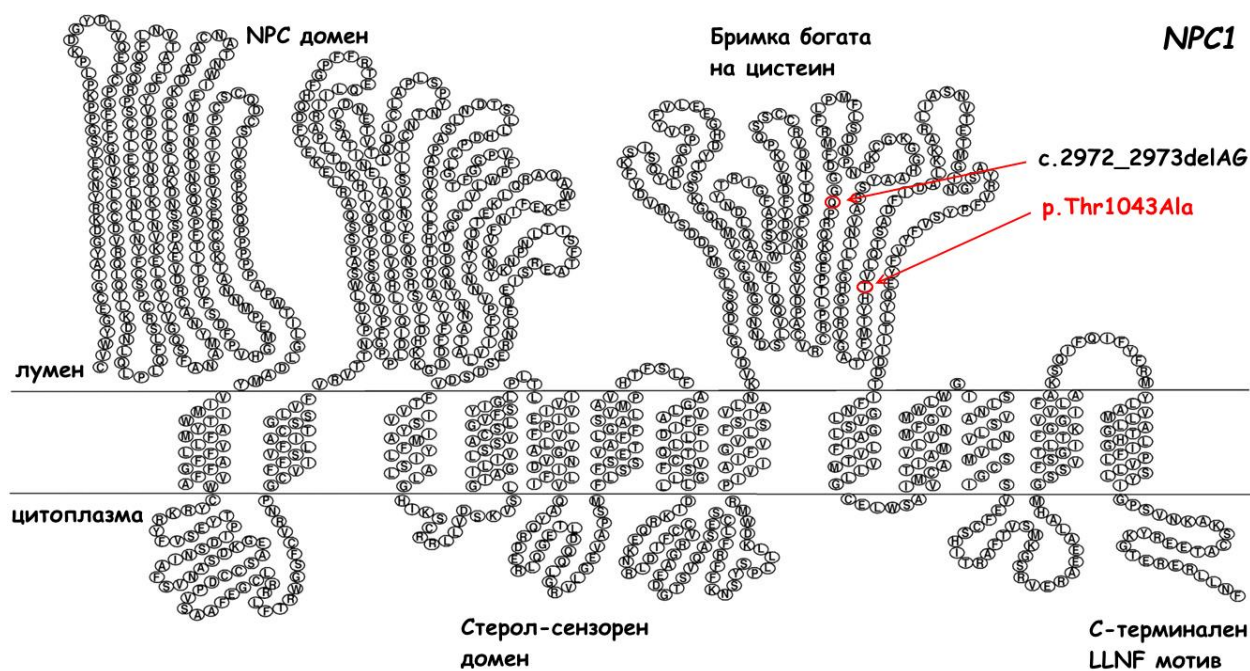
- **Патологични варианти в гена *NPC1*: p.Thr1043Ala и c.2972_2973delAG (p.Gln991Argfs)**

Патологичните варианти са установени при пациент 17. Пациент 17 е момиче починало от усложненията на болестта Niemann-Pick тип C. Болестта на Niemann-Pick е мултисистемно заболяване от групата на лизозомните болести на натрупването, при което се наблюдава широка гама от симптоми с варираща тежест. Болестта на Niemann-Pick се подразделя на четири основни типа, в зависимост от подлежащия генетичен дефект: тип А, тип В, тип С1 и тип С2. Въз основа на тежестта на симптомите и възрастта на появата им, отделните

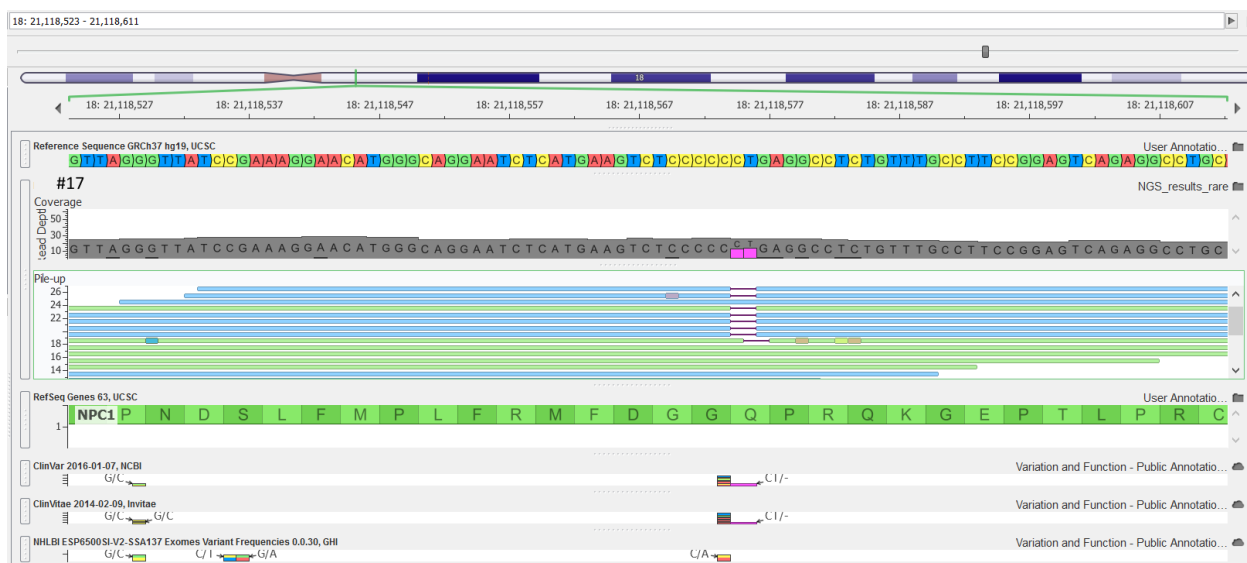
типове се подразделят на тежки инфантилни, по-леки ювенилни и адултни форми. Тип С е биохимично, генетично и клинично различен от типовете А и В, които се дължат на пълнен или частичен дефицит на ензима кисела сфингомиелиназа. Симптомите при тип С1 и С2 са много сходни и двата типа са неразличими на клинично ниво. При тип С първите симптоми най-често се проявяват по време на детството (2-4 год), но презентацията може да бъде на всяка възраст (Shulman LM et al, 1995; Spiegel R et al, 2009). Отличителен белег е прогресивната неврологична симптоматика, която води до тежка инвалидизация и преждевременна смърт. Неврологичните симптоми включват малкомозъчна атаксия, дизартрия, дисфагия, тремор, епилепсия (парциална и генерализирана), вертикална супрануклеарна парализа, инверсия на съня, атонични пристъпи, дистония, спастичност, хипотония, птоза, микроцефалия, прогресивна деменция, психоза. В крайните стадии на заболяването болните са приковани на легло, с пълна офталмоплегия, загуба на способността да извършват волеви движения и тежка деменция. При болните често се открива хепатоспленомегалия, но този симптом може да отсъства при формите с късно начало. Тип С е генетично хетерогенен. Vanier и Millat (2003) посочват, че приблизително 95% от пациентите с болест на Niemann-Pick тип С имат мутации в гена *NPC1*, който кодира голям мембранен гликопротеин локализиран предимно в ендозомите, докато останалите имат мутации в гена *NPC2*, който кодира малък лизозомен холестерол-свързващ протеин. Идентичните биохимични промени, наблюдавани в *NPC1* и *NPC2* мутанти (натрупване на неестерифициран холестерол) предполагат, че двата протеина функционират координирано и участват във вътреклетъчния транспорт на холестерол, гликолипиди и други субстанции (Vanier и Millat, 2003).

При пациентката са установени два хетерозиготни варианта в гена *NPC1*: единият е известен патологичен (p.Gln991ArgfsTer15), а вторият е нов вероятно патологичен (p.Thr1043Ala). Вариантът g.21118574_21118575delCT (p.Gln991ArgfsTer15) представлява хетерозиготна делеция на две нуклеотидни двойки в кодиращата последователност на 20-ти екзон на гена, което на ниво информационна РНК води до изместване на рамката на четене, замяна на глутамин на 991-ва позиция с аргинин и образуване на по-ранен стоп-кодон в новата рамка на четене. Вариантът е съобщаван при пациенти от еврейски (Ashkenazi) произход с тежка форма на заболяването и начална изява по време на феталното развитие (Spiegel R et al, 2009). Вторият вариант, g.21116755T>C

(p.Thr1043Ala), представлява хетерозиготна нуклеотидна замяна на тимин с цитозин в позиция 21116755 на 18-та хромозома. Замяната засяга кодиращата последователност на 21-ви екзон на гена *NPC1* и води до замяна на треонин с аланин на 1043-та позиция в протеина (фигура 23). Вариантът не е съобщаван досега в медицинските бази данни за патологични варианти, не е наблюдаван при никой от индивидите изследвани по проектите NHLBI Exome Sequencing Project и 1000genomes, засяга функционално важен район на протеина и според предикцията на ефекта може да наруши функцията на NPC1 протеина. Това дава основания вариантът да бъде класифициран като вероятно патологичен. На фигури 24 и 25 са представени екзони 20 и 21 на *NPC1* гена при пациентката.



Фигура 23 Локализация на аминокиселините, засегнати от мутации при пациент 17. Ползван е топологичния модел на NPC1 на JP Davies и YA Ioannou (2000).



Фигура 24 Мутация *NPC1* с.2972_2973delAG, p.Gln991Argfs при пациент 17.



Фигура 25 Мутация *NPC1* p.Thr1043Ala при пациент 17

- **Патологичен вариант *ACTA2* p.Arg258Cys**

Вариантът е открит при пациент 10 в хетерозиготно състояние. Пациент 10 е момче на 15 години, родено от втора нормално протекла бременност и раждане, с нормални тегло и ръст при раждането (3600 г / 53 см). Опериран е на 6-месечна възраст по повод персистиращ артериален канал. Редовно проследяван до 7-годишна възраст в детска

кардиологична клиника на НКБ – без отклонения в кардиологичия статус. Пациент 10 е с диагноза Дисекация на аортата трети тип. Няма данни за фамилна обремененост със сърдечно-съдови заболявания. До момента на заболяването младежът не е имал оплаквания, има нормално физическо и невропсихическо развитие, спортува активно (вдигане на тежести). Заболял е остро – с внезапна болка в гърба, съпроводена с изтръпване на левия крак. Приет е по спешност в болница, където въз основа на проведена КТ и ехокардиография е поставена диагноза дисекация на торакалната аорта и съмнение за тромбоза на илиачните артерии, впоследствие състоянието е усложнено със спинален инфаркт.

Таблица 23. Основни типове дисекацията на аортата – класификация

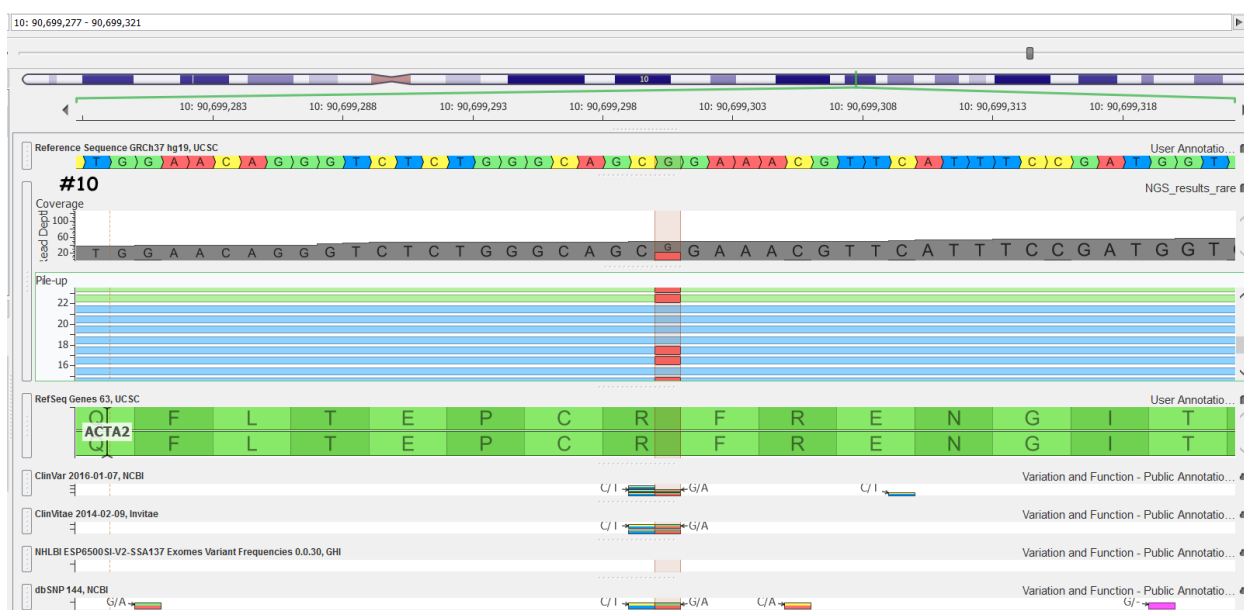
Тип	DeBakey I	DeBakey II	DeBakey III
	Stanford A (проксимална)		Stanford B (дистална)
			
Относителен дял (%)	60%	10-15%	25-30%

Смята се, че годишно аортната дисекация засяга 2-3,5 души на всеки 100000 население. Мъжете са по-често засегнати от жените: 65% от пациентите с аортна дисекация са мъже. Средната възраст на изява е 63 години (Hiratzka LF, Bakris GL, Beckman JA; et al. (April 2010). В зависимост от локализацията дисекациите на аортата се подразделят на проксимални и дистални (таблица 23). Аневризмите и дисекацията на аортата обикновено

са в резултат на дегенеративни промени в аортната стена. Аневризмата и дисекцията на торакалния отдел на аортата се свързват предимно с характерен хистологичен вид – с некроза на медията или "кистозна некроза на медията тип Erdheim", при което се наблюдава дегенерация и фрагментиране на еластични влакна, загуба на гладкомускулни клетки и натрупване на базофилна субстанция, докато дегенерацията водеща до аневризма на коремната аорта, обикновено се причинява от комбинация от фактори, включващи възраст, атеросклероза, хипертония, и инфекциозни, възпалителни или автоимунни процеси. Известно е, че некротата на медията и съответно аневризмата / дисекцията на торакалната аорта се наблюдават при някои болести с малостойност на съединителната тъкан, като например синдром на Марфан и съдовия тип (тип IV) на синдром на Ehlers-Danlos. По-често, обаче, некротата на медията се среща при индивиди, които нямат други белези на ясно определен синдром. Несиндромната дисекция на аортата е генетично хетерогенна и понастоящем са известни поне 7 локуса, асоциирани със заболяването: 11q23.3-q24 (AAT1), 5q13-q14 (AAT2), *MYH11* (AAT4, 16p13.11), *ACTA2* (AAT6, 10q23.31), *MYLK* (AAT7, 3q21.1), *PRKG1* (AAT8, 10q11.2-q21.1) и *MFAP5* (AAT9, 12p13.31).

При пациент №10 мутацията *ACTA2* p.Arg258Cys се установява в хетерозиготно състояние. Алфа-актинът на гладките мускули в аортата (кодиран от *ACTA2*) е една от шестте различни изоформи на актин, идентифицирани в гръбначните. Изоформите на актина имат сходни аминокиселинни последователности и са консервирани в еволюцията. Другите актинови изоформи са: актинът на скелетната мускулатура (*ACTA1*), на сърдечния мускул (*ACTC1*), на гладката мускулатура в червата (*ACTG2*), и цитоплазмените бета (*ACTB*) и гама (*ACTG1*) (Vandekerckhove и Weber, 1979). Главната функция на гладкомускулните клетки в съдовете е съкращението, което регулира кръвното налягане и дебит. Контрактилната сила зависи от цикличното взаимодействие между алфа-актина на гладко-мускулните съдови клетки, кодиран от *ACTA2* и тежката верига на бета-миозин, кодирана от гена *MYH11*. Guo et al. (2007) показват, че несинонимните мутации в *ACTA2* са причина за 14% от наследствените форми на аневризми и дисекция на възходящата гръдна аорта (AAT6). Конкретният вариант е познат и е наблюдаван при пациенти с фамилна форма на аневризма на торакалната аорта (AAT6). В едно семейство от европейски произход с фамилна форма на торакална

аневризма с дисекция на аортата Guo et al. (2007) идентифицирали транзиция 820G-A в екзон 7 на гена *ACTA2*, която води до замяна на Arg258 с хистидин (R258H). Подобно на пациент 10 един от болните в семейството е имал персистиращ артериален канал. При някои, пациенти носители на този вариант, се проявява фенотип на болестта тоуатоуа тип 5; (MYMY5), която се изразява в мозъчно-съдова болест дължаща се на стеноза на терминалните участъци на вътрешните каротидни артерии (Guo, D.-C et al, 2009). На фигура 26 е представен екзон 7 на *ACTA2* гена при пациент 10. Вариантът е потвърден със секвениране по Сангер и не е установен при никой от родителите на пациент 10, което съответства на липсата на данни за фамилност.



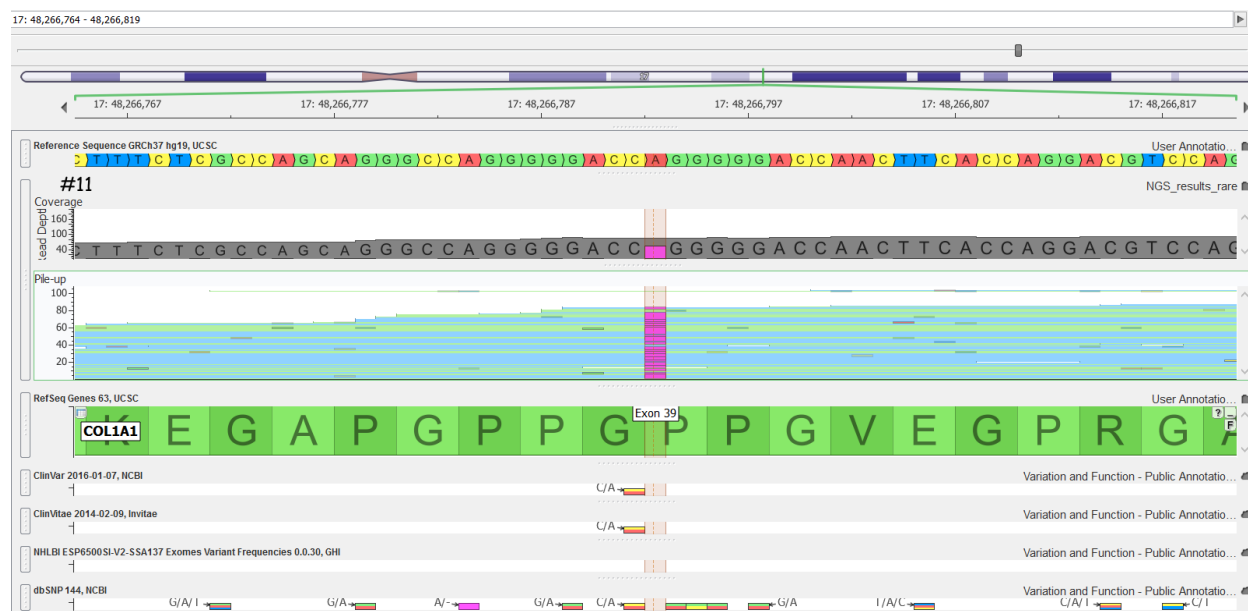
Фигура 26 Мутация *ACTA2* p.Arg258Cys при пациент 10.

- **Патологичен вариант *COL1A1* c.2775delT (p.Gly926ValfsTer182)**

Вариантът е установен при пациент №11. Пациент 11 е момиче на 2 г. с клинична диагноза Osteogenesis imperfecta – в течение на 18 месеца са регистрирани 4 фрактури с различна локализация (ключица, предмишница, бедрена кост и тибия), провокирани от минимална травма с последващо правилно зарастване. При детето не са установени други отклонения от физикалния статус и няма данни за фамилност. Заболяването е клинично и генетично хетерогенно - има най-малко осем клинични форми на остеогенезис имперфекта (класирани от тип I до тип VIII) и са известни поне 14 гена, чиито мутации асоциират с

подобен фенотип (*P3H1*, *CRTAP*, *SPARC*, *COL1A2*, *BMP1*, *TMEM38B*, *IFITM5*, *SERPINH1*, *WNT1*, *SP7*, *PPIB*, *SERPINF1*, *FKBP10*, *COL1A1*). Остеогенезис имперфекта е група с генетични заболявания, които засягат предимно костите. Терминът "osteogenesis imperfecta" означава несъвършено образуване на кости. Основна характеристика на заболяването е намалената здравина на костите и наличието на фрактури, често провокирани от незначителна травма или дори без очевидна причина. При тежките форми фрактурите могат да настъпят още по време на вътреутробното развитие. Тип I е най-леката форма на заболяването, а тип II е най-тежката летална форма. Симптомите при другите типове на това заболяване попадат някъде между тези две крайности. Все по-често генетичните изследвания се използват за определяне на различните форми на остеогенезис имперфекта.

При пациент 11 е установена трункираща несъобщавана досега мутация в гена *COL1A1* в хетерозиготно състояние. Генът *COL1A1* кодира $\alpha 1$ -проколагеновите фибрили на колаген тип I. Колаген тип I е основният колаген в костите, кожата и сухожилията. Изграден е от три спирално завити полипептидни вериги (две $\alpha 1$ и една $\alpha 2$). Патологичните мутации в гена *COL1A1* са причина за три различни автозомно доминантни заболявания: Caffey disease (OMIM: 114000), Ehlers-Danlos syndrome (classic OMIM 130000; и тип VIIA, OMIM 130060), Osteogenesis imperfecta (type I, OMIM 166200; type II, OMIM 166210; type III, OMIM 259420; type IV, OMIM 166220), като това, какъв ще бъде фенотипът, се определя главно от вида на мутантния алел. Мутациите, които по предикция водят до образуване на преждевременен стоп-кодон, изместване на рамката на четене или разрушават консервативните места за сплайсинг, са най-често срещаните видове дефекти при пациентите с фенотип на Osteogenesis imperfecta тип I (Willing M et al, 1993,1996). Вариантът установен при пациентката представлява делеция на аденин на позиция 48266792 в 17-та хромозома (фигура 27), водеща до изместване на рамката на четене и образуване на преждевременен стоп в новата рамка на четене (g.48266792delA, c.2775delT, p.Gly926ValfsTer182). Вариантът при пациентката съответства на клиничния фенотип Osteogenesis imperfecta тип I. Вариантът е потвърден чрез секвениране по Сангер.



Фигура 27 Мутация *COL1A1*: g.48266792delA, NM_000088.3: c.2775delT, NP_000079.2: p.Gly926ValfsTer182 при пациент 11.

- **Патологични варианти в гена *COL7A1* p.Arg843Ter и p.Lys142Arg**

Вариантите в гена *COL7A1* са установени при пациент 12. Пациент 12 е момиче на 1 година с клинична диагноза Булозна епидермолиза. Проявите на заболяването са типични и включват образуване на булозни лезии по кожата при минимална травма (като триенето при допира на дрехи до тялото). Протичането на заболяването при пациентката съответства на дистрофична форма на булозна епидермолиза. При проведен имунохистохимичен анализ на кожна биопсия е установено силно намалено количество на колаген тип VII.

Колаген тип VII е хомотример, който е важен структурен елемент на дермоепидермалната гранична зона в кожата и осигурява свързването между дермата и епидермиса. Подобно на другите типове фибриларни колагени, има тройноспирална структура, като спиралния домен е приблизително 1,5 пъти по-дълъг от този на колаген тип I. Патологичните варианти на гена *COL7A1*, кодиращ $\alpha 1$ -проколагеновите фибрили на колаген тип VII, се проявяват фенотипно като различни по тежест автозомно-доминантни и автозомно-рецесивни форми на булозна епидермолиза (EBD inversa, #226600; EBD, Bart type, #132000; Epidermolysis bullosa dystrophica, AD, #131750; Epidermolysis bullosa dystrophica,

AR, #226600; Epidermolysis bullosa pruriginosa #604129, Epidermolysis bullosa, pretibial, #131850).

При пациентката е установено съставно хетерозиготно носителство на два известни патологични варианта в гена *COL7A1*: p.Arg843Ter и p.Lys142Arg. Вариантът p.Lys142Arg в 3-ти екзон е един от най-често наблюдаваните и се среща при около 12% от пациентите с мутации в гена *COL7A1*. Вариантът води до аминокиселинна замяна, но се смята, че нарушава и съзряването на иРНК. Вторият вариант в екзон 19, p.Arg843Ter, представлява замяна на кодон за аминокиселина със стоп-кодон и вероятно води до NMD или до синтез на протеин със скъсена полипептидна верига. Съставно хетерозиготно носителство на същите два патологични варианта е наблюдавано при пациент с тежка форма на автозомно рецесивна дистрофична булозна епидермолиза (Kahofer P et al, 2003; Kern JS et al, 2006), което съответства на фенотипа на пациент 12. На фигури 28 и 29 са представени мутациите в 3-ти и 19-ти екзон на *COL7A1* при пациент 12. Вариантите са потвърдени със секвениране по Сангер и е установено хетерозиготно носителство при родителите на пациентката.



Фигура 28 Мутация *COL7A1*, p.Lys142Arg при пациент 12



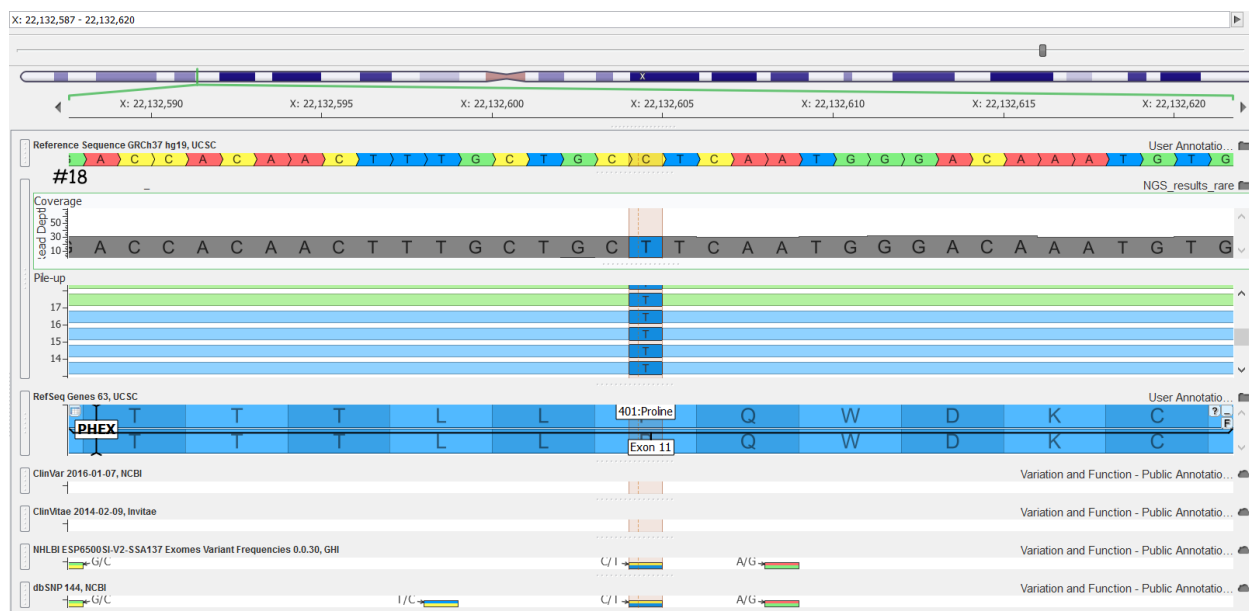
Фигура 29 Мутация *COL7A1*, p.Arg843Ter при пациент 12

4.4.2. Обсъждане на установените патологични ДНК варианти при пациенти от 2-ра група

- **Вероятно патологичен вариант *PHEX* p.Pro401Leu (rs145778165)**

Вариантът е установен в хемизиготно състояние при пациент 18. Пациент № 18 е мъж на 32 години с поставена в юношеска възраст клинична диагноза Osteogenesis imperfecta. До 16 годишна възраст пациентът е имал 11 фрактури – 8 на долни крайници и 3 на горни, установена е намалена костна плътност, повишена серумна алкална фосфатаза, при еднократно изследване е регистрирано повишено ниво на паратироидния хормон в серум. След пубертета не е имал фрактури. Окончателният ръст е 158 см, има асиметрия на долните крайници, като десният крак е по-къс с 8 см, бедрата и подбедриците са скъсени, походката е с накуцване. По данни на пациента в семейството му няма други болни, няма братя и сестри, родителите не са имали фрактури, майка му е с нисък ръст. Повод за изследването беше начална бременност при съпругата му и опасенията на двамата партньори за унаследяване на заболяването в децата им. Проведеният ДНК секвенционен анализ с панела TruSight One не установи наличие на патологични мутации, асоциирани с Osteogenesis imperfecta в гените *LEPRE1* (OI, type VIII, # 610339), *CRTAP* (OI type VII, # 605497), *COL1A2* (OI, type II, type III, type IV, # 120160), *BMP1* (OI, type XIII, # 112264), *IFITM5* (OI, type V, # 614757), *SERPINH1* (OI, type X, # 600943), *SP7* (OI, type XII, #

606633), *PPIB* (OI, type IX, # 123841), *SERPINF1* (OI, type VI, # 172860), *FKBP10* (OI, type XI, # 607063) и *COL1A1* (OI, type I, type II, type III, type IV, # 120150), но показва хемизиготна мутация в гена *PHEX*: g.22132604C>T, NM_000444.4:c.1202C>T, p.Pro401Leu. Генът *PHEX* е локализиран в X-хромозомата и кодира фосфат регулираща неутрална ендопептидаза (<http://omim.org/entry/300550>; <http://omim.org/entry/307800>). Патологичните мутации в гена се проявяват като X-свързан доминантен хипофосфатемичен рахит. Заболяването се характеризира с повишено излъчване на фосфат в урината, намалена минерализация на костите (остеомалация, рахит), болки в ставите и костите, деформации на костите (по-изразени на долните крайници), хипофосфатемия, повишена серумна алкална фосфатаза, нормални или леко повишени стойности на паратхормон в серума, нормален серумен калций, нормални или долно гранични нива на 1,25-дихидроксивитамин D3 в серума. Болестта засяга както мъже, така и жени, но симптомите са по-изразени при мъжете. Конкретният вариант е известен, много рядък и не е съобщаван досега като патологичен. Аминокиселинната замяна е в екстрацелуларния домен на протеина. Според софтуер за предикция на ефекта може да се очаква аминокиселинната замяна да нарушава функцията на белтъка. На фигура 30 е представен участъкът от екзон 11 на гена *PHEX* при пациента. Вариантът е наблюдаван при трима индивиди изследвани по NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) – две жени (хетерозиготни носители) и един мъж (хемизигот), за които няма данни за фенотипа и не е откриван в хомозиготно състояние. По данни на The Exome Aggregation Consortium (ExAC) честотата на минорния алел е 0.00004559 и сред изследваните индивиди не са установени хемизиготи. Изследване на излъчването на фосфати в урината при пациент №18 показва стойности двукратно надвишаващи нормалните (81 mmol, при горна граница на нормата до 42 mmol за 24 часа), което е типична находка при пациентите с хипофосфатемичен витамин D резистентен рахит и е в подкрепа на патогенността на установения при секвенирането вариант в гена *PHEX*. Вариантът е потвърден чрез секвениране по Сангер.



Фигура 30 Вариант *PHEX*: p.Pro401Leu, rs145778165 при пациент 18

- **Патологични варианти *FANCA* p.Ser1088Phe и p.Ser858Arg**

Вариантите са установени при пациент №20 в хетерозиготно състояние. Семейството беше насочено за консултация и генетично изследване по повод предполагаема диагноза Туберозна склероза при 3-годишната им дъщеря (пациент 20).

Детето е родено от 1-ва нормално протекла бременност. Родителите са млади, здрави, не съобщават за фамилна обремененост с генетични заболявания или вродени аномалии. Детето е родено на термин по нормален механизъм и е с правилно ранно физическо и интелектуално развитие. На възраст 3 години момичето получава фебрилен гърч и е хоспитализирано в детска неврологична клиника.

При физикалния преглед е установено наличие на множество (>30) хиперпигментни окръглени петна с диаметър около 1 см пръснати по торса и крайниците и едно хипопигментно петно с неправилна форма с диаметър около 1 см под дясната мамила.

При проведените образни изследвания (рентгенография на глава и УЗИ на коремни органи) не са установени отклонения.

Детето е с грацилен хабитус като теглото и ръстът са в норма за възрастта. Съчетанието на епилепсия и наличие на хипер / хипопигментни петна е често срещано при пациенти с

Туберозна склероза, както и при други факоматози и дава основание за провеждане на изследвания в тази насока.

Бащата на детето също има хиперпигментно петно с неправилна форма и размери 3x4 см на едното бедро.

При детето беше проведен ДНК таргетен секвенционен анализ на панел включващ 94 гена (TruSight Cancer, Illumina), в това число двата известни гена за Туберозна склероза (*TSC1*, *TSC2*), неврофиброматоза тип 1 (*NF1*) и тип 2 (*NF2*), ксеродерма пигментозум и Анемия на Фанкони. При анализа не бяха установени патологични мутации в гените *TSC1*, *TSC2*, *NF1*, *NF2*, но се установиха две известни мутации в гена *FANCA*, асоциирани с Анемия на Фанкони. И двата варианта са в хетерозиготно състояние и водят до замяна на аминокиселини в белтъчния продукт на гена: p.Ser858Arg в екзон 27 (Фигура 31) и p.Ser1088Phe в екзон 33 (Фигура 32).



Фигура 31 Мутация *FANCA*: p.Ser858Arg

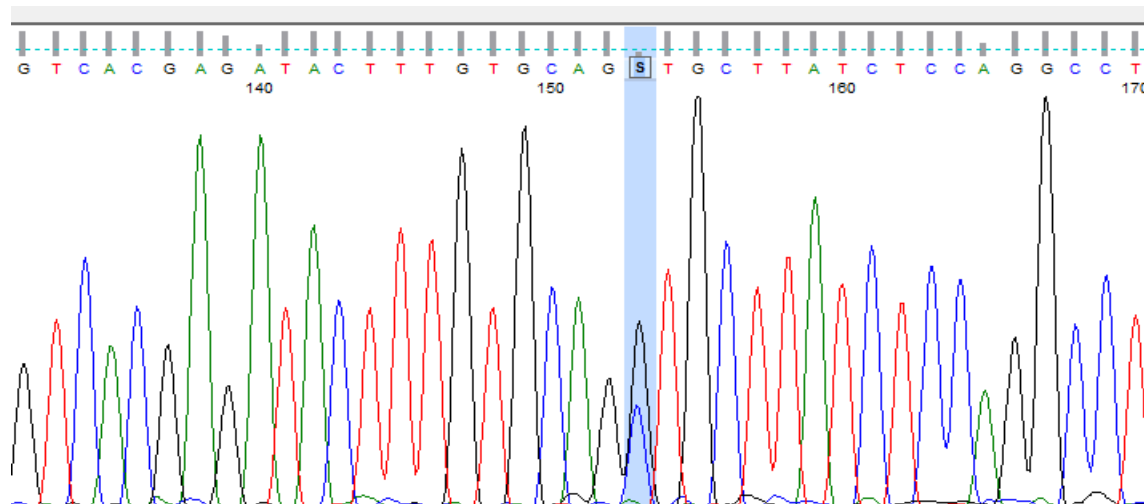


Фигура 32. Мутация *FANCA*: p.Ser1088Phe

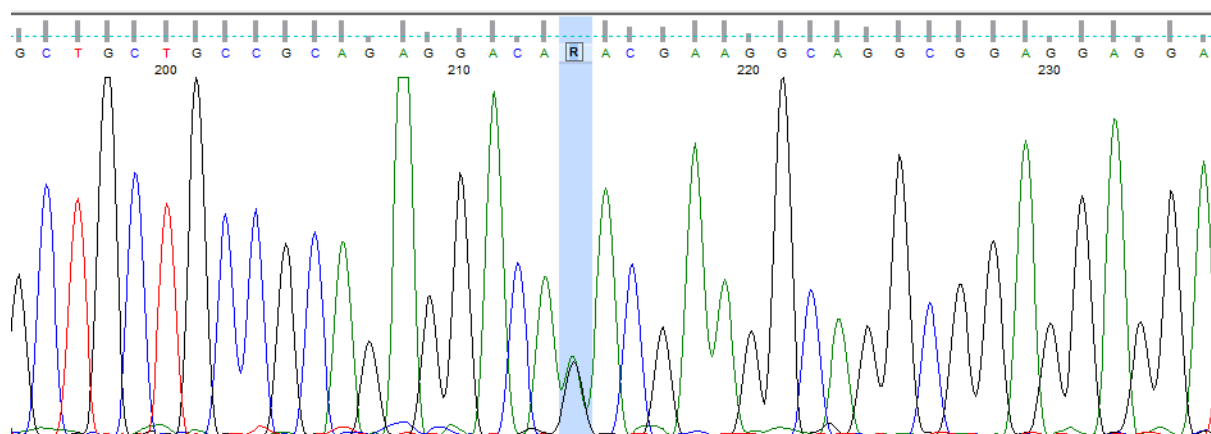
Резултатът от NG секвенционния анализ беше потвърден и чрез секвениране по Sanger.

И двата варианта се срещат с честота над 1% в някои популации, публикувани са в локус-специфичните бази данни, наблюдавани са при пациенти с Анемия на Фанкони и независимо от честотата им се смята, че са причинно свързани с болестния фенотип (Wijker M1, et al., 1999; Tamary H, et al., 2000; Rogers, CD., et al., 2004; Savino M et al, 2003). При пациентката беше проведен тест за хромозомна нестабилност, който показва повишена чувствителност към кластогени (DEB и митомицин C). Тестът се смята за специфичен и позволява пресимптоматична диагностика на заболяването.

При родителите на детето се установи хетерозиготно носителство на вариантите: p.Ser858Arg в екзон 27 при майката и p.Ser1088Phe в екзон 33 при бащата (фигура 33).

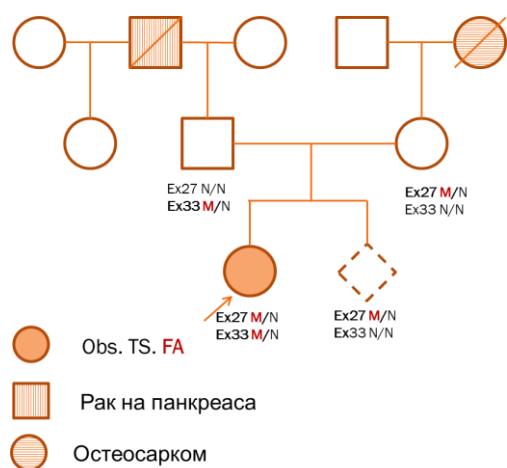


Ex27: p.Ser858Arg



Ex33: p.Ser1088Phe

Фигура 33 Генни мутации в гена *FANCA* p.Ser858Arg в екзон 27 при майката и p.Ser1088Phe в екзон 33 при бащата, диагностицирани по Сангер



Фигура 34 Родословие на семейството на пациент 20. Фамилно изследване за мутации в гена *FANCA*

• **Патологични варианти HADHA p.Glu510Gln и p.Arg291Ter**

Вариантите са установени в хетерозиготно състояние при пациент 24. Пациент 24 е момиче починало на 7 месечна възраст със съмнение за болест на Pompe. Изследване на кръвна проба на детето е показало нормална активност на β - галактозидаза, което отхвърля работната клинична диагноза. Детето е родено от първа нормално протекла бременност, три седмици преди термин, с ниски тегло и ръст (2000 г / 45 см). Родителите са далечни братовчеди, бащата е носител на бета-таласемия. През първите дни след раждането детето е в незадоволително общо състояние, с акроцианоза, клинично незряло, оточно, с неравномерно дишане и иктер, наложили провеждане на кислородотерапия и фототерапия. Отбелязано е наличие на две преаурикуларни висулки на дясното ухо. Изписано е девет дни след раждането, поради ниското тегло, но през този период не е наддало, тъй като е повръщало ежедневно. В къщи детето било добре, на естествено хранене, като ежедневно повръщало, понякога на фонтан. През следващите месеци е наддавало нормално на тегло и ръст, но било отбелязано забавено моторно развитие. При рутинно изследване на кръв на 5 мес. възраст са установени ниски стойности на хемоглобин – 78 g/l, и детето е хоспитализирано за диагностично уточняване. При изследване на кръвна натривка е установена тежка микро-анизоцитоза и хипохромия, леко понижено серумно желязо (5 μ mol/l), установен е прото-мезосистолен шум на сърцето (2/6 ст при структурно нормално сърце), ехографско изследване на коремни органи е показало нормален образ на черен дроб, далак и бъбреци. Състоянието е преценено като „апластична анемия от други външни агенти“ и е назначена терапия с малтофер. На фона на лечението детето започнало да повръща, станало отпуснато, унесено и реагирало вяло на дразнители. При хоспитализацията е установен общо намален мускулен тонус, без данни за менингеално дразнене, дихателна честота – 48/мин, везикуларно дишане без хрипове, ритмична сърдечна дейност, СЧ – 130 удара/мин, черен дроб на 4,5 см под ребрената дъга. От лабораторните изследвания е с данни за понижен хемоглобин, умерена анизо-микроцитоза, ретикулоцитоза (28%), намален албумин, горно гранични стойности на серумното желязо, увеличен билирубин, увеличени стойности на чернодробните трансаминази. Провеждано е лечение с антибиотици, метилпреднизолон, имуновенин и е отбелязано подобрене на лабораторните показатели. Два дни след дехоспитализацията, детето е хоспитализирано отново за уточняване на анемичния синдром и персистиращата

от раждането мускулна хипотония. По време на престоя е констатирано влошаване на чернодробните показатели, при ехокардиография е установена ДКМП и с картина на полиорганна недостатъчност детето е починало. Ходът на заболяването и съчетанието от клинични симптоми насочват към диагноза метаболитно заболяване. При пациент №24 е проведено изследване с генен панел TruSight One и са установени два известни патологични варианта в гена *HADHA*.

Генът *HADHA* кодира алфа-субединицата на митохондриалния трифункционален протеин, който катализира последните три стъпки на митохондриалното бета-окисление на дълговерижните мастни киселини. Митохондриалният мембранно-свързан хетерокомплекс е изграден от четири алфа- и четири бета-субединици, като алфа субединиците имат 3-хидроксиацил-СоА-дехидрогеназна и еноил-СоА-хидратазна активности. Мутациите в гена *HADHA* са причина за дефицит на трифункционалния протеин или LCHAD дефицит. Гените за алфа- и бета-субединиците на митохондриалния трифункционален протеин са локализирани в съседство, като са ориентирани един срещу друг.

Вариантът p.Glu510Gln (rs137852769) представлява нуклеотидна замяна на цитозин с гуанин в позиция 26418053 на 2-ра хромозома. Промяната засяга кодиращата последователност на гена *HADHA* и води до замяна на кодон 510 (кодиращ аминокиселината глутамат) с кодон за глутамин и до промяна на полипептидната верига. Вариантът има глобална популационна честота 0.001203 и е най-честият патологичен алел наблюдаван при пациенти с LCHAD дефицит (<http://www.omim.org/entry/609016>). Вторият вариант p.Arg291Ter (rs137852775) представлява нуклеотидна замяна на гуанин с аденин в позиция 26437359 на 2-ра хромозома. Промяната води до замяна на кодон 291 (кодиращ аминокиселината аргинин) със стоп-кодон и вероятно води до NMD или до продукция на скъсен функционално неактивен протеин. Вариантът е известен и е наблюдаван при пациенти с дефицит на трифункционалния митохондриален протеин (<http://www.omim.org/entry/609015>).

Заболяването се характеризира с лактатна ацидоза, кардиомиопатия, задръжка във физическото и невро-психичното развитие, чернодробна и дихателна недостатъчност, мускулна слабост, при инфантилната форма на заболяването прогресията е бърза и води

до смърт в ранна възраст. Патологичните варианти в екзон 9 и 15 са показани на фигури 35 и 36.



Фигура 35 Мутация *HADHA* p.Arg291Ter при пациент №24.



Фигура 36 Мутация *HADHA* p.Glu510Gln при пациент №24.

При пациент 24 са установени патологични варианти в други гени, които биха могли да имат модифициращ ефект върху основния фенотип. При пациентката е установен един известен полиморфен патологичен вариант в гена *AMPD1* p.Gln45Ter (rs17602729) в хомозиготно състояние. Вариантът представлява замяна на гуанин с аденин в позиция 115236057 на 1-ва хромозома и води до замяна на кодон 45 (кодиращ глутамин) със стоп-

кодон (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV000019933.28/>). Мутацията е наблюдавана при пациенти с автозомно-рецесивна форма на миопатия в резултат на дефицит на ензима миоаденилат деаминаза (<http://www.omim.org/entry/615511>). Заболяването се характеризира с мускулна слабост, хипотония и при някои пациенти с рабдомиолиза и повишена креатинкиназа в серума. Фенотипът е вариабилен. Заболяването се смята за относително лека форма на миопатия и някои от патологичните алели (включително вариантът установен при пациентката) са чести сред европейци (MAF = 0,130961). Честотата на варианта в Българската популация е неизвестна. Все пак е възможно хомозиготното носителство на този вариант да е утежило протичането на основното заболяване при пациентката. На фигура 37 е представен участъкът от екзон 2 на гена *AMPD1* при пациентката (p.Gln45Ter).



Фигура 37 Мутация *AMPD1* p.Gln45Ter (rs17602729) при пациент №24

При пациентката също така е установено носителство в хетерозиготно състояние на известен патологичен алел на бета-глобиновия ген, асоцииран с бета-0-таласемия: *HBB* p.Gln40Ter (rs11549407), което може да обясни наблюдаваната хемолитична анемия.. Вариантът представлява замяна на гуанин с аденин в позиция 5248004 на 11-та хромозома, която води до замяна на кодон 40 (кодиращ аминокиселината глутамин) със стоп-кодон. Вариантът е известен още като „beta0-39“ и е една от най-честите патологични мутации наблюдавани при пациенти с β -таласемия

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/15402/>, <http://www.omim.org/entry/141900>).

Находката не е неочаквана, като се има предвид фамилната анамнеза за носителство на бета-таласемия при бащата. При пациентката не е установен втори патологичен или вероятно патологичен вариант в гена *HBB*. Патологичният вариант *HBB* p.Gln40Ter е показан на фигура 38.



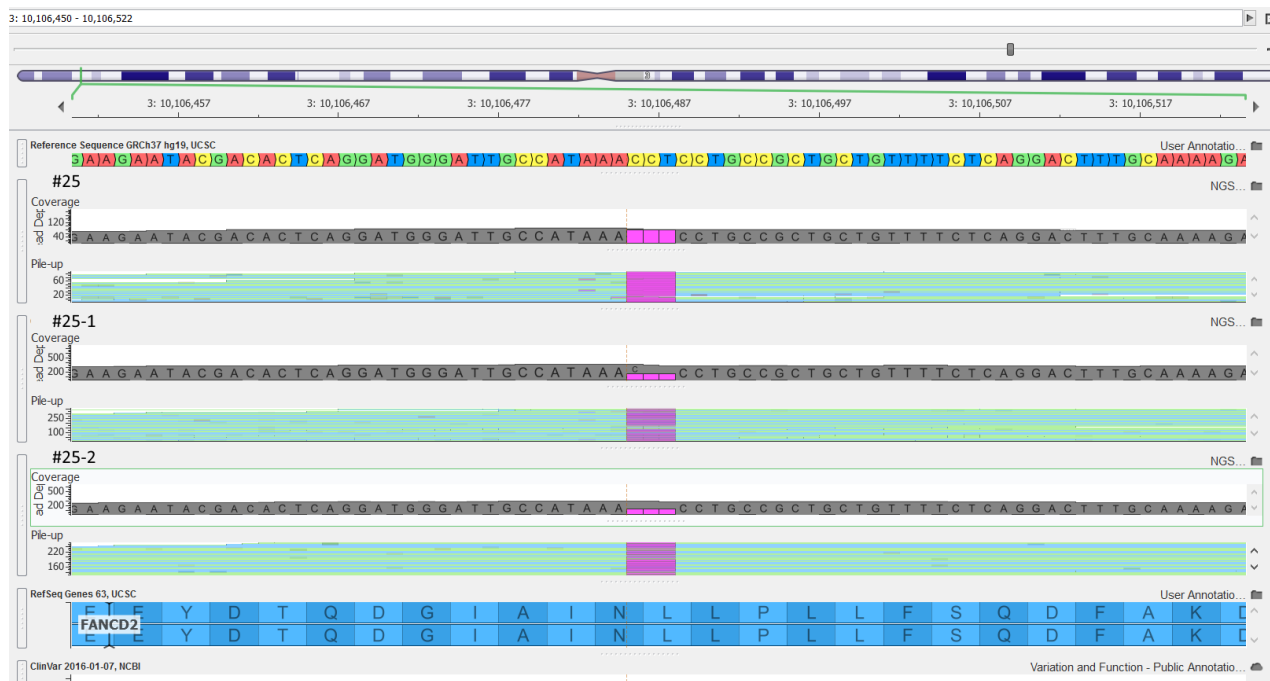
Фигура 38 Мутация *HBB* p.Gln40Ter при пациент №24

Този случай е поучителен в няколко аспекта: а) анамнеза за наличие на кръвнородство между родителите не означава, че детето им, страдащо от рецесивно заболяване, е унаследило един и същи патологичен алел от всеки от тях; б) фенотипно здравите хора носят повече от един патологичен рецесивен алел и децата на двойки с кръвнородство между партньорите може да са в риск за повече от едно моногенно заболяване; в) фенотипът на пациента винаги е комплексен – резултат от съчетание на множество моногенно обусловени белези.

- **Патологичен вариант *FANCD2* p.Leu700del**

Вариантът е установен в хомозиготно състояние при пациент 25 (фетус с ПМС) и в хетерозиготно състояние при двамата му родители. Повод за провеждане на генетични изследвания е установяването на аномалии на плода при ултразвуков преглед (УЗИ) за оценка на фетална морфология в 20 г.сед. в хода на нормално протичаща втора бременност на семейството. При УЗИ е установена двустранна тежка хипоплазия на

радиусите, валгусна деформация на китките и двустранна липса на палци на ръцете, аплазия на десния бъбрек и гранично изоставане в растежа на плода. Първата бременност на семейството е завършила с раждане на здраво момче, родителите са от български произход, млади, здрави и не съобщават за роднинска връзка помежду им (но са от едно и също малко населено място). С цел изясняване на причините за аномалиите беше проведен микрочипов SNP-array анализ на плода. При микрочиповия анализ не бяха установени патологични микроделеции / микродупликации в ДНК на плода, но се установи район със загуба на хетерозиготност в късото рамо на 3-та хромозома с дължина >6 Mb: arr[hg19] 3p26.1p25.3p25.2(6206901-12352468)x2hmz (фигура 39). В района са картирани общо 52 гена: *GRM7*; *LMCD1*; *NAG-7*; *C3orf32*; *CAV3*; *OXTR*; *RAD18*; *SRGAP3*; *THUMPD3*; *LOC440944*; *SETD5*; *LHFPL4*; *MTMR14*; *CPNE9*; *BRPF1*; *OGG1*; *CAMK1*; *TADA3*; *ARPC4*; *TTLL3*; *RPUSD3*; *CIDEC*; *JAGN1*; *IL17RE*; *IL17RC*; *CRELD1*; *PRRT3*; *TMEM111*; *LOC401052*; *CICE*; *FANCD2*; *C3orf24*; *C3orf10*; *VHL*; *IRAK2*; *TATDN2*; *C3orf42*; *GHRL*; *TATDN2/GHRLOS fusion*; *SEC13*; *ATP2B2*; *MIR885*; *LOC285370*; *SLC6A11*; *SLC6A1*; *HRH1*; *ATG7*; *VGLL4*; *C3orf31*; *SYN2*; *TIMP4*; *PPARG*, от които 13 са асоциирани със заболявания, а 3 (*CIDEC*, *JAGN1* и *FANCD2*) - с автозомно-рецесивни заболявания. Един от трите гена, асоциирани с рецесивни заболявания е генът *FANCD2*. Патологичните мутации в този ген се изявяват фенотипно като заболяването анемия на Fanconi тип D2, за което е характерно съчетаването на костномозъчна недостатъчност (панцитопения) изявяваща се в детска възраст с вродени аномалии на крайниците, уринарния тракт и сърцето и предразположение към онкологични заболявания. При установяване на хромозомни райони с голям размер, демонстриращи хомозиготност по еднонуклеотидните полиморфизми в района, както е при плода, би могло да има изява на заболяването, поради съчетаване на рецесивни патологични мутантни алели в хомозиготно състояние. За доизясняване на находката проведохме секвениране от ново поколение с панела TruSight Cancer, който включва освен гена *FANCD2* и други 15 гени, чиито мутации асоциират с този фенотип. При секвенирането на ДНК на плода установихме нова неописвана досега хипоморфна мутация в гена *FANCD2*: g.10106488_10106490delCCT, NM_033084.3:c.2097_2099delCCT, NP_149075.2:p.Leu700del в хомозиготно състояние (фигура 40). Мутацията представлява делеция на три нуклеотида в последователността кодираща екзон 23 на гена. Делецията запазва рамката на четене, но



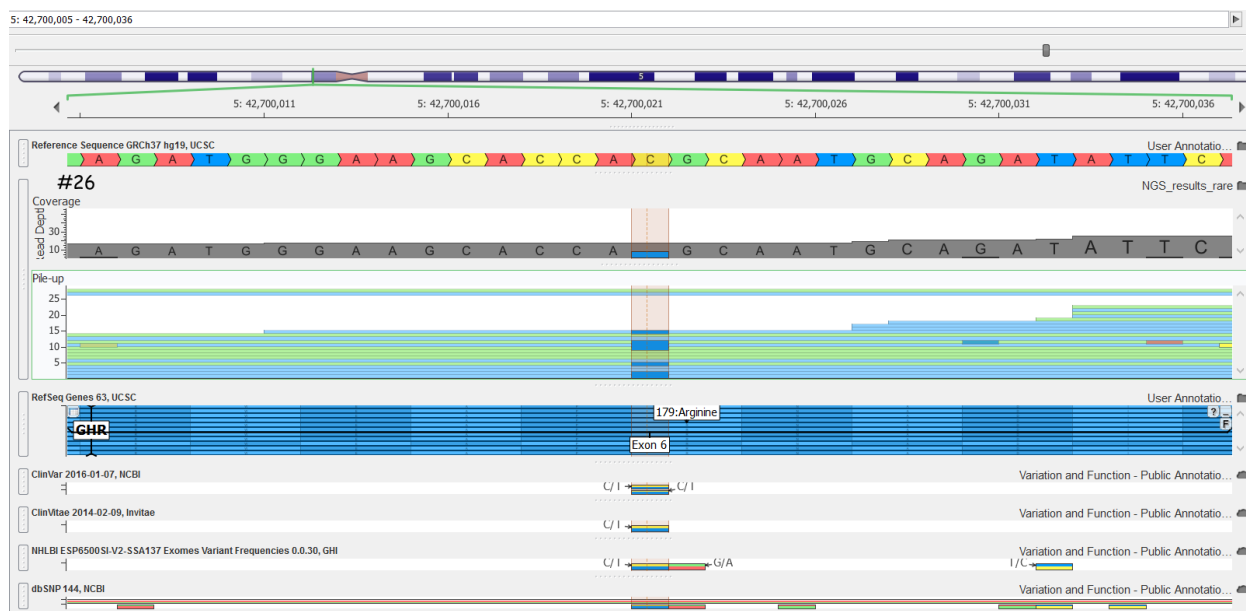
Фигура 40. Мутация *FANCD2*: g.10106488_10106490delCCT, NM_033084.3:c.2097_2099delCCT, NP_149075.2:p.Leu700del. Делетираните бази са маркирани в розово. Най-горе е ДНК последователността на плода (#25) – с хомозиготна делеция, под нея съответно на бащата (#25-1) и майката (#25-2) – с хетерозиготна делеция.

- **Патологичен вариант *GHR* p.Arg179Cys (rs121909362)**

Вариантът е установен в хетерозиготно състояние при пациент 26. Пациент 26 е момче на 3 години. Детето е родено от трета патологична бременност (майка със саркоидоза; с данни за интраутеринна ретардация на плода от V m.l. и олигохидрамнион), чрез цезарово сечение в 37 г. сед. с ниски ръст и тегло при раждането (1700 г / 38 см). Отглеждано е в кувьоз през първите 2,5 месеца след раждането. Задръжката във физическото развитие не била преодоляна в следващите години и теглото и ръстът са <3 перцентил за възрастта. Установени са дисморфични белези: изпъкнали фронтални тубери, дребно лице, хипотелоризъм, ниско разположени ушни миди, страбизъм, двустранна колобома на ириса (ангажира външен долен квадрант), страбизъм, грацилен хабитус, плоскостъпие, клинодактилия на 5-ти пръст на ръцете. При ехокардиография е установено структурно нормално сърце с лекостепенна хипертрофия на ендокарда на двете камери. МРТ на ЦНС на 3 г. е показала лекостепенна перивентрикуларна левкомалация, умерена необструктивна комуницираща вътрешна хидроцефалия, лека атрофия и елевация на

церебеларния вермис. Ехографско изследване на коремните органи е показало нормален резултат. При един от болничните престои е регистриран намален отговор към растежен хормон по време на сън. Детето е с изоставане в невропсихичното развитие – KOP=35. Проведените генетични изследвания на кариотип, aCGH (4x44K, Agilent), метилиране на 11p15 (H19DMR) и 7q32 (MEST) са показали нормални резултати.

При пациент 26 е проведен ДНК анализ чрез секвениране с панела TruSight One. Установен е един известен патологичен вариант в гена, кодиращ рецептора за растежен хормон в хетероиготно състояние (*GHR* p.Arg179Cys, фигура 41). Вариантът представлява хетерозиготна нуклеотидна замяна на цитозин с тимин в позиция 42700021 на 5-та хромозома, която води до замяна на аминокиселина в полипептидната верига на рецептора: аргининът на позиция 179 се заменя с цистеин. Вариантът е известен и е наблюдаван при пациенти с нечувствителност към растежен хормон (Goddard A et al, 1995). Патологичните варианти в гена *GHR* са причина за доминантни и рецесивни форми на задръжка в растежа (автозомно- доминантна форма Growth hormone insensitivity, partial OMIM#604271, автозомно-рецесивна форма Laron dwarfism OMIM#262500). При пациента не е установен втори патологичен или вероятно патологичен вариант в гена. Установеният вариант може да обясни задръжката в растежа, но няма отношение към очното заболяване и останалите фенотипни прояви. Независимо от установяването на вариант, който може да се свърже с фенотипа, етиологията не е изяснена напълно. Вариантът в гена *GHR* е потвърден чрез секвениране по Сангер.



Фигура 41 Мутация *GHR* p.Arg179Cys, rs121909362 при пациент 26.

- **Патологичен вариант *CLCN1* c.1436_1449delTACCCTGCGGAGGC (p.Pro480HisfsTer24)**

Вариантът е установен при пациент 27 в хетерозиготно състояние. Пациент 27 е момиче на 3 години родено от втора бременност. Първото дете на семейството е момче с вродена миотония. Пациентката е с диагноза: Grand mal припадъци (с малки припадъци (petit mal) или без тях), неуточнени; и придружаващо заболяване: Специфични разстройства в развитието на двигателната функция. Детето е родено на термин по нормален механизъм с тегло 4000 г, изплакала веднага. До 6 месечна възраст е държала ръцете свити в юмруци. На 6 месечна възраст по време на сън при фебрилитет 38°C получила пристъп с треперене на десни крайници и клепач на дясното око, който продължил 25-30 минути. Детето било хоспитализирано и била назначена антиконвулсивна терапия. Направена КТ на главен мозък показала нормален образ на ЦНС. Проведено ЕЕГ – „пароксизмална абнормност от бавни комплекси с променлива амплитуда“. В следващите месеци периодично получавала пристъпи с широко отваряне на очите, задръжка на дишането, изпъване на тялото и крайниците, стягане на челюстта и посиняване на устните за около 30 секунди, имала периоди от по няколко дни без пристъпи, както и множество пристъпи в един ден (до 12). При фебрилитет били регистрирани тонични пристъпи с продължителност 20-30 минути,

подобни на първия описан. Отчетено е изоставане в невропсихичното развитие – на 6 месеца: не се обръщала от гръб на корем, не е постигнат седеж, не хваща и не посяга към играчки, няма емоционален контакт с близките си, на 11 месеца – не е отчетен прогрес в психо-моторното развитие, на 3 г. – не са овладени тазови резервоари, не говори. При последващо ЕЕГ (на 1 г) са установени епилептични модифицирани сънни елементи с максимум темпоро-фронтално двустранно. При проведена МРТ е установена изолирана хемимегаленцефалия в ляво окципитално. Поради задръжката в НПР и наличие на аутистични елементи в поведението е изказано съмнение за синдром на Rett. ДНК анализ за търсене на мутации в *MECP2* гена, както и изследване за с-м на Angelman са дали негативен резултат.

Изследването с панела TruSight One при пациентката установи един известен патологичен вариант в гена *CLCN1*: p.Pro480HisfsTer24 в хетерозиготно състояние. Генът *CLCN1* кодира каналчетата за хлоридни йони, които регулират възбудимостта на мускулните влакна (<http://www.omim.org/entry/255700>). Патологичните варианти в гена са асоциирани с автозомно-рецесивна и автозомно-доминантна форма на вродена миотония (Myotonia congenita, dominant, OMIM#160800; Myotonia congenita, recessive, OMIM#255700). Вариантът представлява делеция на 14 бази в последователността, кодираща 13-ти екзон на гена, което води до изместване на рамката на четене, формиране на стоп-кодон в новата рамка и води до NMD или синтез на протеин със скъсена полипептидна верига. Конкретно този вариант се свързва с автозомно-рецесивната форма на заболяването и с по-тежък клиничен фенотип (Becker PE, 1977; Dupre N et al., 2009). Като се има предвид ранното начало и тежестта на симптомите, при пациентката вероятно се касае за рецесивната форма на заболяването. При проведения ДНК анализ чрез NG секвениране не е установен втори известен патологичен или вероятно патологичен вариант в екзоните и екзон-интронните граници на гена *CLCN1*. При изследване на пациенти с рецесивна вродена миотония и установен само един мутантен алел Raja Rayan et al. (2012) установяват екзонни делеции / дупликации при 6,7% от изследваните. При пациентката не е извършен анализ за установяване на екзонни делеции / дупликации в гена *CLCN1*. Наскоро е установено, че *CLCN1* се експресира и в ЦНС и е изказана хипотеза, че носителството на патологични варианти в *CLCN1* гена може да се изяви фенотипно като епилепсия рефрактерна на терапия (Chen TT et al, 2013). На фигура 41 е представен участъкът от

екзон 13 на гена *CLCN1* при пациентката. Вариантът е потвърден със секвениране по Сангер и е установен в хетерозиготно състояние при бащата и при братя на пациентката. Братът на пациентката е диагностициран с вродена миотония, но е с нормално невропсихично развитие. Бащата на пациентката е имал „фебрилни гърчове“ като дете, но също е с нормален интелект и не са установени отклонения в неврологичния статус. И при двамата е налице хипертрофия на мускулите на подбедриците. Патологичният вариант в гена *CLCN1* само частично обяснява фенотипните прояви при пациент 27 и допускаме, че носителство на варианти в други гени вероятно оказва модифициращ ефект върху фенотипа.



Фигура 42 Мутация *CLCN1* с.1436_1449delTACCCTGCGGAGGC, p.Pro480HisfsTer24 при пациент №27

- **Патологичен вариант *SCN8A* p.Arg1872Gln**

Вариантът е установен в хетерозиготно състояние при пациент 30. Пациент 30 е момиче на 7 г. родено от първа нормално протекла бременност, без фамилна обремененост за неврологични заболявания. Детето е с диагноза Криптогенна епилепсия: левостранни фронтоцентротемпорални псевдоабсанси с вторично генерализирани тонично-клонични пароксизми и първично генерализирани тонично-клонични пароксизми. При пациентката са налице умерена задръжка в психо-моторното развитие (говор – единични думи) и някои дисморфични белези (рядко разположени зъби на долната челюст, ретрогнатия с неправилна захапка, хипертрофични гингиви, хипопигментно петно с неправилна форма

1x3 см на десния глезен и хиперпигментно петно 3x3 см на дясна китка), не може да тича, изкачва стълби, като се държи за перилата. Проведените генетични изследвания за с-м на Angelman и за мутации в *SCN1A* гена са показали нормални резултати. Отбелязано е влошаване на находката в ЕЕГ, въпреки стриктно провежданата терапия.

При пациент 30 е установен един известен патологичен вариант, който може да се свърже с наблюдавания клиничен фенотип. Вариантът представлява хетерозиготна нуклеотидна замяна на гуанин с аденин в позиция 52200885 на 12-та хромозома. Промяната засяга кодиращата последователност на гена *SCN8A* и води до замяна на гуанин с аденин в позиция 5615 (на ниво иРНК) и до продукция на протеин с аминокиселинна замяна (аргинин на позиция 1872 е заменен с глутамин). Генът *SCN8A* кодира α -субединицата (Nav1.6) на волтаж-зависимите натриеви канали във възбудните неврони на централна и периферна нервна система (<http://www.omim.org/entry/600702>). Мутацията засяга С-терминалния вътреклетъчен домен на протеина, който участва във взаимодействия с други протеини, като калмодулин, G-протеини, β -субединицата и някои антиепилептични лекарства (фенитоин). Вариантът е известен и е наблюдаван при пациент с ранна епилептична енцефалопатия и задръжка в невропсихичното разавитие (Ohba C et al, 2014). Патологичните варианти на гена *SCN8A* в хетерозиготно състояние се проявяват фенотипно като автозомно доминантна форма на ранна епилептична енцефалопатия (EIEE13, <http://www.omim.org/entry/614558>). При описаните досега пациенти мутациите в гена *SCN8A* са възникнали de novo. Вариантът е потвърден чрез секвениране по Сангер при пациентката и не е установен при никой от родителите, което съответства на негативната фамилна анамнеза при пациентката и потвърждава доминантния характер на мутацията. Заболяването се характеризира с епилептични гърчове от различен тип (абсансни, фебрилни, генерализирани тонично-клонични), които трудно се поддават на медикаментозен контрол, началото на заболяването е в ранна възраст, при някои от пациентите е наблюдавана церебрална и церебеларна атрофия, задръжка в невропсихичното развитие с последващ тежък интелектуален дефицит. На фигура 43 е представен участъкът от екзон 27 на гена *SCN8A* при пациентката.



Фигура 43 Мутация *SCN8A* p.Arg1872Gln при пациент 30.

- **Патологичен вариант *RPS6KA3* p.Arg305Ter**

Вариантът е установен в хемизиготно състояние при пациент 32. Пациент 32 е момче на 5 г. родено от първа патологично протекла бременност (с кървене в първи триместър), с нормални ръст и тегло при раждането (3010 г / 50 см). Родителите са млади, здрави, от български етнически произход. Неонаталният период е протекъл без усложнения. Когато било на два месеца родителите забелязали, че не задържа главичка и е отпуснат. Хоспитализиран е неколkokратно в клиниката по генетика на СБАЛДБ. Установени са дисморфични стигми: хипертелоризъм, епикант, депресия в основата на носа, дебела долна устна, малка брадичка, дълъг изгладен филтрум, *rectus excavatum*, къси пръсти с изтънени дистални фаланги. При проведените изследвания е установено: ТФЕ – лека дилатация на предните рога на латералните вентрикули, неразширени външни ликворни пространства; ехокардиография – дисфункция на митралната клапа с промени в поддържащия апарат с лекостепенна митрална стеноза и митрална инсуфициенция; лабораторни изследвания – преходна хиперкалциемия и калциурия през първата година. При проведена МРТ е установена лекостепенна хидроцефалия от оклузивен тип (коригирана оперативно), непълна стеноза на мозъчния акведукт и хипоплазия на *Corpus callosum*. При детето е налице лекостепенна задръжка в невро-психичното развитие (IQ=69). Съчетанието от дисморфични белези, хиперкалциемията и изоставането в НПР

насочили към вероятна диагноза синдром на Williams-Beuren. При около 96% от пациентите с типичен фенотип на синдром на Williams-Beuren установяването на микроделеция в 7q11.23 може да потвърди диагнозата (Lowery MC et al, 1995). При пациент 32 изследване чрез MLPA за установяване на делеции / дупликации във WBS локуса е показало нормален брой копия.

Изследването чрез секвениране с панела TruSight One установи хемизиготна мутация в *RPS6KA3* гена, която може да се свърже с наблюдавания фенотип. Вариантът представлява нуклеотидна замяна на гуанин с аденин в позиция 20195135 на X-хромозомата (фигура 45). Промяната засяга кодиращата последователност на гена *RPS6KA3* и води до замяна на кодон 305 (кодиращ аминокиселината аргинин) със стоп-кодон на ниво мРНК и до NMD или до продукция на скъсен функционално неактивен протеин.

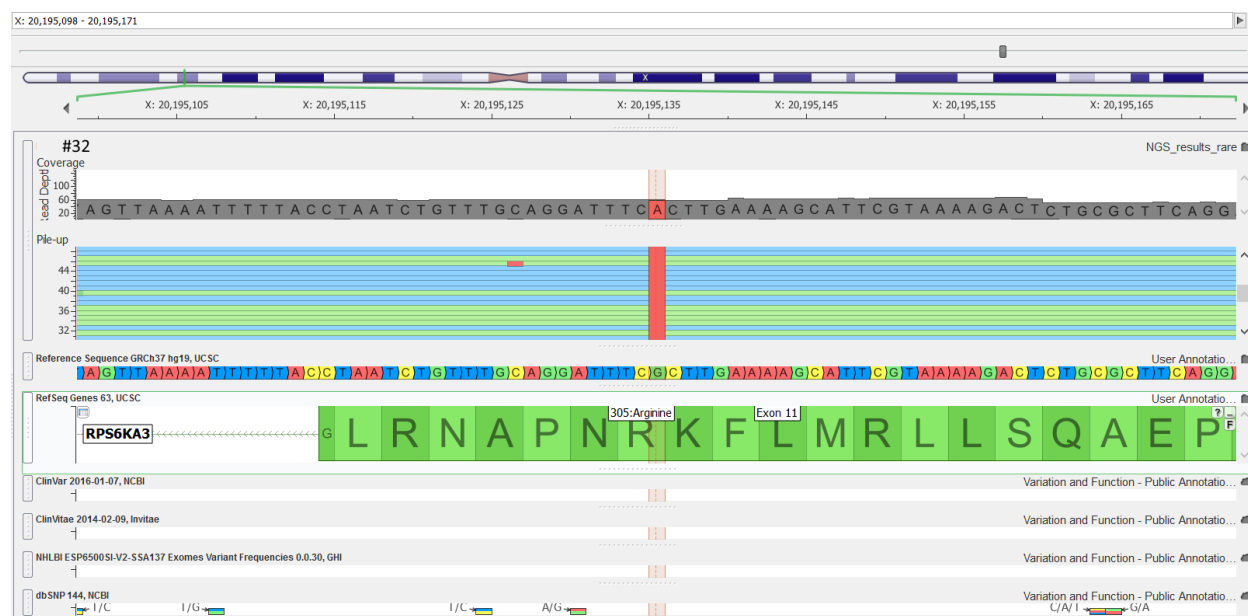
Генът *RPS6KA3* кодира един от членовете на RSK (рибозомна S6 киназа) семейството на регулираните от растежни фактори серин / треонин кинази, известни също като p90(rsk). RSK протеините съдържат 2 функционални киназа каталитични домени: N-терминален киназен домен подобен на киназите от AGC семейството и C-терминален киназен домен подобен на CaMK киназното семейство. Двата киназни домена са свързани със 100-аминокиселинна линкерна област, съдържаща PDK (PDPK1) докинг сайт. В отговор на растежни стимули (растежни фактори, хормони и невротрансмитери) MAPK протеините (например, ERK1) директно фосфорилират RSK, които впоследствие фосфорилират много други субстрати. Смята се, че RSK протеините имат важна роля за прогресията на клетъчния цикъл, клетъчната преживяемост и диференциация (Marques Pereira P et al, 2010).

Вариантът установен при пациент 32 не е документиран досега в медицинската литература и базите данни за патологични варианти. Патологичните варианти в гена *RPS6KA3*, в резултат на нон-сенса мутации (както е при пациента) и мутации с изместване на рамката на четене се проявяват фенотипно като X-свързана доминантна форма на синдром на Coffin-Lowry (<http://www.omim.org/entry/303600>). Заболяването най-често е резултат от de novo възникнали мутации и повечето случаи са спорадични. Синдромът на Coffin-Lowry се характеризира с лицев дисморфизъм (груби черти на лицето, изразени

надочни дъги, хипертелоризъм, антимонголоидно разположени очни цепки, дебели устни, проминиращи чело и брадичка, едър нос, едри медиални резци, високо небце), задръжка в невропсихичното развитие, нисък ръст, изоставане в костната възраст, дилатация на мозъчните вентрикули, забавено затваряне на голямата фонтанела, недостатъчност на митралната клапа на сърцето, мускулна хипотония и засягане на костно-ставния апарат (сколиоза / кифоза, *Coxa valga*, плоскостъпие). На фигура 44 е предствен фенотипът на пациент 32. Вариантът е потвърден чрез секвениране по Сангер при пациента и не е установен при неговата майка.



Фигура 44 Фенотип на пациент №32: груби черти на лицето, широко проминиращо чело, хипертелоризъм, антимонголоидни очни цепки, филтрум с изгладен релеф, пълни устни, проминираща брадичка.



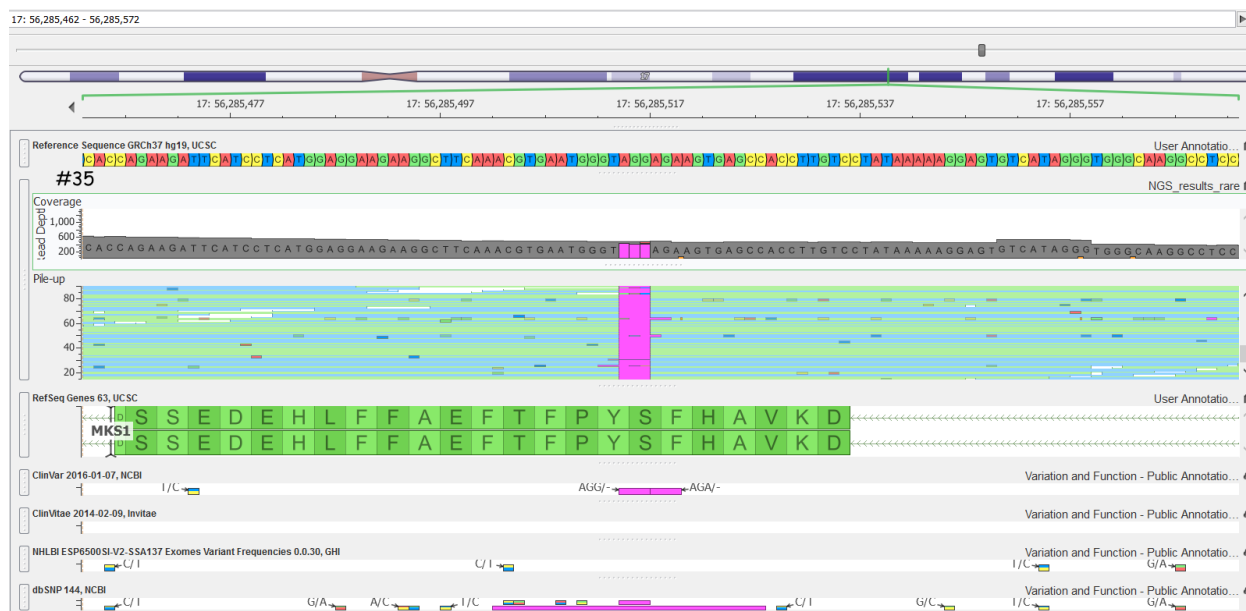
Фигура 45 Мутация *RPS6KA3*: p.Arg305Ter при пациент 32.

- **Патологичен вариант MKS1 p.Ser372del**

Вариантът е установен при пациент 35 в хомозиготно състояние. Пациент 35 е момче на 6 години с полималформативен синдром и задръжка в невро-психичното развитие. Детето е родено от втора нормално протекла бременност, като при раждането е установено увеличено количество околоплодна течност. Поради наличие на дисморфични белези и хипербилирубинемия детето е било хоспитализирано. Дисморфичните белези включват: проминиращо чело, широка основа на носа, депресия на основата на носа, антевертирани ноздри, дълъг филтрум, хипертелоризъм, коси асиметрични очни цепки, страбизъм, сарит quadratum, къса шия, високо небце, рядко разположени зъби на долната зъбна редица, пектус екскаватум, къси крайници, с брахидактилия и дистално изтънени фаланги, външните полови органи са от мъжки тип, с микропенис и двустранно асансьорни тестиси. При детето е установен вроден сърдечен порок – непълен АВСД, който е коригиран оперативно на 4 годишна възраст. Изостава във физическото и невро-психичното си развитие, КоР<50. Проходил на 2 годишна възраст с чужда помощ, на 6 години – ходи самостоятелно, но походката е нестабилна. Речта е ограничена до думите „мама“ и „баба“, няма контрол на тазовите резервоари. От ЯМР на ЦНС е установена вентрикуломегалия, ангажираща латералните, трети и в най-голяма степен четвърти мозъчни вентрикули, хипоплазия на вермиса с агенезия на каудалните му дялове и с широка комуникация между 4-ти мозъчен вентрикул и ретроцеребеларната цистерна, ретроцеребеларната, препонтинната и премедуларната цистерни са дилатирани, проминентна загуба на сигнал в дорзалната част на 3-ти мозъчен вентрикул и по хода на Силвиевия акведукт, двете церебеларни хемисфери са ротирани напред и медиално, като фолиите са апонирани брахиа понтис, понса и медулата са с редуциран напречник, арахноидните пространства по конвекситета бифронтално са дилатирани, плитка лява костна орбита, дясната вена на Розентал и вена Галени са дилатирани. Находката е интерпретирана като вариант на Dandy-Walker аномалия. Проведените при детето лабораторни изследвания за вродени инфекции, метаболитен скрининг, кариотип и aCGH (1x1M) са показали нормални резултати. ДНК секвенционният анализ с панела TruSight Inherited diseases, Illumina установи нова неописвана досега хомозиготна мутация в гена MKS1: c.1115_1117delCCT, p.Ser372del. MKS1 (Meckel syndrome 1) е един от трите,

принадлежащи към семейството на съдържащите B9 домен протеини. Към същото семейство се отнасят още B9D1 (B9 domain-containing protein 1) и B9D2 (B9 domain-containing protein 2). Всичките три, съдържащи B9 домен протеини, участват в цилиогенезата и формирането на реснички в клетките на бозайниците (Bialas et al, 2009). Мутацията, установена при пациент 35, е делеция на три нуклеотидни двойки със запазване на рамката на четене, водеща до загуба на серин на 372-ра позиция в белтъчния продукт. Продуктът на *MKS1* гена е протеин съставен от 559 аминокиселини, като аминокиселините от 311 до 439 образуват консервативния B9 домен. Загубата на серин на 372-ро място вероятно е патологична и може да се очаква да наруши функцията на протеина. При пациент с фенотип на Bardet-Biedl syndrome 13 Leitch et al. (2008) са описали хипоморфни мутации в гена *MKS1*, една от които е делеция на фенилаланин на 371 позиция със запазване на рамката на четене. Мутация, като наблюдаваната при нашия пациент – p.Ser372del, но соматична, е установявана в туморна клетъчна линия от мантелно клетъчен лимфом (Sílvia Beà et al, 2013). Герминативни патологични мутации на гена *MKS1* са описвани при пациенти с фенотип на поне 3 различни моногенни рецесивни заболявания: синдром на Meckel тип 1, синдром на Bardet-Biedl тип 13 и синдром на Joubert (Marta Romani et al, 2014). Морфологичните промени в ЦНС и съпътстващите неврологични симптоми, както и някои от дисморфичните белези, наблюдавани при пациент 35, наподобяват тези, откривани при пациенти със синдром на Joubert, докато хипогенитализмът по-често се открива при пациенти със синдром на Bardet-Biedl. Находката при пациент №35 е още едно потвърждение за голямото разнообразие на клиничния фенотип при мутации в гените свързани с цилиогенезата.

На фигурата 46 е представен екзон 13 на гена *MKS1* при пациент №35. Делетираните нуклеотиди са маркирани.



Фигура 46 Мутация *MKS1* p.Ser372del при пациент №35.

Седем от пациентите от 2-ра група са от ромски етнически произход и са с диагноза спастична квадриплегия, която при четирима (пациенти 39, 40, 41, 42) е съпроводена и от епилепсия. През 2014 г. голям колектив от български и австралийски учени публикува резултати от изследване сред български роми, касаещо етиологията на вродената лактатна ацидоза при пациенти от този етнос, като в 50% от случаите е установена една и съща нонсенс мутация (*PDHX* p.Arg 446*) в хомозиготно състояние (Ivanov IS et al, 2014). При пациентите с този дефект е намерено характерно съчетание на неврологични симптоми – спастична квадриплегия и епилепсия. Седемте пациенти са били изследвани в НГЛ чрез ДНК секвениране за пируват дехидрогеназен дефицит, свързан с мутации в *PDHX* гена, но не е била установена най-често срещаната сред ромите мутация p.R446X в гена *PDHX*.

Проведеният от нас анализ на пациентите е извършен чрез таргетно екзонно секвениране от ново поколение с TruSight Inherited Disease панел на 552 гена, асоциирани с тежки рецесивни заболявания.

- **Патологичен вариант *RNASEH2B* p.Ala177Thr**

Вариантът е установен при пациент 36 във хомозиготно състояние. Този вариант се характеризира със замяна на гуанин (G) с аденин (A) в позиция 51519581 на 13-та

хромозома, което води до замяна на аланин (Ala) с треонин (Thr) в позиция 177 на белтъчния продукт на гена. На фигура 47 е представен екзон 7 на гена *RNASEH2B*. Замененият нуклеотид е маркиран.



Фигура 47 Мутация в гена *RNASEH2B*: chr13 g.51519581G>A, NM_024570.3:c.529G>A, NP_078846.2:p.Ala177Thr при пациент 36

Генът *RNASEH2B* кодира бета субединицата на човешкия ензим рибонуклеаза H2 комплекс, който медира отделянето на рибонуклеотиди от РНК:ДНК дуплекси. Протеинът съдържа 308-амино киселини и се експресира във всички тъкани (Crow et al., 2006). Вариантът е известен и е най-често наблюдаваната мутация при пациенти със синдром на Aicardi-Goutieres тип 2 (<http://omim.org/entry/610326>; <http://omim.org/entry/610181>). Според литературни данни (Crow, Y. J., et al., 2006), в засегнатите членове на 7 семейства със синдром на Aicardi-Goutieres 2, е установена хомозиготна замяна на гуанин с аденин (c.529G>A) в екзон 7 на гена *RNASEH2B*, в резултат на което аланинът на 177-ма позиция е заменен с треонин. Семействата са с различен етнически произход (алжирски, марокански, ирландски, италиански, френско-канадски, и немски). В седем други семейства е установено съчетано хетерозиготно носителство на A177T мутацията с друга патогенна мутация в гена *RNASEH2B*. От общо 36-мутантни алели, 20 (55%) са A177T, доказани в 18 семейства с Aicardi-Goutieres синдром.

При пациент 36 началото на симптомите е от 8-9 месечна възраст, когато станал по-вял, настъпил регрес в моторните умения и спрял да пълзи. Клиничните симптоми включват: квадрипирамиден синдром: парези и парализи - движи четирите крайника, липсва контрол на главата, не може да седи самостоятелно, не може да ходи самостоятелно при запазена опора в долни крайници; мускулният тонус е спастично повишен, по-изразен за долни крайници; СНР - двустранно оживени с анизорефлексия Д>Л; спонтанен патологичен рефлекс на Бабински - положителен двустранно, положителен рефлекс на Росолимо двустранно; клонуси на ходилата двустранно; без епилептични пристъпи и нормално ЕЕГ. МРТ на главен мозък е с данни за дифузни, относително дискретни промени в интензитета на бялото мозъчно вещество супра- и субтенториално в зоните на понса и нуклеа дентати, съмнение за дисмиелинизация. До момента на геномния анализ с NGS технология, етиологията на спастичната квадрипареза остава неясна. Секвенирането от ново поколение изяснява генетичната причина за наблюдаваната клиника и променя клиничната диагноза в синдром на Aicardi Goutieres.

Може да се заключи, че клиничната презентация със спастична квадрипареза, по-изразена в долните крайници е характерна фенотипна изява при пациенти с мутацията A177T на гена *RNASEH2B* (Crow, Y. J., et al., 2006).

При същия пациент е установено носителство в хетерозиготно състояние на известни патологични алели в три други гена, които в хомозиготно състояние асоциират с автозомно-рецесивни заболявания:

а) мутация в гена *GBA*: p.Asn409Ser, rs76763715. Вариантът е наблюдаван при пациенти с болест на Gaucher тип 1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/1540113/>),

б) *NPHS2*: p.Arg229Gln, rs61747728. Вариантът е описан при пациенти с „Нефротичен синдром тип 2“ (<http://omim.org/entry/604766>),

б) *MEFV*: p.Val726Ala. Вариантът е идентифициран при пациенти с Фамилна средиземноморска треска (<http://omim.org/entry/608107>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV000002649/>).

- **Патологичен вариант *AP1S2* p.Tyr86Ter**

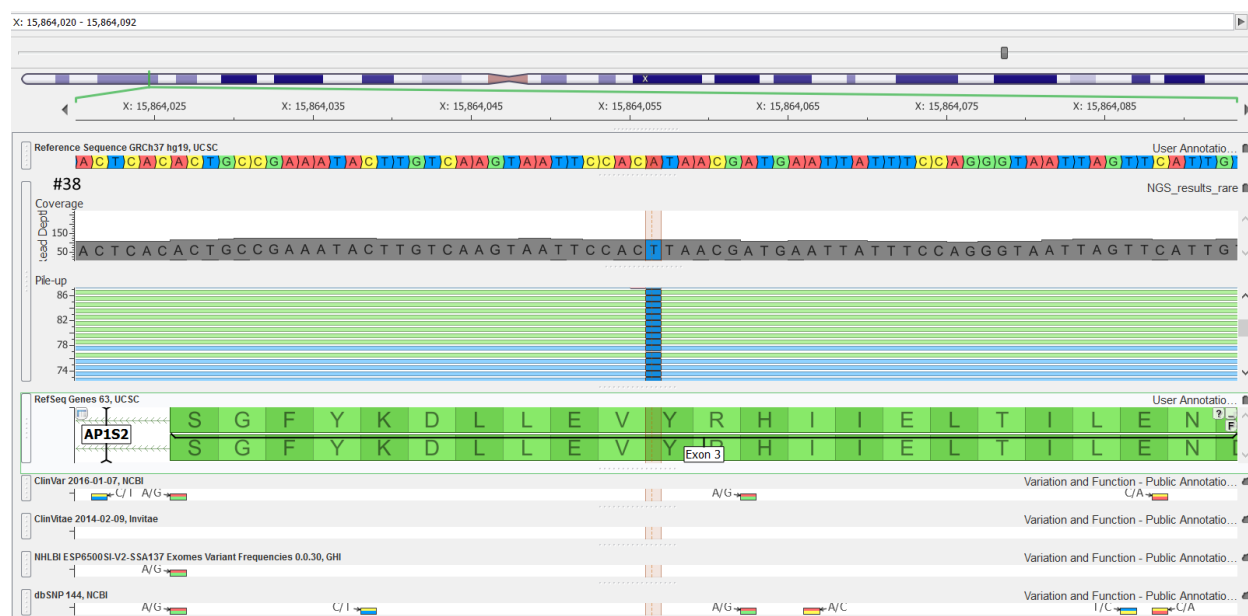
Вариантът е установен при пациент 38 в хемизиготно състояние. Генът *AP1S2* кодира сигма-2-субединицата на хетеротетрамерен адапторен протеин-1 комплекс (AP1 - Adaptor-related protein complex 1, sigma-2 subunit). AP1 се намира в цитозолната страна на покритите везикули в апарата на Golgi. AP1 комплексът опосредства асемблирането на клатрин и разпознаването на сигнали от трансмембранните рецептори за сортиране (Cacciagli et al., 2014). Мутации в гена *AP1S2* са наблюдавани при пациенти със синдромно X-свързано рецесивно изоставане в умственото развитие (Mental retardation, X-linked syndromic 5). Проявите на заболяването включват мускулна хипотония в детска възраст, забавено двигателно развитие, затруднена походка в зряла възраст, дискретен лицев дисморфизъм и при някои пациенти хидроцефалия (<http://omim.org/entry/300630>; Saillour, Y., et al., 2007.; Tarpey, P. S., et al., 2006.; Turner, G., et al., 2003).

При пациент №38 началото на заболяването датира от първите месеци след раждането. Клиничните симптоми включват тежко изоставане в нервно-психическото развитие и спастична квадрипареза, като на възраст 27 години самостоятелната походка е невъзможна. Пациентът има здрави родители, един здрав брат и един брат с подобни на неговите клинични симптоми, но изразени в по-слаба степен. Фамилните данни съответстват на X-свързано рецесивно унаследяване.

Идентифицираната мутация в *AP1S2* представлява замяна на аденин с тимидин в позиция 15864056 на X-хромозомата, която води до промяна на кодон 86 (кодиращ аминокиселината тирозин) в стоп-кодон (фигура 48). Мутацията не е описвана досега. Вариантът е класифициран като патогенен, тъй като се вписва в мутационния спектър на патологичните варианти установявани в гена *AP1S2* – всички описани досега патологични варианти са мутации водещи до изместване рамката на четене или до формиране на преждевременен стоп. Вариантът е потвърден чрез секвениране по Сангер и е установен и при болния брат на пациента.

При пациент № 38 е установено също и хетерозиготно носителство на известна патологична мутация в гена *SMPD1* (Sphingomyelin phosphodiesterase 1, acid lysosomal), NM_000543.4:c.1177T>G, NP_000534.3:p.Trp393Gly, асоциирана с интермедиерна протрахирана невро-висцерална форма на болестта на Niemann-Pick, тип A/B

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/2991/>). Вариантът е една от познатите “ромски” мутации, асоциирани със заболяването.



Фигура 48 Мутация в гена *AP1S2*: chrX: g.15864056A>T, NM_003916.3:c.258T>A, NP_003907.3:p.Tyr86Ter при пациент 38

- **Вероятно патологичен вариант *IDS* p.Pro408Ser**

Вариантът е установен при пациент 37 в хемизиготно състояние. На фигура 49 е представен екзон 9 на гена *IDS*. Замененият нуклеотид е маркиран.

Генът *IDS* кодира ензима идуронат 2-сулфатаза (ЕО 3.1.6.13), който участва в разграждането на гликозаминогликаните хепаран-сулфат и дерматан-сулфат (Bielicki, 1990) в лизозомите. Мутацията се характеризира със замяна на гуанин с аденин в позиция 148564708 на X-хромозомата и води до промяна в аминокиселинната последователност на белтъчния продукт на гена *IDS* (замяна на пролин със серин в екзон 9). Вариантът не е съобщаван досега в литературата и не е наблюдаван при нито един от индивидите, изследвани по проекта NHLBI Exome Sequencing Project (ESP).



Фигура 49 Мутация в гена *IDS*: chrX: g.148564708G>A, NM_000202.5:c.1222C>T, NP_000193.1:p.Pro408Ser при пациент 37

При всички бозайници (с изключение на птицевовка), за които има данни, на тази позиция в полипептидната верига на ензима присъства пролин. Въз основа на софтуерна предикция (MetaSVM Pred) на ефекта може да се очаква, че мутацията нарушава функцията на протеина.

Патологичните мутации в гена *IDS* са причина за X-свързана рецесивна форма на мукополизахаридоза и се проявяват фенотипно при хемизиготи като синдром на Hunter (Mucopolysaccharidosis II). Заболяването се характеризира с макроцефалия, груби черти на лицето, помътняване на корнеята, нисък ръст, мултиплена дизостоза, хепатоспленомегалия, рецидивиращи инфекции (отити, пневмонии), задръжка в невропсихичното развитие, флексиионни контрактури на крайниците. Заболяването е прогресивно, отлагането на мукополизахариди води до развитие на сърдечна недостатъчност и при тежките форми болните загиват преди 15 годишна възраст. При лабораторни изследвания се установява повишено излъчване на мукополизахариди в урината и намалена активност на идуронатсулфатаза в левкоцити и кожни фибробласти. При пациент №37 началото на заболяването е от раждането и симптомите включват изоставане в нервно-психическото развитие, изоставане във физическото развитие (на 6-

годишна възраст - тегло 7600 г и ръст 85 см), шийна хипотония, спастична квадрипареза, генерализирана хипертрихоза, дисморфизъм (мегацефална конфигурация на черепа, диспластични уши, високо небце) и рецидивиращи пневмонии. Образното изследване на ЦНС с МРТ е показало данни за исхемична енцефалопатия. Изследване на аминокиселини и ацилкарнитини в кръв е показало нормален резултат. Детето е починало. Не е провеждано изследване на мукополизахариди в урина, което не даде възможност да проверим хипотезата за наличие на мукополизахаридоза.

При същия пациент е установено носителство в хетерозиготно състояние на патологични мутации в други гени:

- а) *ARSA* (arylsulfatase A), p.Ile181Ser. Вариантът е наблюдаван при пациенти с Metachromatic leukodystrophy;
- б) *XPC* (Xeroderma pigmentosum, group C), p.Pro334His. Вариантът е установен при пациенти с Xeroderma pigmentosum, group C).

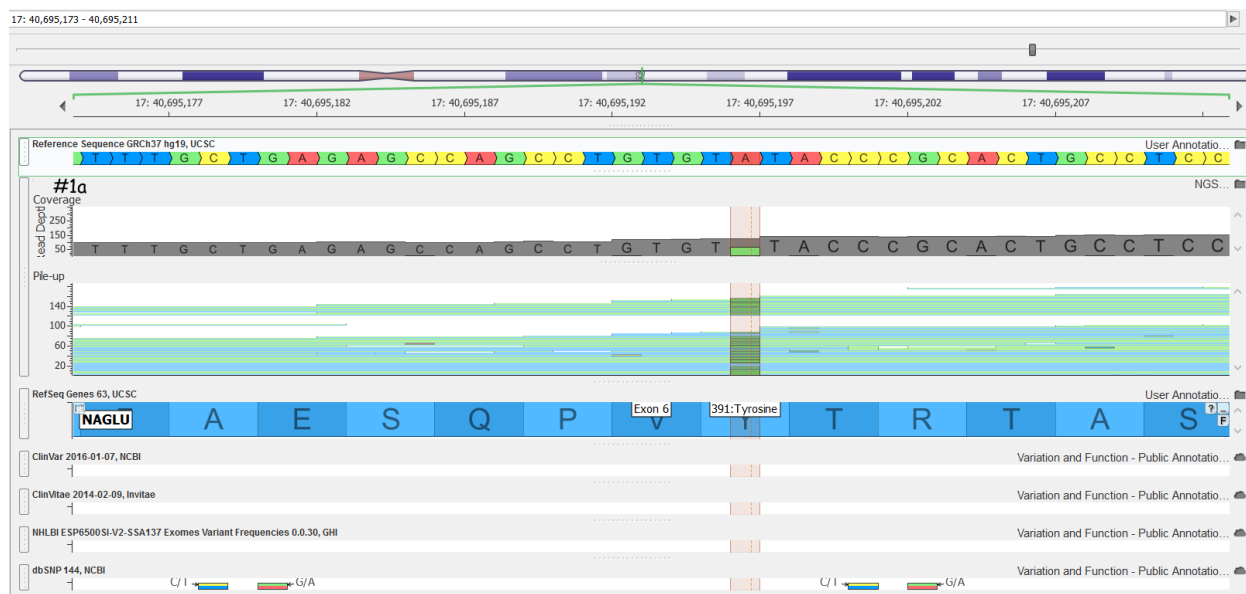
При останалите четирима пациенти с клиника на спастична квадриплегия и епилепсия (пациенти 39, 40, 41 и 42) не бяха установени известни патологични мутации в изследваните гени, които да обясняват наблюдаваните клинични симптоми.

4.4.3. Обсъждане на патологични и вероятно патологични варианти, установени при здрави родственици на болни с редки болести

- **Вероятно патологичен вариант *NAGLU* p.Tyr 391 Cys**

Изследваното лице е клинично здрава жена на 32 години, от български етнически произход, бременна за първи път. Повод да бъде изследвана за носителство на мутации, свързани с метаболитни заболявания, беше фамилната анамнеза: жената е имала сестра починала от мукополизахаридоза тип IIIB (Sanfilippo B).

При анализа е установена мутация в гена *NAGLU* (N-Acetylglucosaminidase, Alpha) в хетерозиготно състояние. Мутацията представлява замяна на аденин (A) с гуанин (G) в позиция 40695196 на 17-та хромозома, която води до замяна на тирозин (Tyr) с цистеин (Cys) в позиция 391 на белтъчния продукт на гена *NAGLU*.



Фигура 50 Мутация в гена *NAGLU*: p.Tyr 391 Cys

Мутацията е в хетерозиготно състояние и не е регистрирана досега. Вариантът е вероятно патологичен: аминокиселинната замяна засяга консервативна позиция и е разположена в една от осемте α -спирали, изграждащи характерния за ензима TIM barrel домен. Дефекти в гена *NAGLU*, кодиращ ензима α -N-ацетилглюкозаминидаза, са причината за заболяването мукополизахаридоза тип III B (Sanfilippo B) (<http://omim.org/entry/609701>;

<http://omim.org/entry/252920>). На фигура 50 е представен участъкът от екзон 6 на гена NAGLU. Замененият нуклеотид е маркиран.

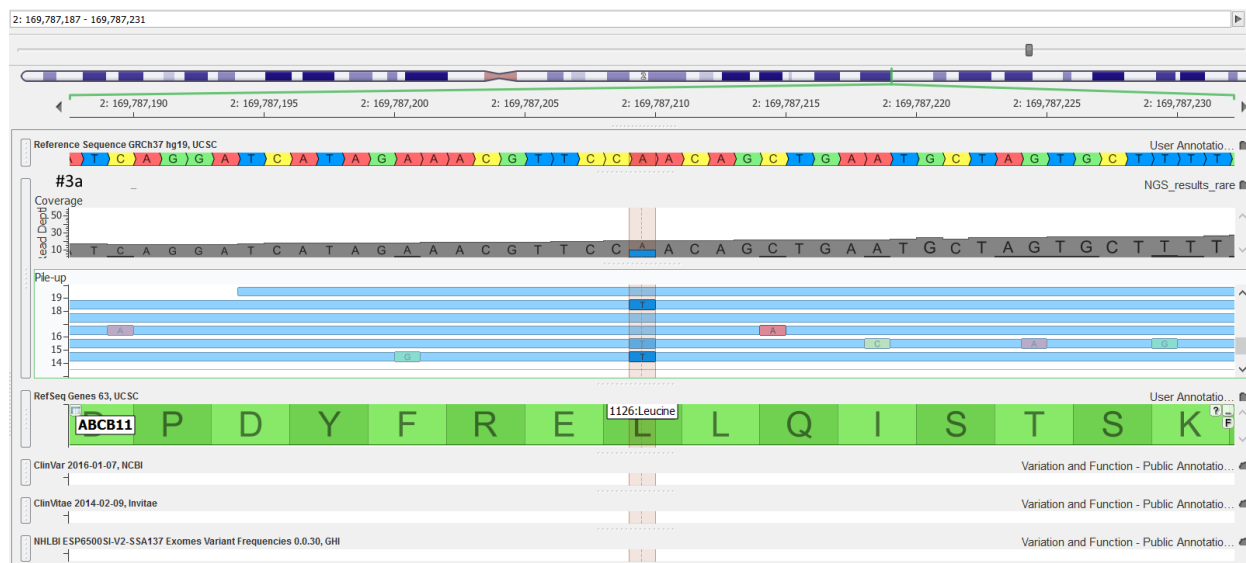
- **Патологичен вариант *ABCB11 p.Leu1126Ter***

Вариантът е установен в хетерозиготно състояние при здравия баща (3а) на дете, починало от прогресивна интрахепатална холестаза. Семейството е от български етнически произход. Родителите (2а и 3а) са млади, здрави, фамилно необременени за метаболитни заболявания. Индексният пациент е момче, родено от първа бременност, чрез цезарово сечение, с тегло 4300 г и ръст 53 см. Неонаталният период протекъл гладко. Детето е кърмено през първия месец. Заболяването се изявило на 43-дневна възраст, когато детето станало неспокойно, било бледо, имало две обилни повръщания. Детето било хоспитализирано, първоначално в инфекциозна болница, впоследствие в детската клиника по гастроентерология на СБАЛДБ. Установена била хепатомегалия, впоследствие и спленомегалия, изразен иктер. При проведените лабораторни изследвания са установени анемия, тромбоцитоза (в крайния стадий - тромбоцитопения), повишени стойности на билибрубин, повишени чернодробни трансаминази (ASAT – 178 - 480 IU/l; ALAT – 118 – 496 IU/l) и LDH, нормални стойности на GGTP, повишени нива на жлъчни киселини в серум (>200 $\mu\text{mol/l}$). Изследванията за инфекциозен хепатит са показали негативен резултат (CMV, HSV, HIV, Lues, HAV, HBV, HCV, ParvoB19). Изследванията за алфа1-антитрипсинов дефицит, галактоземия и муковисцидоза са показали нормални резултати. Заболяването прогресирало до чернодробна цироза и детето починало на 3 годишна възраст. Проведено е генетично изследване на пробанда в чужбина за търсене на мутации в гена *ATP8B1* – също с негативен резултат.

Заболяването фамилна прогресивна интрахепатална холестаза (PFIC) се дължи на дефекти в транспорта на жлъчните киселини. В зависимост от генетичния дефект се различават четири типа: тип 1 (PFIC1) – с мутации в гена *ATP8B1* (*ATPase, class I, type 8B, member 1*, <http://www.omim.org/entry/602397>), тип 2 (PFIC2) – с мутации в *ABCB11* (*ATP-binding cassette, subfamily B, member 11*, <http://www.omim.org/entry/603201>), тип 3 (PFIC3) – с мутации в *ABCB4* (*ATP-binding cassette, subfamily B, member 4*, <http://www.omim.org/entry/171060>) и тип 4 (PFIC4) – с мутации в *TJP2* (*Tight junction protein 2*, <http://www.omim.org/entry/607709>). И четирите типа се унаследяват автозомно

рецесивно. PFIC1 и PFIC2 са свързани с леко завишени или нормални серумни нива на GGTP, докато PFIC3 се свързва с високи нива на серумната GGTP и чернодробната хистология се характеризира с портално възпаление и дуктална пролиферация в ранен стадий на заболяването (Maggiore G et al, 1987, 1991). PFIC4 е свързана с нормално или леко повишени нива на GGTP (Sambrotta et al., 2014). Фенотипно сходни с фамилната прогресивна интрахепатална холестаза са вродените дефекти в синтеза на жлъчни киселини. Вродените дефекти в синтеза на жлъчни киселини са автозомни рецесивни заболявания, характеризиращи се с неонатална презентация на прогресивно чернодробно заболяване, с холестатична жълтеница и малабсорбция на масти и мастно-разтворими витамини в стомашно-чревния тракт в резултат от първичната недостатъчност в синтеза на жлъчни киселини. Засегнатите деца имат задръжка в развитието и вторична коагулопатия. Повечето пациенти се повлияват добре от орална терапия с жлъчни киселини.

Изследванията при родителите на починалото дете бяха извършени чрез секвениране с генния панел TruSight One. В резултат на анализа при 3а беше установен патологичен вариант в гена *ABCB11* в хетерозиготно състояние. *ABCB11* протеинът, познат още като BSEP (Bile salt export pump, помпа за експорт на жлъчни соли), има структура сходна с тази на другите членове на MDR фамилията – два трансмембранни домена (с по 6 трансмембранни участъка) и два цитоплазмични ABC-транспортни домена. Вариантът при 3а представлява замяна на аденин с тимин в позиция 169787209 на 2-ра хромозома. Трансверзията засяга последователността на 25-ти екзон на гена *ABCB11* и по предикция води до замяна на кодон 1126 (кодиращ левцин) със стоп-кодон. Вариантът не е съобщаван досега и не е публикуван в специализираните бази данни. Естеството на мутацията предполага, че вариантът е патологичен. На фигура 51 е показан вариантът в 25-ти екзон на *ABCB11*.



Фигура 51 Мутация *ABCB11* p.Leu1126Ter при 3a.

Таблица 24 Сегрегация на вариантите в гена *ABCB11* при членовете на семейство с прогресивна интрахепатална холестаза.

Ген	Вариант	Клинична значимост	Генотип		
			F	2a	3a
<i>ABCB11</i>	Chr2: g.169787209A>A/T, NM_003742.2:c.3377T>A, NP_003733.2:p.Leu1126Ter	Патологичен вариант	-	-	хет
	rs2287618	Инtronен вариант, полиморфен	хет	хом	хет
	rs2287620	Инtronен вариант, полиморфен	хет	хом	хет
	rs2287622, NM_003742.2:c.1331T>C, NP_003733.2:p.Val444Ala	Полиморфен вариант	хет	хом	-
	rs2287623	Инtronен вариант, полиморфен	хет	хом	-
	rs2241340	Инtronен вариант, полиморфен	хет	хом	-
	rs2241341	Инtronен вариант, полиморфен	хет	хом	-
	rs2193831	Инtronен вариант, полиморфен	хет	хом	-
	rs386652544	Инtronен вариант, полиморфен	хет	-	хет
	rs853772	Инtronен вариант, полиморфен	хет	-	хет
	rs853789	Инtronен вариант, полиморфен	хет	-	хет
	rs497692, NP_003733.2:p.Ala1028=	Синонимен полиморфен вариант	хет	-	хет
	rs579275	Инtronен вариант, полиморфен	хет	-	хет
	Chr2: g.169779896T>C, нов в 3'UTR	?	хет	-	хет

F – фетус; хет – хетерозигот; хом – хомозигот; --не носи варианта;

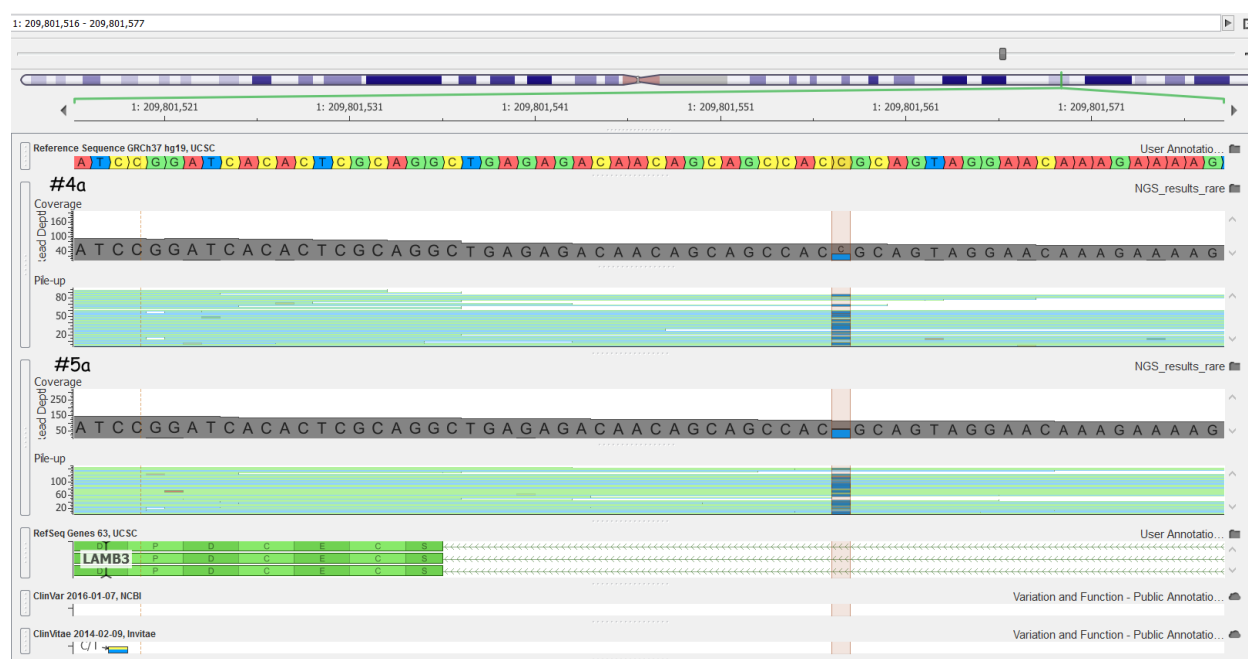
При родителите (2a и 3a) на детето с прогресивна интрахепатална холестаза не бяха установени известни патологични или вероятно патологични варианти в останалите гени

асоциирани с PFIC. При 2а не бяха установени патологични или вероятно патологични варианти в гена ABCB11, но всички налични полиморфни варианти в гена бяха представени в хомозиготно състояние (таблица 24). При някои пациенти с фенотип на PFIC2 е откриван само един мутантен алел в хетерозиготно състояние (Jansen PL et al, 1999; van Mil SWC et al, 2004). Тъй като заболяването е рецесивно допускаме, че вероятно вторият мутантен алел е голяма по размер екзонна / генна делеция, която не може да бъде потвърдена или отхвърлена категорично чрез ДНК секвениране. По време на изследването 2а и 3а очакваха второто си дете. Генетично изследване на плода с панела TruSight Inherited показва унаследяване на варианти в гена ABCB11, както с бащин, така и с майчин произход. Полиморфизмите, носени от майката (2а) в хомозиготно състояние и присъстващи при бащата (3а), бяха установени в хетерозиготно състояние при плода (F), което не противоречи на възможността 2а да е хетерозиготен носител на делеция обхващаща целия ген ABCB11 или значителна част от него.

- **Вероятно патологичен вариант *LAMB3* c.1133-22G>A**

Вариантът е установен в хетерозиготно състояние при двамата здрави родители (4а и 5а) на дете, починало от булозна епидермолиза. Семейството е от ромски етнически произход. Родителите са млади, здрави, не съобщават за кръвно родство. Детето, засегнато от булозна епидермолиза, е момиче, родено от първа нормално протекла бременност, с нормални ръст и тегло при раждането. Още при раждането са установени кожни лезии подобни на охлузвания по пръстите на ръцете, около пъпния остатък, зад ушите и по капилицума. В следващите дни се появило множество були (предимно в местата на триене), в началото дребни, а в последствие с диаметър 3-4 см, халтави с прозрачно съдържимо. При спукване се образували крусти. Промени са наблюдавани и по лигавиците – плътни бели налепи и плаки, които лесно кървяли при допир. В резултат на лезиите и последвалите некрози част от ноктите опадали. Извършено е имунохистохимично изследване на кожна биопсия, което потвърдило диагнозата булозна епидермолиза тип Herlitz. При анализа е била установена липса на ламинин 332 (ламинин 5), намалено количество плектин, колаген 17 и $\alpha 6\beta 4$ интегрин. Въз основа на данните от хистохимичния анализ е препоръчан ДНК анализ за търсене на мутации в гените *LAMB3*, *LAMA3* и *LAMC2*. Детето е починало на тримесечна възраст от усложнения свързани с

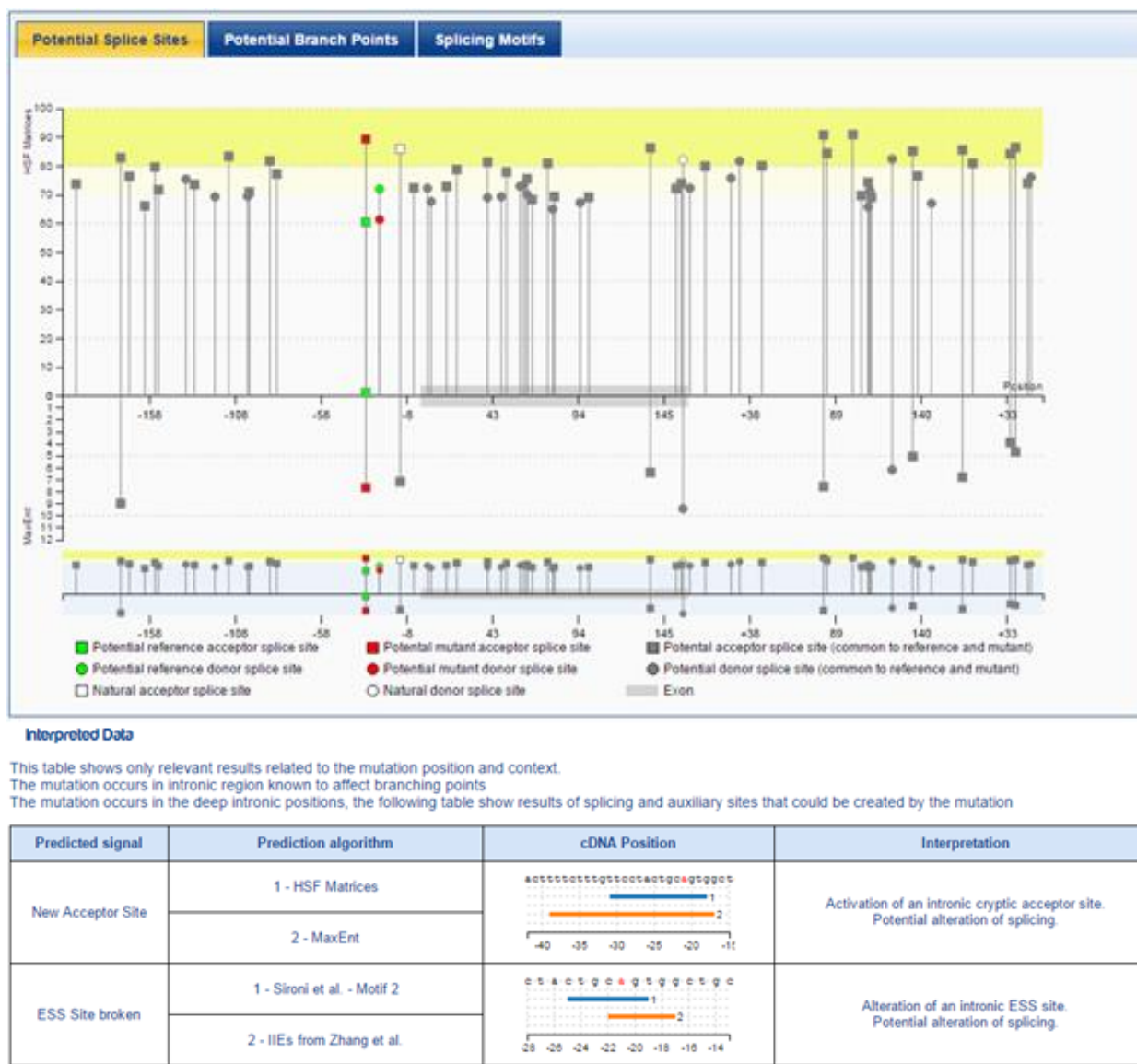
основното заболяване и ДНК анализ не е правен. Булозната епидермолиза с дефект в адхезията (включително тип Herlitz) може да се дължи на дефекти в няколко различни гена: трите, кодиращи субединиците на ламинин 5 (*LAMB3*, *LAMA3* и *LAMC2*), колаген 17 (*COL17A1*), интегрин $\alpha 6$ (*ITGA6*) или интегрин $\beta 4$ (*ITGB4*). Леталната форма на епидермолизис булоза най-често с дължи на трукниращи мутации в гена *LAMB3* (Nakano, A et al, 2000). Изследването на двамата родители с панела TruSight Inherited diseases не установи наличие на известни патологични мутации в гените *LAMB3*, *LAMA3* и *LAMC2*, нито в други гени, асоциирани с рецесивни форми на булозна епидермолиза (*COL7A1*, *COL17A1*, *PLEC1*, *ITGA6*, *ITGB4* и *DSP*). При анализа установихме и при двамата родители носителство в хетерозиготно състояние на нов неописван досега интронен вариант в гена *LAMB3*: g.209801557C>T (NM_001017402.1:c.1133-22G>A), замяна на цитозин с тимидин в позиция 209801557 на 1-ва хромозома (фигура 52).



Фигура 52 На фигурата е представена границата на екзон 10 и интрон 9 при пациенти 4а и 5а. Замененият нуклеотид е маркиран.

Вариантът е интронен и отстои на 22 бази от 10-ти екзон. За предикция на ефекта от нуклеотидната замяна ползвахме онлайн приложение Human Splicing Finder (HSF3.0; <http://www.umd.be/HSF/>; Desmet FO et al, 2009). Според предиктора замяната създава потенциално ново акцепторно сплайс място (фигура 53). При използване на новото алтернативно сплайс-място 10-ти екзон би се удължил с 20 нуклеотида, което би довело

до изместване на рамката на четене и генериране на стоп-кодон след 24 кодона в новата рамка на четене.



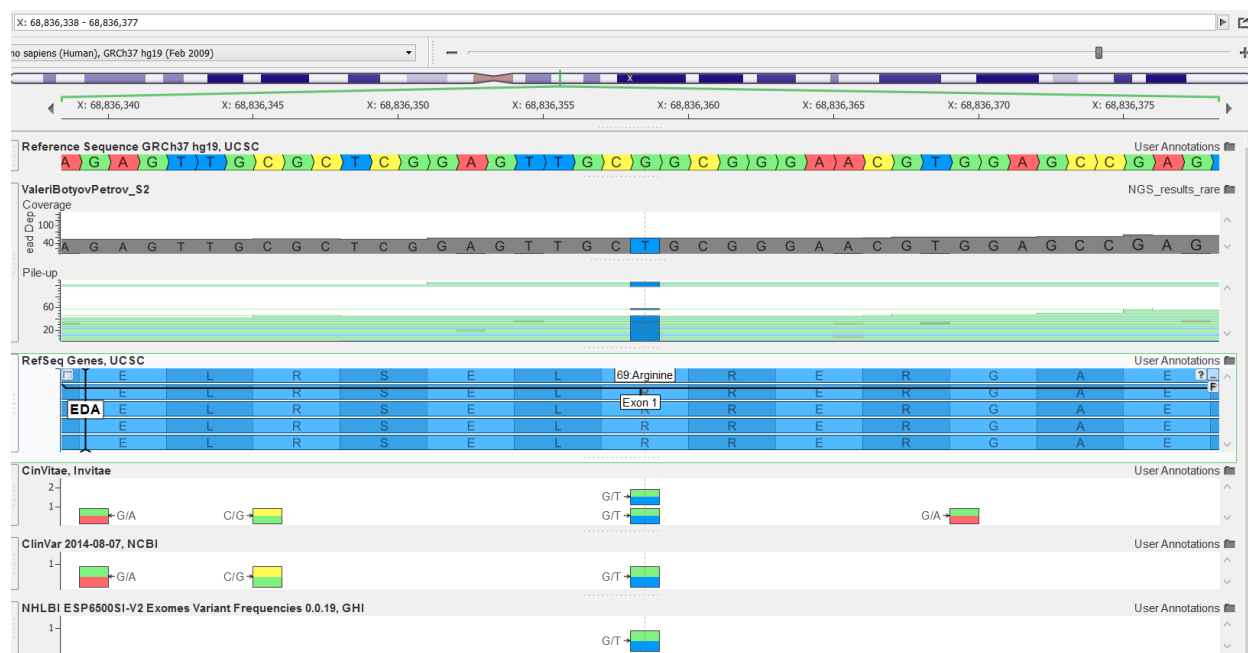
Фигура 53. На фигурата е представен в графичен и в табличен вид резултата от предикцията с HSF3.0. С червено квадратче е означено „новото“ акцепторно сплайс-място, а с бяло квадратче естественото акцепторно сплайс-място.

При изследването на 4а и 5а установихме и носителство на известни патологични мутации в други гени. При 4а се установи носителство в хетерозиготно състояние на известна патологична мутация в гена за конексин 26: *GJB2*: c.109G>A, p.Val37Ile, rs72474224. Вариантът е една от честите мутации наблюдавани при пациенти с невросензорна глухота.

Честотата на варианта сред европейци се оценява на около 0.00186 (<http://www.omim.org/entry/121011>; Bason, L et al, 2002; Huculak C et al, 2006).

cDNA Position	Splice site type	Motif	New splice site	Wild Type	Mutant	If cryptic site use, exon length variation	Variation (%)
-32	Acceptor	ttcctactgcgggtg	ttcctactgcagTG	60.46	89.4	+20	New site +47.87
-12	Natural Acceptor	gttgctctcagCC	gttgctctcagCC	85.92	85.92	0	0
154	Natural Donor	ACCgtgagt	ACCgtgagt	82.12	82.12	165	0

Таблица 25 В таблицата са представени резултатите от предикцията с HSF3.0 на ефекта от мутацията в интрон 9 на гена *LAMB3*. За сравнение са показани и данните за нормалните сплайс-акцепторно и сплайс-донорно място на 10-ти екзон. Според предикцията новото акцепторно сплайс-място би било също толкова ефективно, колкото обичайното.

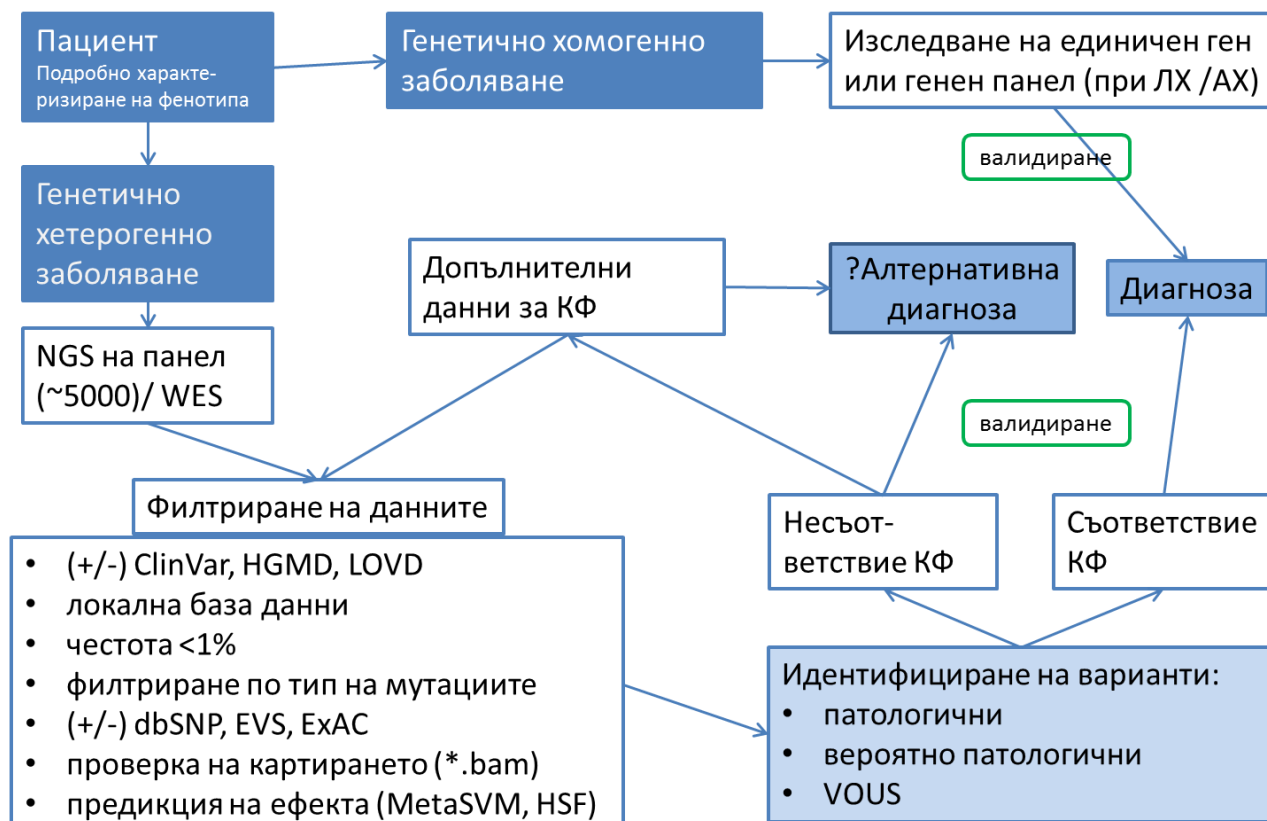


Фигура 54 На фигурата е представен участъкът от екзон 1 на гена *EDA* при пациент №5а. Замененият нуклеотид е маркиран.

При 5а се установи наличие на мутация в гена за ектодисплазин А, в хемизиготно състояние: *EDA*: c.206G>T, p.Arg69Leu, rs132630309 (фигура 54). Вариантът е известен, но данните за клиничното му значение са противоречиви. Съобщаван е като „патологичен“ и като „вариант с неизвестно значение“ при пациенти с X-свързана форма на ектодермална

дисплазия (Kere, J. et al, 1996). Генът *EDA* кодира белтъка ектодисплазин А, който е мембранен протеин и принадлежи към фамилията на тумор- некротизиращия фактор. Патологичните мутации в гена *EDA* са причина за Х-свързана рецесивна форма на хипохидротична ектодермална дисплазия. Проявите на заболяването могат да варират от селективна хипоплазия / аплазия на кучешките зъби до изразено нарушение в развитието на ектодермалните органи (косми, нокти, зъби, потни жлези) (<http://omim.org/entry/300451>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV000011779>);. 5a е мъж на 29 години с нормално развити ектодермални органи (косми, нокти, зъби и потни жлези). Нормалният фенотип на 5a и отсъствието на фенотипни прояви на ектодермална дисплазия показват, че вероятно мутацията е рядък бенигнен вариант. Това ни даде основание в собствената база данни вариантът да бъде анотиран като вероятно бенигнен.

4.5. Алгоритъм за прилагане на NGS при пациенти с редки моногенни болести



Фигура 55. Алгоритъм за прилагане на NGS при пациенти с редки болести

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Към днешна дата броят на известните моногенни заболявания се оценява на около 7000 отделни нозологични единици и всяка от тях се счита за рядка. Съвкупната им честота обаче е значима и на тях се дължат до 25% от хоспитализациите в детска възраст (Costa T et al, 1985). Като цяло, редките генетични болести засягат значителен брой хора и оказват голямо влияние върху системата на здравеопазването.

Изясняването на генетичните основи на редките менделиращи заболявания е трудно и по-голямата част от пациентите остават недиагностицирани въпреки обстойните изследвания (клинични, лабораторни, образни). Конвенционалният диагностичен процес, използван от повечето специалисти по клинична / медицинска генетика започва с разпознаване на

конкретни фенотипни характеристики и обикновено е свързан с поредица лабораторни изследвания, чийто избор зависи от предходни изследвания, които са се оказали неинформативни. Скорошно ретроспективно проучване показва, че по-малко от половината пациенти насочени за генетична диагностика, с клинични и фамилни данни съответстващи на заболяване с генетична етиология, достигат до конкретна диагноза (Shashi V et al, 2014). Цялостното екзомно/геномно секвениране става все по-достъпно и вече се предлага и за диагностични цели. Независимо, че NGS на екзом / геном има потенциала да промени диагностичната парадигма в медицинската генетика, предстои да се изясни кои пациенти биха имали полза от подобен тест и на какъв етап от клиничното им проследяване. По литературни данни диагностичният добив при прилагане на екзомно секвениране за изследване на пациенти с неизвестна диагноза е между 25 и 50% (Yang Y et al, 2013; Need AC et al, 2012). При нашето проучване установихме еднозначна генетична причина, асоциирана с водещите клинични прояви при 48% от всички изследвани пациенти (21 от 43 изследвани), като този дял е по-малък сред пациентите с „неизвестна“ диагноза – 38% (10 от 26 изследвани). При четирима пациенти с категорична патологична находка и генотип, предполагащ фенотипна изява на заболяване, генетичната диагноза се различава от работната клинична, което показва потенциала на NGS технологията да ни отведе до алтернативна генетична диагноза. При двама пациенти с неизвестна диагноза бяха установени известни патологични генни варианти, които само частично обясняват проявения фенотип, а при един пациент беше установено едновременно наличие на патологични варианти в гени, асоциирани с три различни моногенни заболявания и генотип, предполагащ фенотипна изява и на трите състояния. Тези примери показват, че дори и при пациентите с моногенни заболявания фенотипът е комплексен и се определя не само от патологичен алел/и в единичен ген, а от цялостния генотип - вариантите на множество други гени, и факторите на средата.

Независимо, че при прилагане на масивно паралелно секвениране се генерира огромен обем данни във вид на ДНК последователности, методът понастоящем е неприложим за разкриване на тринуклеотидни експанзии и не се ползва рутинно за установяване на генни /екзонни делеции и дупликации. Тези особености на технологията изискват прецизен клиничен подбор на пациентите и познаване на мутационния спектър на конкретното заболяване/група заболявания. Подобно на анализа на данните от микрочипов анализ, при

анализа на данните от NGS е удачно прилагането на подхода „обратно фенотипизиране“ – идентифициране на патологични генни варианти и последващо сравняване на фенотипа на пациента, с очаквания при носителство на конкретния патологичен вариант. Важна предпоставка за успешно внедряване на NGS технологията в клиничната практика е наличието на бази данни, съдържащи коректна информация за асоциацията на генетичните варианти с конкретни фенотипни белези. В хода на изследванията на пациентите с редки болести поставихме основите на такава локална база данни, съдържаща информация за конкретни генни варианти и асоциирани с тях фенотипи.

Нашето проучване показва диагностичен добив сходен с данните в литературата. Работата ни имаше пряк положителен ефект и даде възможност в пет семейства с рискови бременности да бъде осъществена пренатална диагностика на редки моногенни болести.

NGS анализът на панели, включващи множество гени има своето място като диагностичен метод за изследване на пациентите с редки моногенни заболявания, но все още секвенирането по Сангер е „златен стандарт“ и клиничното приложение изисква верифициране на установените варианти.

В бъдеще възнамеряваме да продължим изследванията в няколко насоки:

- Да допълним секвенционния анализ с функционален в моделни микроорганизми или клетъчни линии, което би дало информация за възможния фенотипен ефект на варианти, които сега класираме като „вероятно патологични“ или „с неизвестно значение“.
- Да се включим в „лова“ на гени, прилагайки екзомно секвениране при пациентите останали с неизвестна диагноза.
- Да продължим да попълваме базата данни на анотирани редки варианти с информация за нашата популация.

5. ИЗВОДИ

1. Установи се сходство на броя и типа на генните варианти при изследване на здрави и болни индивиди с еднакъв генен панел, включващ 4813 гени.
2. Установи се, че 4-5% от вариантите наблюдавани при здрави/болни индивиди са с популационна честота под 1%.
3. Установи се, че при изследване с панел от 4813 гени изследваните здрави индивиди носят средно 3-4 известни патологични варианти.
4. Открити са 8 нови патологични мутации, асоциирани с клиничния фенотип при пациенти с редки моногенни заболявания:
 - *ABCB11*: g.169787209A>T, c.3377T>A, p.Leu1126Ter
 - *AP1S2*: c.258T>A, p.Tyr86Ter
 - *COL1A1*: c.2775delT, p.Gly926ValfsTer182
 - *DMD*: g.31986568C>A, c.6502G>T, p.Glu2168Ter
 - *NAGLU*: p.Tyr391Cys
 - *NPC1*: c.3127A>G, p.Thr1043Ala
 - *PHKG2*: p.Leu160del
 - *RPS6KA3*: c.913C>T, p.Arg305Ter
5. Прилагането на секвениране от ново поколение с ползване на панел от 4813 гени има потенциала да установи генетичен дефект, асоцииран с фенотипа при около 48% от пациентите с редки моногенни болести.
6. Най-голям шанс за поставяне на генетична диагноза имат пациентите със строго специфичен фенотип на заболявания без / с ограничена локусна хетерогенност.

6. ПРИНОСИ

Приноси с научна стойност

1. Открити са нови варианти свързани с патологичен фенотип.
2. Съставена е собствена база данни с анотирани варианти категоризирани според очаквания фенотипен ефект.

Приноси с приложен характер

1. За първи път у нас са характеризирани варианти при пациенти с редки болести чрез секвениране от ново поколение.
2. Оптимизиран е лабораторният протокол за работа с различни генни панели
3. Разработен е подход за анализ на данни от секвениране от ново поколение.

Web-базирани източници и софтуерни приложения

1. <http://www.orpha.net/>
2. <http://www.omim.org/>
3. <http://www.illumina.com/>
4. <http://goldenhelix.com/GenomeBrowse/>
5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
6. <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>
7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>
8. <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>
9. <http://exac.broadinstitute.org/>
10. <http://www.uniprot.org/>
11. <http://www.umd.be/HSF3/>

Литература

1. Abel A, Fonknechten N, Hofer A, Dürr A, Cruaud C, Voit T, Weissenbach J, Brice A, Klimpe S, Auburger G, Hazan J. Early onset autosomal dominant spastic paraplegia caused by novel mutations in SPG3A. *Neurogenetics*. 2004;5:239–243.
2. Abou Jamra R, Philippe O, Raas-Rothschild A, Eck SH, Graf E, Buchert R, Borck G, Ekici A, Brockschmidt FF, Nöthen MM, Munnich A, Strom TM, Reis A, Colleaux L. Adaptor protein complex 4 deficiency causes severe autosomal-recessive intellectual disability, progressive spastic paraplegia, shy character, and short stature. *Am J Hum Genet*. 2011;88:788–795.
3. Adessi C, Matton G, Ayala G et al. Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: E87.
4. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*. 2013 Jan;Chapter 7:Unit7.20. doi: 10.1002/0471142905.hg0720s76.
5. Adzhubei Ivan A., Steffen Schmidt, Leonid Peshkin, Vasily E. Ramensky, Anna Gerasimova, Peer Bork, Alexey S. Kondrashov, and Shamil R. Sunyaev. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. Apr 2010; 7(4): 248–249
6. Alazami AM, Adly N, Al Dhalaan H, Alkuraya FS. A nullimorphic ERLIN2 mutation defines a complicated hereditary spastic paraplegia locus (SPG18). *Neurogenetics*. 2011;12:333–336.
7. Albash B, Imtiaz F, Al-Zaidan H, Al-Manea H, Banemai M, Allam R, Al-Suheel A, Al-Owain M. Novel PHKG2 mutation causing GSD IX with prominent liver disease: report of three cases and review of literature. *Eur J Pediatr*. 2014 May;173(5):647-53. doi: 10.1007/s00431-013-2223-0. Epub 2013 Dec 11.
8. Allan W, Herndon CN, Dudley FC. Some examples of the inheritance of mental deficiency: apparently sex-linked idiocy and microcephaly. *Am J Ment Defic*. 1944;48:325–334.
9. Al-Saif A, Bohlega S, Al-Mohanna F. Loss of ERLIN2 function leads to juvenile primary lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2012;72:510–516.
10. Al-Yahyaee S, Al-Gazali LI, De Jonghe P, Al-Barwany H, Al-Kindi M, De Vriendt E, Chand P, Koul R, Jacob PC, Gururaj A, Sztriha L, Parrado A, Van Broeckhoven C, Bayoumi RA. A novel locus for hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum and epilepsy. *Neurology*. 2006;66:1230–1234.
11. Amiel J, Rio M, de Pontual L et al. Mutations in TCF4, encoding a class I basic helix-loop-helix transcription factor, are responsible for Pitt-Hopkins syndrome, a severe epileptic encephalopathy associated with autonomic dysfunction. *Am J Hum Genet* 2007; 80: 988-993
12. Ana Rath, Ségolène Aymé, Bertrand Bellet; Classification of rare diseases: a worldwide effort to contribute to the International Classification of Diseases; Orphanet J Rare Dis. 2010; 5(Suppl 1): O21., Published online Oct 19, 2010. doi: 10.1186/1750-1172
13. Antonicka H, Ostergaard E, Sasarman F, Weraarpachai W, Wibrand F, Pedersen AM, Rodenburg RJ, van der Knaap MS, Smeitink JA, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Shoubridge EA. Mutations in C12orf65 in patients with encephalomyopathy and a mitochondrial translation defect. *Am J Hum Genet*. 2010;87:115–122.
14. Antoniou AC, et al. The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancer. *Br J Cancer* 2004; 91: 1580-1590
15. Audrezet, M.-P., Chen, J.-M., Raguene, O., Chuzhanova, N., Giteau, K., Le Marechal, C., Quere, I., Cooper, D. N., Ferec, C. Genomic rearrangements in the CFTR gene: extensive allelic heterogeneity and diverse mutational mechanisms. *Hum. Mutat*. 23: 343-357, 2004.
16. Auer-Grumbach M, Schlotter-Weigel B, Lochmüller H, Strobl-Wildemann G, Auer-Grumbach P, Fischer R, Offenbacher H, Zwick EB, Robl T, Hartl G, Hartung HP, Wagner K, Windpassinger C. Austrian Peripheral Neuropathy Study Group.; Phenotypes of the N88S Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 mutation. *Ann Neurol*. 2005;57:415–424.

17. Bacchelli Elena, Fabiola Ceroni, Dalila Pinto, Silvia Lomartire, Maila Giannandrea, Patrizia D'Adamo, Elena Bonora, Piero Parchi, Raffaella Tancredi, Agatino Battaglia and Elena Maestrini. A CTNNA3 compound heterozygous deletion implicates a role for α T-catenin in susceptibility to autism spectrum disorder. *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 2014, 6:17; <http://www.jneurodevdisorders.com/content/6/1/17>
18. Backx L, Van Esch H, Melotte C et al. Array painting using microdissected chromosomes to map chromosomal breakpoints. *Cytogenet Genome Res* 2007; 116: 158-166.
19. Bailey JA, Yavor AM, Massa HF, Trask BJ and Eichler EE. Segmental duplications: organization and impact within the current human genome project assembly. *Genome Res* 2001; 11: 1005-1017.
20. Bali, D. S., Goldstein, J. L., Fredrickson, K., Rehder, C., Boney, A., Austin, S., Weinstein, D. A., Lutz, R., Boneh, A., Kishnani, P. S. Variability of disease spectrum in children with liver phosphorylase kinase deficiency caused by mutations in the PHKG2 gene. *Molec. Genet. Metab.* 111: 309-313, 2014.;
21. Ballif, B. C., Hornor, S. A., Jenkins, E., Madan-Khetarpal, S., Surti, U., Jackson, K. E., Asamoah, A., Brock, P. L., Gowans, G. C., Conway, R. L., Graham, J. M., Jr., Medne, L., Zackai, E. H., Shaikh, T. H., Geoghegan, J., Selzer, R. R., Eis, P. S., Bejjani, B. A., Shaffer, L. G. Discovery of a previously unrecognized microdeletion syndrome of 16p11.2-p12.2. *Nature Genet.* 39: 1071-1073, 2007.
22. Bao L., Cui Y. nsSNPAnalyzer: identifying disease-associated nonsynonymous single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research* (2005) 33 W480-W482.
23. Bason, L., Dudley, T., Lewis, K., Shah, U., Potsic, W., Ferraris, A., Fortina, P., Rappaport, E., Krantz, I. D. Homozygosity for the V37I connexin 26 mutation in three unrelated children with sensorineural hearing loss. *Clin. Genet.* 61: 459-464, 2002.;
24. Becker, P. E. Myotonia Congenita and Syndromes associated with Myotonia: Clinical-Genetic Studies of the Nondystrophic Myotonias. Stuttgart: Georg Thieme (pub.) 1977.;
25. Beetz C, Schüle R, Deconinck T, Tran-Viet KN, Zhu H, Kremer BP, Frants SG, van Zelst-Stams WA, Byrne P, Otto S, Nygren AO, Baets J, Smets K, Ceulemans B, Dan B, Nagan N, Kassubek J, Klimpe S, Klopstock T, Stolze H, Smeets HJ, Schrander-Stumpel CT, Hutchinson M, van de Warrenburg BP, Braastad C, Deufel T, Pericak-Vance M, Schöls L, de Jonghe P, Züchner S. REEP1 mutation spectrum and genotype/phenotype correlation in hereditary spastic paraplegia type 31. *Brain.* 2008;131:1078–1086.
26. Behan W, Maia M. Strumpell's familial spastic paraplegia: genetics and neuropathology. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1974;37:8–20.
27. Bendl J, Stourac J, Salanda O, Pavelka A, Wieben ED, Zendulka J, Brezovsky J, Damborsky J. PredictSNP: robust and accurate consensus classifier for prediction of disease-related mutations. *PLoS Comput Biol.* 2014 Jan;10(1):e1003440. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003440. Epub 2014 Jan 16.
28. Ben-Shachar, S., Ou, Z., Shaw, C. A., Belmont, J. W., Patel, M. S., Hummel, M., Amato, S., Tartaglia, N., Berg, J., Sutton, V. R., Lalani, S. R., Chinault, A. C., Cheung, S. W., Lupski, J. R., Patel, A. 22q11.2 distal deletion: a recurrent genomic disorder distinct from DiGeorge syndrome and velocardiofacial syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 82: 214-221, 2008.
29. Bialas, N. J., Inglis, P. N., Li, C., Robinson, J. F., Parker, J. D. K., Healey, M. P., Davis, E. E., Inglis, C. D., Toivonen, T., Cottell, D. C., Blacque, O. E., Quarmby, L. M., Katsanis, N., Leroux, M. R. Functional interactions between the ciliopathy-associated Meckel syndrome 1 (MKS1) protein and two novel MKS1-related (MKSR) proteins. *J. Cell Sci.* 122: 611-624, 2009.
30. Bialer MG, Lawrence L, Stevenson RE, Silverberg G, Williams MK, Arena JF, Lubs HA, Schwartz CE. Allan-Herndon-Dudley syndrome: clinical and linkage studies on a second family. *Am J Med Genet.* 1992;43:491–497.

31. Bian X, Klemm RW, Liu TY, Zhang M, Sun S, Sui X, Liu X, Rapoport TA, Hu J. Structures of the atlastin GTPase provide insight into homotypic fusion of endoplasmic reticulum membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:3976–3981.
32. Biancheri R, Ciccolella M, Rossi A, Tessa A, Cassandrini D, Minetti C, Santorelli FM. White matter lesions in spastic paraplegia with mutations in SPG5/CYP7B1. *Neuromuscul Disord*. 2009;19:62–65.
33. Bielicki J, Freeman C, Clements PR, Hopwood JJ. Human liver iduronate-2-sulphatase. Purification, characterization and catalytic properties. *Biochem J*. 1990 Oct 1;271(1):75–86.
34. Bien-Willner R, Sambuughin N, Holley H, Bodensteiner J, Sivakumar K. Childhood-onset spastic paraplegia with NIPA1 gene mutation. *J Child Neurol*. 2006;21:974–977.
35. Biswas S, et al. Assessing the added value of breast tumor markers in genetic risk prediction model BRCAPRO. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 133: 347-355
36. Blair MA, Riddle ME, Wells JF, Breviu BA, Hedera P. Infantile onset of hereditary spastic paraplegia poorly predicts the genotype. *Pediatr Neurol*. 2007;36:382–386.
37. Blumen SC, Bevan S, Abu-Mouch S, Negus D, Kahana M, Inzelberg R, Mazarib A, Mahamid A, Carasso RL, Slor H, Withers D, Nisipeanu P, Navon R, Reid E. A locus for complicated hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 1q24-q32. *Ann Neurol*. 2003;54:796–803.
38. Blumkin L, Lerman-Sagie T, Lev D, Yosovich K, Leshinsky-Silver E. A new locus (SPG47) maps to 1p13.2-1p12 in an Arabic family with complicated autosomal recessive hereditary spastic paraplegia and thin corpus callosum. *J Neurol Sci*. 2011;305:67–70.
39. Bouhouche A, Benomar A, Bouslam N, Chkili T, Yahyaoui M. Mutation in the epsilon subunit of the cytosolic chaperonin-containing t-complex peptide-1 (Cct5) gene causes autosomal recessive mutilating sensory neuropathy with spastic paraplegia. *J Med Genet*. 2006b;43:441–443.
40. Bouhouche A, Benomar A, Bouslam N, Ouazzani R, Chkili T, Yahyaoui M. Autosomal recessive mutilating sensory neuropathy with spastic paraplegia maps to chromosome 5p15.31-14.1. *Eur J Hum Genet*. 2006a;14:249–252.
41. Boukhris A, Feki I, Elleuch N, Miladi MI, Boland-Augé A, Truchetto J, Mundwiller E, Jezequel N, Zelenika D, Mhiri C, Brice A, Stevanin G. A new locus (SPG46) maps to 9p21.2-q21.12 in a Tunisian family with a complicated autosomal recessive hereditary spastic paraplegia with mental impairment and thin corpus callosum. *Neurogenetics*. 2010;11:441–448.
42. Bouslam N, Benomar A, Azzedine H, Bouhouche A, Namekawa M, Klebe S, Charon C, Durr A, Ruberg M, Brice A, Yahyaoui M, Stevanin G. Mapping of a new form of pure autosomal recessive spastic paraplegia (SPG28). *Ann Neurol*. 2005;57:567–571.
43. Boycott Kym M.,¹ Megan R. Vanstone,¹ Dennis E. Bulman¹, & Alex E. MacKenzie¹ Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. *Nature Reviews Genetics* 2013, 14, 681–691.
44. Bromberg Yana and Burkhard Rost. SNAP: predict effect of non-synonymous polymorphisms on function. *Nucleic Acids Res*. Jun 2007; 35(11): 3823–3835
45. Bross P, Naundrup S, Hansen J, Nielsen MN, Christensen JH, Kruhøffer M, Palmfeldt J, Corydon TJ, Gregersen N, Ang D, Georgopoulos C, Nielsen KL. The Hsp60-(p.V98I) mutation associated with hereditary spastic paraplegia SPG13 compromises chaperonin function both in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 2008;283:15694–15700.
46. Brunetti-Pierri, N., Berg, J. S., Scaglia, F., Belmont, J., Bacino, C. A., Sahoo, T., Lalani, S. R., Graham, B., Lee, B., Shinawi, M., Shen, J., Kang, S.-H. L., and 28 others. Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities. *Nature Genet*. 40: 1466-1471, 2008.
47. Bulman, D. E., Gangopadhyay, S. B., Bebchuck, K. G., Worton, R. G., Ray, P. N. Point mutation in the human dystrophin gene: identification through Western blot analysis. *Genomics* 1991, 10: 457-460.

48. Buzin, C. H., Feng, J., Yan, J., Scaringe, W., Liu, Q., den Dunnen, J., Mendell, J. R., Sommer, S. S. Mutations rates in the dystrophin gene: a hotspot of mutation at a CpG dinucleotide. *Hum. Mutat.* 2005, 25: 177-188.
49. Cacciagli P, Desvignes JP, Girard N, Delepine M, Zelenika D, Lathrop M, Lévy N, Ledbetter DH, Dobyns WB, Villard L. AP1S2 is mutated in X-linked Dandy-Walker malformation with intellectual disability, basal ganglia disease and seizures (Pettigrew syndrome). *Eur J Hum Genet.* 2014 Mar;22(3):363-8. doi: 10.1038/ejhg.2013.135. Epub 2013 Jun 12.
50. Cambi F, Tang XM, Cordray P, Fain PR, Keppen LD, Barker DF. Refined genetic mapping and proteolipid protein mutation analysis in X-linked pure hereditary spastic paraplegia. *Neurology.* 1996;46:1112–1117.
51. Campbell PJ, Stephens PJ, Pleasance ED et al. Identification of somatically acquired rearrangements in cancer using genome-wide massively parallel paired-end sequencing. *Nat Genet* 2008; 40: 722-729.
52. Capriotti E., R. Calabrese and R. Casadio. Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information. *Bioinformatics* 2006, 22(22), 2729–2734
53. Chance PF, Alderson MK, Leppig KA et al. DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Cell* 1993; 72: 143-151.
54. Charvin D, Cifuentes-Diaz C, Fonknechten N, Joshi V, Hazan J, Melki J, Betuing S. Mutations of SPG4 are responsible for a loss of function of spastin, an abundant neuronal protein localized in the nucleus. *Hum Mol Genet.* 2003;12:71–78.
55. Chen S, Song C, Guo H, Xu P, Huang W, Zhou Y, Sun J, Li CX, Du Y, Li X, Liu Z, Geng D, Maxwell PH, Zhang C, Wang Y. Distinct novel mutations affecting the same base in the NIPA1 gene cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia in two Chinese families. *Hum Mutat.* 2005;25:135–141.
56. Chen W, Kalscheuer V, Tzschach A et al. Mapping translocation breakpoints by nextgeneration sequencing. *Genome Res* 2008; 18: 1143-1149.
57. Chen, T. T., Klassen, T. L., Goldman, A. M., Marini, C., Guerrini, R., Noebels, J. L. Novel brain expression of CLC-1 chloride channels and enrichment of CLCN1 variants in epilepsy. *Neurology* 80: 1078-1085, 2013.
58. Cheung VG, Nowak N, Jang W et al. Integration of cytogenetic landmarks into the draft sequence of the human genome. *Nature* 2001; 409: 953-958.
59. Chuang DT, Shih,V.E. 2001. Maple syrup urine disease (branched chain ketoaciduria). In: Scriver CR, editor. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill. p 1971-2005.
60. Concannon, P., Gatti, R. A. Diversity of ATM gene mutations detected in patients with ataxia-telangiectasia. *Hum. Mutat.* 10: 100-107, 1997
61. Conrad DF, Andrews TD, Carter NP, Hurles ME and Pritchard JK. A high-resolution survey of deletion polymorphism in the human genome. *Nat Genet* 2006; 38: 75-81.
62. Cooper GM, Nickerson DA and Eichler EE. Mutational and selective effects on copynumber variants in the human genome. *Nat Genet* 2007; 39: S22-29.
63. Costa T, Scriver CR, Childs B. The effect of Mendelian disease on human health: a measurement. *Am J Med Genet* 1985;21:231–242.
64. Criscuolo C, Filla A, Coppola G, Rinaldi C, Carbone R, Pinto S, Wang Q, de Leva MF, Salvatore E, Banfi S, Brunetti A, Quarantelli M, Geschwind DH, Pappatà S, De Michele G. Two novel CYP7B1 mutations in Italian families with SPG5: a clinical and genetic study. *J Neurol.* 2009;256:1252–1257.
65. Crosby AH, Patel H, Patton MA, Proukakis C, Cross H. Spartin, the Troyer syndrome gene, suggests defective endosomal trafficking underlies some forms of hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet.* 2002;71:516.

66. Cross HE, McKusick VA. The Troyer syndrome. A recessive form of spastic paraplegia with distal muscle wasting. *Arch Neurol.* 1967;16:473–85.
67. Crow, Y. J., Leitch, A., Hayward, B. E., Garner, A., Parmar, R., Griffith, E., Ali, M., Semple, C., Aicardi, J., Babul-Hirji, R., Baumann, C., Baxter, P., and 33 others. Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutieres syndrome and mimic congenital viral brain infection. *Nature Genet.* 2006, 38: 910-916.
68. De Matteis, M. A.; Luini, A. Mendelian Disorders of Membrane Trafficking. *New England Journal of Medicine* 2011, 365 (10): 927–938
69. De Michele G, De Fusco M, Cavalcanti F, Filla A, Marconi R, Volpe G, Monticelli A, Ballabio A, Casari G, Coccozza S. A new locus for autosomal recessive hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 16q24.3. *Am J Hum Genet.* 1998;63:135–139.
70. de Vries BBA, Pfundt R, Leisink M et al: Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 606–616.
71. Dell'Angelica EC, Mullins C, Bonifacino JS. AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J Biol Chem.* 1999;274:7278–7285.
72. Depienne C, Stevanin G, Brice A, Durr A. Hereditary Spastic Paraplegia: An Update". *Current Opinion in Neurology* 2007, 20 (6): 674–680
73. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Research*, 2009, 1–14, doi:10.1093/nar/gkp215
74. Desviat LR, Clavero S, Perez-Cerdá C, Navarrete R, Ugarte M, Perez B. New splicing mutations in propionic acidemia. *J Hum Genet.* 2006;51(11):992-7. Epub 2006 Oct 19.
75. Dhami P, Coffey AJ, Abbs S et al. Exon array CGH: detection of copy-number changes at the resolution of individual exons in the human genome. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 750-762.
76. Dick KJ, Al-Mjeni R, Baskir W, Koul R, Simpson MA, Patton MA, Raeburn S, Crosby AH. A novel locus for an autosomal recessive hereditary spastic paraplegia (SPG35) maps to 16q21-q23. *Neurology.* 2008;71:248–252.
77. Dick KJ, Eckhardt M, Paisán-Ruiz C, Alshehhi AA, Proukakis C, Sibtain NA, Maier H, Sharifi R, Patton MA, Bashir W, Koul R, Raeburn S, Gieselmann V, Houlden H, Crosby AH. Mutation of FA2H underlies a complicated form of hereditary spastic paraplegia (SPG35). *Hum Mutat.* 2010;31:E1251–60.
78. Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW and Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 8817-8822.
79. Du J, Hu YC, Tang BS, Chen C, Luo YY, Zhan ZX, Zhao GH, Jiang H, Xia K, Shen L. Expansion of the phenotypic spectrum of SPG6 caused by mutation in NIPA1. *Clin Neurol Neurosurg.* 2011;113:480–482.
80. Dupre, N., Chrestian, N., Bouchard, J.-P., Rossignol, E., Brunet, D., Sternberg, D., Brias, B., Mathieu, J., Puymirat, J. Clinical, electrophysiologic, and genetic study of non-dystrophic myotonia in French-Canadians. *Neuromusc. Disord.* 19: 330-334, 2009.
81. Durr A, Camuzat A, Colin E, Tallaksen C, Hannequin D, Coutinho P, Fontaine B, Rossi A, Gil R, Rousselle C, Ruberg M, Stevanin G, Brice A. *Atlastin1* mutations are frequent in young-onset autosomal dominant spastic paraplegia. *Arch Neurol.* 2004;61:1867–1872.
82. Dursun U, Koroglu C, Kocasoy Orhan E, Ugur SA, Tolun A. Autosomal recessive spastic paraplegia (SPG45) with mental retardation maps to 10q24.3-q25.1. *Neurogenetics.* 2009;10:325–331.
83. Ensenauer RE, Adeyinka A, Flynn HC et al. Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 1027-1040.
84. Errico A, Ballabio A, Rugarli EI. Spastin, the protein mutated in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, is involved in microtubule dynamics. *Hum Mol Genet.* 2002;11:153–163.

85. Evans DG, et al. A new scoring system for the chances of identifying a BRCA1/2 mutation outperforms existing models including BRCAPRO. *J Med Genet* 2004; 41: 474-480
86. Evans KJ, Gomes ER, Reisenweber SM, Gundersen GG, Luring BP. Linking axonal degeneration to microtubule remodeling by Spastin-mediated microtubule severing. *J Cell Biol.* 2005;168:599–606.
87. Feenstra I, Vissers LE, Orsel M et al. Genotype-phenotype mapping of chromosome 18q deletions by high-resolution array CGH: an update of the phenotypic map. *Am J Med Genet A* 2007; 143: 1858-1867.
88. Fenton WA, Gravel RA, Rosenberg LE (2001) Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly W, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th edn. McGraw-Hill, New York, pp 2165–2190
89. Feuk L, Carson AR and Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 85-97
90. Fichera M, Lo Giudice M, Falco M, Sturnio M, Amata S, Calabrese O, Bigoni S, Calzolari E, Neri M. Evidence of kinesin heavy chain (KIF5A) involvement in pure hereditary spastic paraplegia. *Neurology.* 2004;63:1108–1110.
91. Fiegler H, Gribble SM, Burford DC et al. Array painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes using DNA microarrays. *J Med Genet* 2003; 40: 664-670.
92. Fink JK, Sharp GB, Lange BM, Wu CB, Haley T, Otterud B, Peacock M, Leppert M. Autosomal dominant, familial spastic paraplegia, type I: clinical and genetic analysis of a large North American family. *Neurology.* 1995a;45:325–331.
93. Fink JK, Wu CT, Jones SM, Sharp GB, Lange BM, Lesicki A, Reinglass T, Varvil T, Otterud B, Leppert M. Autosomal dominant familial spastic paraplegia: tight linkage to chromosome 15q. *Am J Hum Genet.* 1995b;56:188–192.
94. Fink JK. Hereditary spastic paraplegia: clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms. *Acta Neuropathol.* 2013;126:307–328.
95. Fink JK. The hereditary spastic paraplegias: nine genes and counting. *Arch Neurol* 2003, 60 (8): 1045–1049
96. Fink JK. Hereditary Spastic Paraplegia Overview. In: *GeneReviews* 2015, Bookshelf ID: NBK1509PMID: 20301682
97. Flanagan SE, Patch AM, Ellard S. Using SIFT and PolyPhen to predict loss-of-function and gain-of-function mutations. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2010 Aug;14(4):533-7. doi: 10.1089/gtmb.2010.0036.
98. Fontaine B, Davoine CS, Dürr A, Paternotte C, Feki I, Weissenbach J, Hazan J, Brice A. A new locus for autosomal dominant pure spastic paraplegia, on chromosome 2q24-q34. *Am J Hum Genet.* 2000;66:702–707.
99. Fontaine B, Davoine CS, Dürr A, Paternotte C, Feki I, Weissenbach J, Hazan J, Brice A. A new locus for autosomal dominant pure spastic paraplegia, on chromosome 2q24-q34. *Am J Hum Genet.* 2000;66:702–707.
100. Frank TS, et al. Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10,000 individuals. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1480-1490
101. Fredman D, White SJ, Potter S, Eichler EE, Den Dunnen JT and Brookes AJ. Complex SNP-related sequence variation in segmental genome duplications. *Nat Genet* 2004; 36: 861-866.
102. Friedenson B. Assessing and managing breast cancer risk: Clinical Tools for advising patients. *MedGenMed* 2004; 6(1):8
103. Garner CC, Garner A, Huber G, Kozak C, Matus A. Molecular cloning of microtubule-associated protein 1 (MAP1A) and microtubule-associated protein 5 (MAP1B): identification of distinct genes and their differential expression in developing brain. *J Neurochem.* 1990;55:146–154.

104. Gimelli G, Pujana MA, Patricelli MG et al. Genomic inversions of human chromosome 15q11-q13 in mothers of Angelman syndrome patients with class II (BP2/3) deletions. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 849-858.
105. Ginjaar, I. B., Kneppers, A. L. J., Meulen, J.-D. M., Anderson, L. V. B., Bremmer-Bout, M., van Deutekom, J. C. T., Weegenaar, J., den Dunnen, J. T., Bakker, E. Dystrophin nonsense mutation induces different levels of exon 29 skipping and leads to variable phenotypes within one BMD family. *Europ. J. Hum. Genet.* 2000, 8: 793-796.
106. Goddard, A. D., Covello, R., Luoh, S.-M., Clackson, T., Attie, K. M., Gesundheit, N., Rundle, A. C., Wells, J. A., Carlsson, L. M. S. Mutations of the growth hormone receptor in children with idiopathic short stature. *New Eng. J. Med.* 333: 1093-1098, 1995
107. Green, NM "Avidin". *Advances in protein chemistry* 29: 85-133. (1975).PMID 237414.
108. Guo, D.-C., Pannu, H., Tran-Fadulu, V., Papke, C. L., Yu, R. K., Avidan, N., Bourgeois, S., Estrera, A. L., Safi, H. J., Sparks, E., Amor, D., Ades, L., and 13 others. Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections. *Nature Genet.* 39: 1488-1493, 2007.
109. Guo, D.-C., Papke, C. L., Tran-Fadulu, V., Regalado, E. S., Avidan, N., Johnson, R. J., Kim, D. H., Pannu, H., Willing, M. C., Sparks, E., Pyeritz, R. E., Singh, M. N., and 19 others. Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) cause coronary artery disease, stroke, and Moyamoya disease, along with thoracic aortic disease. *Am. J. Hum. Genet.* 84: 617-627, 2009.
110. Gupta PK. Single-molecule DNA sequencing technologies for future genomics research. *Trends Biotechnol* 2008; 26: 602-611.
111. Hanein S, Martin E, Boukhris A, Byrne P, Goizet C, Hamri A, Benomar A, Lossos A, Denora P, Fernandez J, Elleuch N, Forlani S, Durr A, Feki I, Hutchinson M, Santorelli FM, Mhiri C, Brice A, Stevanin G. Identification of the SPG15 gene, encoding spastizin, as a frequent cause of complicated autosomal-recessive spastic paraplegia, including Kjellin syndrome. *Am J Hum Genet.* 2008;82:992-1002.
112. Hansen JJ, Dürr A, Cournu-Rebeix I, Georgopoulos C, Ang D, Nielsen MN, Davoine CS, Brice A, Fontaine B, Gregersen N, Bross P. Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60. *Am J Hum Genet.* 2002;70:1328-1332.
113. Harding AE. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet.* 1983;1:1151-1155.
114. Hayden E.C. International genome project launched. *Nature* 2008;451:378-379
115. Hazan J, Fontaine B, Bruyn RP, Lamy C, van Deutekom JC, Rime CS, Dürr A, Melki J, Lyon-Caen O, Agid Y, Munnich A, Padberg GW, de Recondo J, Frants RR, Brice A, Welssenbach J. Linkage of a new locus for autosomal dominant familial spastic paraplegia to chromosome 2p. *Hum Mol Genet.* 1994;1569-1573.
116. Hazan J, Lamy C, Melki J, Munnich A, de Recondo J, Weissenbach J. Autosomal dominant familial spastic paraplegia is genetically heterogeneous and one locus maps to chromosome 14q. *Nat Genet.* 1993;5:163-167.
117. He, M., Rutledge, S. L., Kelly, D. R., Palmer, C. A., Murdoch, G., Majumder, N., Nicholls, R. D., Pei, Z., Watkins, P. A., Vockley, J. A new genetic disorder in mitochondrial fatty acid beta-oxidation: ACAD9 deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 2007, 81: 87-103.
118. Hedera P, DiMauro S, Bonilla E, Wald J, Eldevik OP, Fink JK. Phenotypic analysis of autosomal dominant hereditary spastic paraplegia linked to chromosome 8q. *Neurology.* 1999a;53:44-50.
119. Hedera P, Rainier S, Alvarado D, Zhao X, Williamson J, Otterud B, Leppert M, Fink JK. Novel locus for autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, on chromosome 8q. *Am J Hum Genet.* 1999b;64:563-569.
120. Hentati A, Pericak-Vance MA, Hung WY, Belal S, Laing N, Boustany RM, Hentati F, Ben Hamida M, Siddique T. Linkage of 'pure' autosomal recessive familial spastic paraplegia to

- chromosome 8 markers and evidence of genetic locus heterogeneity. *Hum Mol Genet.* 1994a;3:1263–1267.
121. Hentati A, Pericak-Vance MA, Lennon F, Wasserman B, Hentati F, Juneja T, Angrist MH, Hung WY, Boustany RM, Bohlega S, Iqbal Z, Huether CH, Hamida MB, Siddique T. Linkage of a locus for autosomal dominant familial spastic paraplegia to chromosome 2p markers. *Hum Mol Genet.* 1994b;3:1867–1871.
 122. Hewamadduma, C., McDermott, C., Kirby, J., Grierson, A., Panayi, M., Dalton, A., Rajabally, Y., Shaw, P. New pedigrees and novel mutation expand the phenotype of REEP1-associated hereditary spastic paraplegia (HSP). *Neurogenetics* 10: 105-110, 2009.
 123. Hinds DA, Kloek AP, Jen M, Chen X and Frazer KA. Common deletions and SNPs are in linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Genet* 2006; 38: 82-85.
 124. Hiratzka LF, Bakris GL, Beckman JA; et al. (April 2010). "2010 ACCF/AHA/AATS/ACR/ASA/SCA/SCAI/SIR/STS/SVM guidelines for the diagnosis and management of patients with Thoracic Aortic Disease: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, American Association for Thoracic Surgery, American College of Radiology, American Stroke Association, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Society of Thoracic Surgeons, and Society for Vascular Medicine". *Circulation* 121 (13): e266–369. doi:10.1161/CIR.0b013e3181d4739e. PMID 20233780.
 125. Hirst J, Bright NA, Rous B, Robinson MS. Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol Biol Cell.* 1999;10:2787–802.
 126. Hodgkinson CA, Bohlega S, Abu-Amero SN, Cupler E, Kambouris M, Meyer BF, Bharucha VA. A novel form of autosomal recessive pure hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 13q14. *Neurology.* 2002;59:1905–1909.
 127. Hu J, Shibata Y, Zhu PP, Voss C, Rismanchi N, Prinz WA, Rapoport TA, Blackstone C. A class of dynamin-like GTPases involved in the generation of the tubular ER network. *Cell.* 2009;138:549–561.
 128. Hubbard, T. J. P., Aken, B. L., Beal, K., Ballester, B., Caccamo, M., Chen, Y., Clarke, L., Coates, G., Cunningham, F., Cutts, T., et al. (2007) Ensembl 2007. *Nucleic Acids Research*, 35(Database issue).
 129. Huculak, C., Bruyere, H., Nelson, T. N., Kozak, F. K., Langlois, S. V37I connexin 26 allele in patients with sensorineural hearing loss: evidence of its pathogenicity. *Am. J. Med. Genet.* 140A: 2394-2400, 2006
 130. Hudson LD. Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2: two faces of myelin loss from mutations in the same gene. *J Child Neurol.* 2003;18:616–624.
 131. Hughes CA, Byrne PC, Webb S, McMonagle P, Patterson V, Hutchinson M, Parfrey NA. SPG15, a new locus for autosomal recessive complicated HSP on chromosome 14q. *Neurology.* 2001;56:1230–3.
 132. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN et al. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 2004; 36: 949-951.
 133. International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005; 437: 1299-1320.
 134. International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature* 2003; 426: 789-796.
 135. Ishkanian AS, Malloff CA, Watson SK et al. A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet* 2004; 36: 299-303.
 136. Ivanov IS, Azmanov DN, Ivanova MB, Chamova T, Pacheva IH, Panova MV, Song S, Morar B, Yordanova RV, Galabova FK, Sotkova IG, Linev AJ, Bitchev S, Shearwood AM, Kancheva D, Gabrikova D, Karcagi V, Guerguelcheva V, Geneva IE, Bozhinova V, Stoyanova VK, Kremensky I, Jordanova A, Savov A, Horvath R, Brown MA, Tournev I, Filipovska A,

- Kalaydjieva L. Founder p.Arg 446* mutation in the PDHX gene explains over half of cases with congenital lactic acidosis in Roma children. *Mol Genet Metab.* 2014 Sep-Oct;113(1-2):76-83. doi: 10.1016/j.ymgme.2014.07.017. Epub 2014 Jul 21.
137. Jansen, P. L. M., Strautnieks, S. S., Jacquemin, E., Hadchouel, M., Sokal, E. M., Hooiveld, G. J. E. J., Koning, J. H., De Jager-Krikken, A., Kuipers, F., Stellaard, F., Bijleveld, C. M. A., Gouw, A., Van Goor, H., Thompson, R. J., Muller, M. Hepatocanalicular bile salt export pump deficiency in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 117: 1370-1379, 1999.;
 138. Jeffreys AJ, Wilson V and Thein SL. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 1985; 314: 67-73.
 139. Joanna P Davies and Yiannis A Ioannou Topological analysis of NPC1 reveals that the orientation of the putative sterol sensing domain is identical to that of HMG CoA and SCAP J. *Biol. Chem.* First Published on May 19, 2000, doi:10.1074/jbc.M002184200
 140. Jouet M, Rosenthal A, Armstrong G, MacFarlane J, Stevenson R, Paterson J, Metzenberg A, Ionasescu V, Temple K, Kenwrick S. X-linked spastic paraplegia (SPG1), MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene. *Nat Genet.* 1994;7:402-407.
 141. Kahofer, P., Bruckner-Tuderman, L., Metze, D., Lemmink, H., Scheffer, H., Smolle, J. Dystrophic epidermolysis bullosa inversa with COL7A1 mutations and absence of GDA-J/F3 protein. *Pediat. Derm.* 20: 243-248, 2003.;
 142. Kalb R., Neveling K, Hoehn H, Schneider H, Linka Y, Batish SD, Hunt C, Berwick M, Calle'n E, Surrallé's J, Casado J' A., Bueren J, Dasi A, Soulier J, Gluckman E, Zwaan CM, van Spaendonk R, Pals G, de Winter JP., Joenje H, Grompe M, Auerbach AD, Hanenberg H, and Schindler D, Hypomorphic Mutations in the Gene Encoding a Key Fanconi Anemia Protein, FANCD2, Sustain a Significant Group of FA-D2 Patients with Severe Phenotype, *The American Journal of Human Genetics* Volume 80, p:895-910, May 2007
 143. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258: 818-821.
 144. Karchin, R. et al. LS-SNP: large-scale annotation of coding non-synonymous SNPs based on multiple information sources. *Bioinformatics* 2005; 21(12), 2814-2820
 145. Kere, J., Srivastava, A. K., Montonen, O., Zonana, J., Thomas, N., Ferguson, B, Munoz, F., Morgan, D., Clarke, A., Baybayan, P., Chen, E. Y., Ezer, S., Saarialho-Kere, U., de la Chapelle, A., Schlessinger, D. X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein. *Nature Genet.* 13: 409-416, 1996.
 146. Kern JS, Kohlhase J, Bruckner-Tuderman L, Has C. Expanding the COL7A1 mutation database: novel and recurrent mutations and unusual genotype-phenotype constellations in 41 patients with dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.* 2006 May;126(5):1006-12.
 147. Kidd JM, Cooper GM, Donahue WF et al. Mapping and sequencing of structural variation from eight human genomes. *Nature* 2008; 453: 56-64.
 148. Klebe S, Azzedine H, Durr A, Bastien P, Bouslam N, Elleuch N, Forlani S, Charon C, Koenig M, Melki J, Brice A, Stevanin G. Autosomal recessive spastic paraplegia (SPG30) with mild ataxia and sensory neuropathy maps to chromosome 2q37.3. *Brain.* 2006;129:1456-1462.
 149. Kleefstra T, Brunner HG, Amiel J et al. Loss-of-function mutations in euchromatin histone methyl transferase 1 (EHMT1) cause the 9q34 subtelomeric deletion syndrome. *Am J Hum Genet* 2006; 79: 370-377.
 150. Kobayashi H, Hoffman EP, Marks HG. The rumpshaker mutation in spastic paraplegia. *Nat Genet.* 1994;7:351-352.
 151. Koolen DA, Sharp AJ, Hurst JA et al. Clinical and molecular delineation of the 17q21.31 microdeletion syndrome. *J Med Genet* 2008; 45: 710-720.
 152. Koolen DA, Vissers LE, Pfundt R et al. A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. *Nat Genet* 2006; 38: 999-1001.

153. Koolen, D. A., Vissers, L. E. L. M., Pfundt, R., de Leeuw, N., Knight, S. J. L., Regan, R., Kooy, R. F., Reyniers, E., Romano, C., Fichera, M., Schinzel, A., Baumer, A., Anderlid, B.-M., Schoumans, J., Knoers, N. V., van Kessel, A. G., Sistermans, E. A., Veltman, J. A., Brunner, H. G., de Vries, B. B. A. A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. *Nature Genet.* 38: 999-1001, 2006.
154. Korbel JO, Urban AE, Affourtit JP et al. Paired-end mapping reveals extensive structural variation in the human genome. *Science* 2007; 318: 420-426.
155. Kruer MC, Paisán-Ruiz C, Boddaert N, Yoon MY, Hama H, Gregory A, Malandrini A, Woltjer RL, Munnich A, Gobin S, Polster BJ, Palmeri S, Edvardson S, Hardy J, Houlden H, Hayflick SJ. Defective FA2H leads to a novel form of neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA). *Ann Neurol.* 2010;68:611–618.
156. Kumar Prateek, Steven Henikoff & Pauline C Ng. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols* 2009, 4, 1073 – 1081
157. Lee H, Deignan JL, Dorrani N, Strom SP, Kantarci S, Quintero-Rivera F, Das K, Toy T, Harry B, Yourshaw M, Fox M, Fogel BL, Martinez-Agosto JA, Wong DA, Chang VY, Shieh PB, Palmer CG, Dipple KM, Grody WW, Vilain E, Nelson SF. Clinical Exome Sequencing for Genetic Identification of Rare Mendelian Disorders. *JAMA.* 2014 Oct 18. doi: 10.1001/jama.2014.14604.;
158. Leitch, C. C., Zaghloul, N. A., Davis, E. E., Stoetzel, C., Diaz-Font, A., Rix, S., Alfadhel, M., Lewis, R. A., Eyaid, W., Banin, E., Dollfus, H., Beales, P. L., Badano, J. L., Katsanis, N. Hypomorphic mutations in syndromic encephalocele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nature Genet.* 40: 443-448, 2008.
159. Lenk U, Hanke R, Speer A., Carrier detection in DMD families with point mutations, using PCR-SSCP and direct sequencing. *Neuromuscul Disord.* 1994; 4(5-6):411-418.
160. Lerner-Ellis, J. P., Anastasio, N., Liu, J., Coelho, D., Suormala, T., Stucki, M., Loewy, A. D., Gurd, S., Grundberg, E., Morel, C. F., Watkins, D., Baumgartner, M. R., Pastinen, T., Rosenblatt, D. S., Fowler, B. Spectrum of mutations in MMACHC, allelic expression, and evidence for genotype-phenotype correlations. *Hum. Mutat.* 2009, 30: 1072-1081.
161. Lerner-Ellis, J. P., Tirone, J. C., Pawelek, P. D., Dore, C., Atkinson, J. L., Watkins, D., Morel, C. F., Fujiwara, T. M., Moras, E., Hosack, A. R., Dunbar, G. V., Antonicka, H., and 10 others. Identification of the gene responsible for methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type. *Nature Genet.* 2006, 38: 93-100.
162. Lesnik Oberstein SA, Kriek M, White SJ et al. Peters Plus syndrome is caused by mutations in B3GALTL, a putative glycosyltransferase. *Am J Hum Genet* 2006; 79:562-566.
163. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009 Jul 15;25(14):1754-60. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324.
164. Lin P, Li J, Liu Q, Mao F, Li J, Qiu R, Hu H, Song Y, Yang Y, Gao G, Yan C, Yang W, Shao C, Gong Y. A missense mutation in SLC33A1, which encodes the acetyl-CoA transporter, causes autosomal-dominant spastic paraplegia (SPG42). *Am J Hum Genet.* 2008;83:752–759.
165. Lin P, Mao F, Liu Q, Shao C, Yan C, Gong Y. Prenatal diagnosis of autosomal dominant hereditary spastic paraplegia (SPG42) caused by SLC33A1 mutation in a Chinese kindred. *Prenat Diagn.* 2010;30:485–486.
166. Linardopoulou EV, Williams EM, Fan Y, Friedman C, Young JM and Trask BJ. Human subtelomeres are hot spots of interchromosomal recombination and segmental duplication. *Nature* 2005; 437: 94-100.
167. Lindor NM, McMaster ML, Lindor CJ, et al.: Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes - second edition. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2008, 38: 1-93.
168. Lisi, E. C., Hamosh, A., Doheny, K. F., Squibb, E., Jackson, B., Galczynski, R., Thomas, G. H., Batista, D. A. S. 3q29 interstitial microduplication: a new syndrome in a three-generation family. *Am. J. Med. Genet.* 146A: 601-609, 2008.

169. Litt M and Luty JA. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 1989; 44: 397-401.
170. Liu X, Jian X, and Boerwinkle E. dbNSFP v2.0: A Database of Human Nonsynonymous SNVs and Their Functional Predictions and Annotations. *Human Mutation*. 2013. 34:E2393-E2402.
171. Liu X, Jian X, and Boerwinkle E. dbNSFP: a lightweight database of human non-synonymous SNPs and their functional predictions. *Human Mutation*. 2011. 32:894-899.;
172. Lo Giudice T, Lombardi F2, Santorelli FM3, Kawarai T4, Orlacchio A5. Hereditary spastic paraplegia: clinical-genetic characteristics and evolving molecular mechanisms. *Exp Neurol*. 2014 Nov;261:518-539.
173. Locke DP, Sharp AJ, McCarroll SA et al. Linkage disequilibrium and heritability of copy-number polymorphisms within duplicated regions of the human genome. *Am J Hum Genet* 2006; 79: 275-290.
174. Logan, J., Hiestand, D., Daram, P., Huang, Z., Muccio, D. D., Hartman, J., Haley, B., Cook, W. J., Sorscher, E. J. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations that disrupt nucleotide binding. *J. Clin. Invest.* 1994, 94: 228-236.
175. Lourdes R. Desviat, Sonia Clavero, Celia Perez-Cerda, Rosa Navarrete, Magdalena Ugarte, Belen Perez, New splicing mutations in propionic academia, *J Hum Genet* 2006, 51:992–997
176. Lowery, M. C., Morris, C. A., Ewart, A., Brothman, L. J., Zhu, X. L., Leonard, C. O., Carey, J. C., Keating, M., Brothman, A. R. Strong correlation of elastin deletions, detected by FISH, with Williams syndrome: evaluation of 235 patients. *Am. J. Hum. Genet.* 57: 49-53, 1995.
177. Lu J, Rashid F, Byrne PC. The hereditary spastic paraplegia protein spartin localises to mitochondria. *J Neurochem*. 2006;98:1908–1919.
178. Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S et al. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 1991; 66: 219-232.
179. Lupski JR. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet* 1998; 14: 417-422.
180. Lynex CN, Carr IM, Leek JP, Achuthan R, Mitchell S, Maher ER, Woods CG, Bonthon DT, Markham AF. Homozygosity for a missense mutation in the 67 kDa isoform of glutamate decarboxylase in a family with autosomal recessive spastic cerebral palsy: parallels with Stiff-Person Syndrome and other movement disorders. *BMC Neurol*. 2004;4:20.
181. Macedo-Souza LI, Kok F, Santos S, Amorim SC, Starling A, Nishimura A, Lezirovitz K, Lino AM, Zatz M. Spastic paraplegia, optic atrophy, and neuropathy is linked to chromosome 11q13. *Ann Neurol*. 2005;57:730–737.
182. Macedo-Souza LI, Kok F, Santos S, Licinio L, Lezirovitz K, Nascimento RM, Bueno C, Martyn M, Leão EK, Zatz M. Reevaluation of a large family defines a new locus for X-linked recessive pure spastic paraplegia (SPG34) on chromosome Xq25. *Neurogenetics*. 2008;9:225–226.
183. Maggiore, G., Bernard, O., Hadchouel, M., Lemonnier, A., Alagille, D. Diagnostic value of serum gamma-glutamyl transpeptidase activity in liver diseases in children. *J. Pediat. Gastroent. Nutr.* 12: 21-26, 1991.
184. Maggiore, G., Bernard, O., Riely, C. A., Hadchouel, M., Lemonnier, A., Alagille, D. Normal serum gamma-glutamyl-transpeptidase activity identifies groups of infants with idiopathic cholestasis with poor prognosis. *J. Pediat.* 111: 251-252, 1987.;
185. Malan, V., Raoul, O., Firth, H. V., Royer, G., Turleau, C., Bernheim, A., Willatt, L., Munnich, A., Vekemans, M., Lyonnet, S., Cormier-Daire, V., Colleaux, L. 19q13.11 deletion syndrome: a novel clinically recognisable genetic condition identified by array comparative genomic hybridisation. (Letter) *J. Med. Genet.* 46: 635-640, 2009.

186. Mannan AU, Krawen P, Sauter SM, Boehm J, Chronowska A, Paulus W, Neesen J, Engel W. ZFYVE27 (SPG33), a novel spastin-binding protein, is mutated in hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet.* 2006;79:351–357.
187. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008; 9: 387-402.
188. Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet* 2008; 24: 133-141.
189. Margulies M, Egholm M, Altman WE et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 2005; 437: 376-380.
190. Mark Nellist, Rutger WW Brouwer, Christel EM Kockx, Monique van Veghel-Plandsoen, Caroline Withagen-Hermans, Lida Prins-Bakker, Marianne Hoogeveen-Westerveld, Alan Mrcic, Mike MP van den Berg, Anna E Koopmans, Marie-Claire de Wit, Floor E Jansen, Anneke JA Maat-Kievit, Ans van den Ouweland, Dicky Halley, Targeted Next Generation Sequencing reveals previously unidentified TSC1 and TSC2 mutations, *BMC Medical Genetics*, 2015, 16:10 DOI: 10.1186/s12881-015-0155-4;
191. Marques Pereira, P., Schneider, A., Pannetier, S., Heron, D., Hanauer, A. Coffin-Lowry syndrome. *Europ. J. Hum. Genet.* 18: 627-633, 2010.
192. Marta Romani, Alessia Micalizzi, Ichraf Kraoua, Maria Teresa Dotti, Mara Cavallin, László Sztriha, Rosario Ruta, Francesca Mancini, Tommaso Mazza, Stefano Castellana, Benrhouma Hanene, Maria Alessandra Carluccio, Francesca Darra, Adrienn Máté, Alíz Zimmermann, Neziha Gouider-Khouja and Enza Maria Valente, Mutations in B9D1 and MKS1 cause mild Joubert syndrome: expanding the genetic overlap with the lethal ciliopathy Meckel syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2014 9:72.
193. Martinez Murillo F, Kobayashi H, Pegoraro E, Galluzzi G, Creel G, Mariani C, Farina E, Ricci E, Alfonso G, Pauli RM, Hoffman EP. Genetic localization of a new locus for recessive familial spastic paraparesis to 15q13-15. *Neurology.* 1999;53:50–56.
194. Martinez-Lage M, Molina-Porcel L, Falcone D, McCluskey L, Lee VM, Van Deerlin VM, Trojanowski JQ. TDP-43 pathology in a case of hereditary spastic paraplegia with a NIPA1/SPG6 mutation. *Acta Neuropathol.* 2012;124:285–291.
195. Marx J. Alzheimer's research moves to mice. *Science.* 1991;253:266–267.
196. McCarroll SA, Hadnott TN, Perry GH et al. Common deletion polymorphisms in the human genome. *Nat Genet* 2006; 38: 86-92.
197. McConville CM, Stankovic T, Byrd PJ, McGuire GM, Yao QY, Lennox GG, Taylor MR. Mutations associated with variant phenotypes in ataxia-telangiectasia. *Am J Hum Genet.* 1996 Aug;59(2):320-30.
198. McDermott CJ, Grierson AJ, Wood JD, Bingley M, Wharton SB, Bushby KM, Shaw PJ. Hereditary spastic paraparesis: disrupted intracellular transport associated with spastin mutation. *Ann Neurol.* 2003;54:748–759.
199. McEntyre J, Ostell J, editors. The NCBI Handbook [Internet]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information (US); 2002
200. McHale DP, Mitchell S, Bunday S, Moynihan L, Campbell DA, Woods CG, Lench NJ, Mueller RF, Markham AF. A gene for autosomal recessive symmetrical spastic cerebral palsy maps to chromosome 2q24-25. *Am J Hum Genet.* 1999;64:526–532.
201. McMonagle P, Byrne PC, Fitzgerald B, Webb S, Parfrey NA, Hutchinson M. Phenotype of AD-HSP due to mutations in the SPAST gene: comparison with AD-HSP without mutations. *Neurology.* 2000;55:1794–1800.
202. Mefford, H. C., Clauin, S., Sharp, A. J., Moller, R. S., Ullmann, R., Kapur, R., Pinkel, D., Cooper, G. M., Ventura, M., Ropers, H. H., Tommerup, N., Eichler, E. E., Bellanne-Chantelot, C. Recurrent reciprocal genomic rearrangements of 17q12 are associated with renal disease, diabetes, and epilepsy. *Am. J. Hum. Genet.* 81: 1057-1069, 2007.

203. Mefford, H., Sharp, A., Baker, C., Itsara, A., Jiang, Z., Buysse, K., Huang, S., Maloney, V., Crolla, J., Baralle, D., Collins, A., Mercer, C., and 72 others. Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes. *New Eng. J. Med.* 359: 1685-1699, 2008.
204. Meijer IA, Cossette P, Roussel J, Benard M, Toupin S, Rouleau GA. A novel locus for pure recessive hereditary spastic paraplegia maps to 10q22.1-10q24.1. *Ann Neurol.* 2004;56:579–582.
205. Meilleur KG, Traoré M, Sangaré M, Britton A, Landouré G, Coulibaly S, Niaré B, Mochel F, La Pean A, Rafferty I, Watts C, Shriner D, Littleton-Kearney MT, Blackstone C, Singleton A, Fischbeck KH. Hereditary spastic paraplegia and amyotrophy associated with a novel locus on chromosome 19. *Neurogenetics.* 2010;11:313–318.
206. Menten B, Buysse K, Zahir F et al: Osteopoikilosis, short stature and mental retardation as key features of a new microdeletion syndrome on 12q14. *J Med Genet* 2007; 44: 264–268.
207. Mills RE, Luttig CT, Larkins CE et al. An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome. *Genome Res* 2006; 16: 1182-1190.
208. Mitchell S, Bunday S. Symmetry of neurological signs in Pakistani patients with probable inherited spastic cerebral palsy. *Clin Genet.* 1997;51:7–14.
209. Mitra RD and Church GM. In situ localized amplification and contact replication of many individual DNA molecules. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: e34.
210. Montenegro G, Rebelo AP, Connell J, Allison R, Babalini C, D'Aloia M, Montieri P, Schüle R, Ishiura H, Price J, Strickland A, Gonzalez MA, Baumbach-Reardon L, Deconinck T, Huang J, Bernardi G, Vance JM, Rogers MT, Tsuji S, De Jonghe P, Pericak-Vance MA, Schöls L, Orlacchio A, Reid E, Züchner S. Mutations in the ER-shaping protein reticulon 2 cause the axon-degenerative disorder hereditary spastic paraplegia type 12. *J Clin Invest.* 2012;122:538–544.
211. Moreno-De-Luca A, Helmers SL, Mao H, Burns TG, Melton AM, Schmidt KR, Fernhoff PM, Ledbetter DH, Martin CL. Adaptor protein complex-4 (AP-4) deficiency causes a novel autosomal recessive cerebral palsy syndrome with microcephaly and intellectual disability. *J Med Genet.* 2011;48:141–144.
212. Muglia M, Criscuolo C, Magariello A, De Michele G, Scarano V, D'Adamo P, Ambrosio G, Gabriele AL, Patitucci A, Mazzei R, Conforti FL, Sprovieri T, Morgante L, Epifanio A, La Spina P, Valentino P, Gasparini P, Filla A, Quattrone A. Narrowing of the critical region in autosomal recessive spastic paraplegia linked to the SPG5 locus. *Neurogenetics.* 2004;5:49–54.
213. Mullaney J.M., Ryan E. Mills, W. Stephen Pittard and Scott E. Devine. Small insertions and deletions (INDELs) in human genomes. *Hum. Mol. Genet.* 2010; 19(R2): R131-R136, doi: 10.1093/hmg/ddq400
214. Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M, Zemojtel T, Abedini SS, Chen W, Hosseini M, Behjati F, Haas S, Jamali P, Zecha A, Mohseni M, Püttmann L, Vahid LN, Jensen C, Moheb LA, Bienek M, Larti F, Mueller I, Weissmann R, Darvish H, Wrogemann K, Hadavi V, Lipkowitz B, Esmaeeli-Nieh S, Wiczorek D, Kariminejad R, Firouzabadi SG, Cohen M, Fattahi Z, Rost I, Mojahedi F, Hertzberg C, Dehghan A, Rajab A, Banavandi MJ, Hoffer J, Falah M, Musante L, Kalscheuer V, Ullmann R, Kuss AW, Tzschach A, Kahrizi K, Ropers HH. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature.* 2011;478:57–63.
215. Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P et al. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 1987; 235: 1616-1622.
216. Nakano, A., Pfendner, E., Pulkkinen, L., Hashimoto, I., Uitto, J. Herlitz junctional epidermolysis bullosa: novel and recurrent mutations in the LAMB3 gene and the population carrier frequency. *J. Invest. Derm.* 115: 493-498, 2000.
217. Need AC, V Shashi, Y Hitomi, K Schoch, KV Shianna, MT McDonald, MH Meisler, DB Goldstein Clinical application of exome sequencing in undiagnosed genetic conditions *J Med Genet* doi:10.1136/jmedgenet-2012-100819

218. Ng, P. and Henikoff, S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Research* 2001; 11, 863–874
219. Ohba, C., Kato, M., Takahashi, S., Lerman-Sagie, T., Lev, D., Terashima, H., Kubota, M., Kawawaki, H., Matsufuji, M., Kojima, Y., Tateno, A., Goldberg-Stern, H., and 10 others. Early onset epileptic encephalopathy caused by de novo SCN8A mutations. *Epilepsia* 55: 994–1000, 2014
220. Orlacchio A, Kawai T, Gaudiello F, St George-Hyslop PH, Floris R, Bernardi G. New locus for hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 1p31.1-1p21.1. *Ann Neurol.* 2005;58:423–429.
221. Orlacchio A, Patrono C, Gaudiello F, Rocchi C, Moschella V, Floris R, Bernardi G, Kawai T. Silver syndrome variant of hereditary spastic paraplegia: A locus to 4p and allelism with SPG4. *Neurology.* 2008;70:1959–1966.
222. Orthmann-Murphy JL, Salsano E, Abrams CK, Bizzi A, Uziel G, Freidin MM, Lamantea E, Zeviani M, Scherer SS, Pareyson D. Hereditary spastic paraplegia is a novel phenotype for GJA12/GJC2 mutations. *Brain.* 2009;132:426–438.
223. Oz-Levi D, Ben-Zeev B, Ruzzo EK, Hitomi Y, Gelman A, Pelak K, Anikster Y, Reznik-Wolf H, Bar-Joseph I, Olender T, Alkelai A, Weiss M, Ben-Asher E, Ge D, Shianna KV, Elazar Z, Goldstein DB, Pras E, Lancet D. Mutation in TECPR2 reveals a role for autophagy in hereditary spastic paraparesis. *Am J Hum Genet.* 2012;91:1065–1072.
224. Park SH, Zhu PP, Parker RL, Blackstone C. Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network. *J Clin Invest.* 2010;120:1097–1110.
225. Parmigiani G, et al. Determining Carrier Probabilities for Breast Cancer–Susceptibility Genes BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 145–158
226. Patel H, Hart PE, Warner TT, Houlston RS, Patton MA, Jeffery S, Crosby AH. The Silver syndrome variant of hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 11q12-q14, with evidence for genetic heterogeneity within this subtype. *Am J Hum Genet.* 2001;69:209–215.
227. Paternotte C, Rudnicki D, Fizames C, Davoine CS, Mavel D, Dürr A, Samson D, Marquette C, Muselet D, Vega-Czarny N, Drouot N, Voit T, Fontaine B, Gyapay G, Auburger G, Weissenbach J, Hazan J. Quality assessment of whole genome mapping data in the refined familial spastic paraplegia interval on chromosome 14q. *Genome Res.* 1998;8:1216–1227.
228. Patrono C, Casali C, Tessa A, Cricchi F, Fortini D, Carrozzo R, Siciliano G, Bertini E, Santorelli FM. Missense and splice site mutations in SPG4 suggest loss-of-function in dominant spastic paraplegia. *J Neurol.* 2002;249:200–205.
229. Perry GH, Ben-Dor A, Tsalenko A et al. The fine-scale and complex architecture of human copy-number variation. *Am J Hum Genet* 2008; 82: 685–695.
230. Perry GH, Tchinda J, McGrath SD et al. Hotspots for copy number variation in chimpanzees and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 8006–8011.
231. Perry GH, Yang F, Marques-Bonet T et al. Copy number variation and evolution in humans and chimpanzees. *Genome Res* 2008; 18: 1698–1710.
232. Pinkel D and Albertson DG. Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. *Nat Genet* 2005; 37 Suppl: S11–17.
233. Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA et al. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999; 23: 41–46.
234. Potocki L, Bi W, Treadwell-Deering D et al. Characterization of Potocki-Lupski syndrome (dup(17)(p11.2p11.2)) and delineation of a dosage-sensitive critical interval that can convey an autism phenotype. *Am J Hum Genet* 2007; 80: 633–649.
235. Potocki L, Chen KS, Park SS et al. Molecular mechanism for duplication 17p11.2- the homologous recombination reciprocal of the Smith-Magenis microdeletion. *Nat Genet* 2000; 24: 84–87.

236. Potocki, L., Bi, W., Treadwell-Deering, D., Carvalho, C. M. B., Eifert, A., Friedman, E. M., Glaze, D., Krull, K., Lee, J. A., Lewis, R. A., Mendoza-Londono, R., Robbins-Furman, P., Shaw, C., Shi, X., Weissenberger, G., Withers, M., Yatsenko, S. A., Zackai, E. H., Stankiewicz, P., Lupski, J. R. Characterization of Potocki-Lupski syndrome (dup(17)(p11.2p11.2)) and delineation of a dosage-sensitive critical interval that can convey an autism phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 80: 633-649, 2007.
237. Proukakis C, Cross H, Patel H, Patton MA, Valentine A, Crosby AH. Troyer syndrome revisited. A clinical and radiological study of a complicated hereditary spastic paraplegia. *J Neurol.* 2004;251:1105–1110.
238. Qin W, Kozlowski P, Taillon BE, Bouffard P, Holmes AJ, Janne P, et al. Ultra deep sequencing detects a low rate of mosaic mutations in tuberous sclerosis complex. *Hum Genet.* 2010;127:573–82.;
239. Rainier S, Bui M, Mark E, Thomas D, Tokarz D, Ming L, Delaney C, Richardson RJ, Albers JW, Matsunami N, Stevens J, Coon H, Leppert M, Fink JK. Neuropathy target esterase gene mutations cause motor neuron disease. *Am J Hum Genet.* 2008;82:780–785.
240. Rainier S, Chai JH, Tokarz D, Nicholls RD, Fink JK. NIPA1 gene mutations cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia (SPG6). *Am J Hum Genet.* 2003;73:967–791.
241. Raja Rayan, D. L., Haworth, A., Sud, R., Matthews, E., Fialho, D., Burge, J., Portaro, S., Schorge, S., Tuin, K., Lunt, P., McEntagart, M., Toscano, A., Davis, M. B., Hanna, M. G. A new explanation for recessive myotonia congenita: exon deletions and duplications in CLCN1. *Neurology* 78: 1953-1958, 2012.
242. Rajcan-Separovic, E., Harvard, C., Liu, X., McGillivray, B., Hall, J. G., Qiao, Y., Hurlburt, J., Hildebrand, J., Mickelson, E. C. R., Holden, J. J. A., Lewis, M. E. S. Clinical and molecular characterisation of a newly recognised microdeletion syndrome involving 2p15-16.1. (Letter) *J. Med. Genet.* 44: 269-276, 2007.
243. Ramensky, V. and Sunyaev, S. Human nonsynonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acid Research* 2002; 30, 3894–3900
244. Rath A, Bertrand Bellet, Annie Olry, Catherine Gonthier and Ségolène Aymé. How to code rare diseases with international terminologies? INSERM, US14, Orphanet, Paris, France. Licensee BioMed Central Ltd. The article is part of the supplement: 7th European Conference on Rare Diseases and Orphan Products (ERCD 2014)
245. Rath A, Olry A, Dhombres F, Brandt MM, Urbero B, Ayme S: Representation of rare diseases in health information systems: the Orphanet approach to serve a wide range of end users. *Hum Mutat* 2012, 33(5):803-808
246. Redon R, Baujat G, Sanlaville D, Le Merrer M, Vekemans M, Munnich A, Carter NP, Cormier-Daire V, Colleaux L. Interstitial 9q22.3 microdeletion: clinical and molecular characterisation of a newly recognised overgrowth syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2006 Jun;14(6):759-67.
247. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006; 444: 444-454.
248. Reid E, Dearlove AM, Osborn O, Rogers MT, Rubinsztein DC. A locus for autosomal dominant "pure" hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 19q13. *Am J Hum Genet.* 2000;66:728–732.
249. Reid E, Dearlove AM, Rhodes M, Rubinsztein DC. A new locus for autosomal dominant "pure" hereditary spastic paraplegia mapping to chromosome 12q13, and evidence for further genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet.* 1999;65:757–63.
250. Reid E, Kloos M, Ashley-Koch A, Hughes L, Bevan S, Svenson IK, Graham FL, Gaskell PC, Dearlove A, Pericak-Vance MA, Rubinsztein DC, Marchuk DA. A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *Am J Hum Genet.* 2002;71:1189–1194.

251. Reumers, J., Schymkowitz, J., Ferkinghoff-Borg, J., Stricher, F., Serrano, L., and Rousseau, F. SNPeffect: a database mapping molecular phenotypic effects of human non-synonymous coding SNPs. *Nucleic Acid Research* 2005, 33 (Database issue), D527–532
252. Riano E, Martignoni M, Mancuso G, Cartelli D, Crippa F, Toldo I, Siciliano G, Di Bella D, Taroni F, Bassi MT, Cappelletti G, Rugarli EI. Pleiotropic effects of spastin on neurite growth depending on expression levels. *J Neurochem*. 2009;108:1277–1288.
253. Ribai P, Stevanin G, Bouslam N, Pontier B, Nelson I, Fontaine B, Dussert C, Charon C, Durr A, Brice A. A new phenotype linked to SPG27 and refinement of the critical region on chromosome. *J Neurol*. 2006;253:714–719.
254. Roberts, R. G., Bobrow, M., Bentley, D. R. Point mutations in the dystrophin gene. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89: 2331-2335, 1992.
255. Rodríguez-Pombo P., R. Navarrete, B. Merinero, P. Gómez-Puertas, M. Ugarte, Mutational Spectrum of Maple Syrup Urine Disease in Spain, *HUMAN MUTATION* Mutation in Brief #899 (2006) Online, DOI: 10.1002/humu.9428
256. Rogers C D, F J Couch³, K Brune¹, S T Martin¹, J Philips¹, K M Murphy, G Petersen, C J Yeo, R H Hruban, M Goggins, Genetics of the FANCA gene in familial pancreatic cancer, *J Med Genet* 2004;41:e126 doi:10.1136/jmg.2004.024851
257. Roll-Mecak A, Vale RD. The Drosophila homologue of the hereditary spastic paraplegia protein, spastin, severs and disassembles microtubules. *Curr Biol*. 2005;15:650–655
258. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001; 409: 928-933.
259. Saillour, Y., Zanni, G., Des Portes, V., Heron, D., Guibaud, L., Iba-Zizen, M. T., Pedespan, J. L., Poirier, K., Castelnau, L., Julien, C., Franconnet, C., Bonthron, D., Porteous, M. E., Chelly, J., Bienvenu, T. Mutations in the AP1S2 gene encoding the sigma 2 subunit of the adaptor protein 1 complex are associated with syndromic X-linked mental retardation with hydrocephalus and calcifications in basal ganglia. (Letter) *J. Med. Genet.* 2007, 44: 739-744.
260. Sambrotta, M., Strautnieks, S., Papouli, E., Rushton, P., Clark, B. E., Parry, D. A., Logan, C. V., Newbury, L. J., Kamath, B. M., Ling, S., Grammatikopoulos, T., Wagner, B. E., and 11 others. Mutations in TJP2 cause progressive cholestatic liver disease. *Nature Genet.* 46: 326-328, 2014
261. Sanderson CM, Connell JW, Edwards TL, Bright NA, Duley S, Thompson A, Luzio JP, Reid E. Spastin and atlastin, two proteins mutated in autosomal-dominant hereditary spastic paraplegia, are binding partners. *Hum Mol Genet.* 2006;15:307–318.
262. Saugier-veber P, Munnich A, Bonneau D, Rozet JM, Le Merrer M, Gil R, Boespflug-Tanguy O. X-linked spastic paraplegia and Pelizaeus-Merzbacher disease are allelic disorders at the proteolipid protein locus. *Nat Genet.* 1994;6:257–262.
263. Savino M, Borriello A, D'Apolito M, Criscuolo M, Del Vecchio M, Bianco AM, Di Perna M, Calzone R, Nobili B, Zatterale A, Zelante L, Joenje H, Della Ragione F, Savoia A. Spectrum of FANCA mutations in Italian Fanconi anemia patients: identification of six novel alleles and phenotypic characterization of the S858R variant. *Hum Mutat.* 2003 Oct;22(4):338-9
264. Schena M, Shalon D, Davis RW and Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270: 467-470.
265. Scherer SW, Lee C, Birney E et al. Challenges and standards in integrating surveys of structural variation. *Nat Genet* 2007; 39: S7-15.
266. Schickel J, Pamminger T, Ehrensam A, Münch S, Huang X, Klopstock T, Kurlmann G, Hemmerich P, Dubiel W, Deufel T, Beetz C. Isoform-specific increase of spastin stability by N-terminal missense variants including intragenic modifiers of SPG4 hereditary spastic paraplegia. *Eur J Neurol.* 2007;14:1322–1328.
267. Schlipf NA, Beetz C, Schüle R, Stevanin G, Erichsen AK, Forlani S, Zaros C, Karle K, Klebe S, Klimpe S, Durr A, Otto S, Tallaksen CM, Riess O, Brice A, Bauer P, Schöls L. A total

- of 220 patients with autosomal dominant spastic paraplegia do not display mutations in the SLC33A1 gene (SPG42). *Eur J Hum Genet.* 2010;18:1065–1067.
268. Schoumans J, Staaf J, Jonsson G et al. Detection and delineation of an unusual 17p11.2 deletion by array-CGH and refinement of the Smith-Magenis syndrome minimum deletion to approximately 650 kb. *Eur J Med Genet* 2005; 48: 290-300.
 269. Schüle R, Bonin M, Dürr A, Forlani S, Sperfeld AD, Klimpe S, Mueller JC, Seibel A, van de Warrenburg BP, Bauer P, Schöls L. Autosomal dominant spastic paraplegia with peripheral neuropathy maps to chr12q23-24. *Neurology.* 2009;72:1893–1898.
 270. Schuurs-Hoeijmakers JH, Geraghty MT, Kamsteeg EJ, Ben-Salem S, de Bot ST, Nijhof B, van de Vondervoort II, van der Graaf M, Nobau AC, Otte-Höller I, Vermeer S, Smith AC, Humphreys P, Schwartzentruber J. FORGE Canada Consortium, Ali BR, Al-Yahyaee SA, Tariq S, Pramathan T, Bayoumi R, Kremer HP, van de Warrenburg BP, van den Akker WM, Gilissen C, Veltman JA, Janssen IM, Vulto-van Silfhout AT, van der Velde-Visser S, Lefeber DJ, Diekstra A, Erasmus CE, Willemsen MA, Vissers LE, Lammens M, van Bokhoven H, Brunner HG, Wevers RA, Schenck A, Al-Gazali L, de Vries BB, de Brouwer AP. Mutations in DDHD2, encoding an intracellular phospholipase A(1), cause a recessive form of complex hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet.* 2012;91:1073–1081.
 271. Schwarz GA, Liu CN. Hereditary (familial) spastic paraplegia; further clinical and pathologic observations. *AMA Arch Neurol Psychiatry.* 1956;75:144–162.
 272. Sebat J, Lakshmi B, Troge J et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 2004; 305: 525-528.
 273. Sedel F, Fontaine B, Saudubray JM, Lyon-Caen O. Hereditary spastic paraparesis in adults associated with inborn errors of metabolism: a diagnostic approach. *J Inherit Metab Dis.* 2007;30:855–864.
 274. Seri M, Cusano R, Forabosco P, Cinti R, Caroli F, Picco P, Bini R, Morra VB, De Michele G, Lerone M, Silengo M, Pela I, Borroni C, Romeo G, Devoto M. Genetic mapping to 10q23.3-q24.2, in a large Italian pedigree, of a new syndrome showing bilateral cataracts, gastroesophageal reflux, and spastic paraparesis with amyotrophy. *Am J Hum Genet.* 1999;64:586–593.
 275. Shaffer, L. G., Theisen, A., Bejjani, B. A., Ballif, B. C., Aylsworth, A. S., Lim, C., McDonald, M., Ellison, J. W., Kostiner, D., Saitta, S., Shaikh, T. The discovery of microdeletion syndromes in the post-genomic era: review of the methodology and characterization of a new 1q41q42 microdeletion syndrome. *Genet. Med.* 9: 607-616, 2007.
 276. Sharp AJ, Hansen S, Selzer RR et al. Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. *Nat Genet* 2006; 38: 1038-1042.
 277. Sharp AJ. Emerging themes and new challenges in defining the role of structural variation in human disease. *Hum Mutat* 2009; 30: 135-144.
 278. Sharp, A. J., Mefford, H. C., Li, K., Baker, C., Skinner, C., Stevenson, R. E., Schroer, R. J., Novara, F., De Gregori, M., Ciccone, R., Broomer, A., Casuga, I., and 22 others. A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nature Genet.* 40: 322-328, 2008.
 279. Sharp, A. J., Selzer, R. R., Veltman, J. A., Gimelli, S., Gimelli, G., Striano, P., Coppola, A., Regan, R., Price, S. M., Knoers, N. V., Eis, P. S., Brunner, H. G., Hennekam, R. C., Knight, S. J. L., de Vries, B. B. A., Zuffardi, O., Eichler, E. E. Characterization of a recurrent 15q24 microdeletion syndrome. *Hum. Molec. Genet.* 16: 567-572, 2007.
 280. Shashi V, McConkie-Rosell A, Rosell B, et al. The utility of the traditional medical genetics diagnostic evaluation in the context of next-generation sequencing for undiagnosed genetic disorders. *Genet Med* 2014;16:176–182.)

281. Shaw-Smith C, Pittman AM, Willatt L et al. Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability. *Nat Genet* 2006; 38: 1032-1037.
282. She X, Jiang Z, Clark RA et al. Shotgun sequence assembly and recent segmental duplications within the human genome. *Nature* 2004; 431: 927-930.
283. Shendure J and Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 1135-1145.
284. Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB et al. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science* 2005; 309: 1728-1732.
285. Shimazaki H, Takiyama Y, Ishiura H, Sakai C, Matsushima Y, Hatakeyama H, Honda J, Sakoe K, Naoi T, Namekawa M, Fukuda Y, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Goto Y, Nakano I. Japan Spastic Paraplegia Research Consortium (JASPAC).; A homozygous mutation of C12orf65 causes spastic paraplegia with optic atrophy and neuropathy (SPG55). *J Med Genet*. 2012;49:777-784.
286. Shulman, L. M., David, N. J., Weiner, W. J. Psychosis as the initial manifestation of adult-onset Niemann-Pick disease type C. *Neurology* 45: 1739-1743, 1995.;
287. Sílvia Beà, Rafael Valdés-Mas, Alba Navarro, Itziar Salaverria, David Martín-Garcia, Pedro Jares, Eva Giné, Magda Pinyol, Cristina Royo, Ferran Nadeu, Laura Conde, Manel Juan, Guillem Clot, Pedro Vizán, Luciano Di Croce, Diana A. Puente, Mónica López-Guerra, Alexandra Moros, Gael Roue, Marta Aymerich, Neus Villamor, Lluís Colomo, Antonio Martínez, Alexandra Valera, José I. Martín-Subero, Virginia Amador, Luis Hernández, Maria Rozman, Anna Enjuanes, Pilar Forcada, Ana Muntañola, Elena M. Hartmann, María J. Calasanz, Andreas Rosenwald, German Ott, Jesús M. Hernández-Rivas, Wolfram Klapper, Reiner Siebert, Adrian Wiestner, Wyndham H. Wilson, Dolors Colomer, Armando López-Guillermo, Carlos LópezOtín, Xose S. Puente & Elias Campo, Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma, November 5, 2013 PNAS, vol. 110 no. 45:18250-18255, doi: 10.1073/pnas.1314608110
288. Simpson MA, Cross H, Proukakis C, Pryde A, Hershberger R, Chatonnet A, Patton MA, Crosby AH. Maspardin is mutated in mast syndrome, a complicated form of hereditary spastic paraplegia associated with dementia. *Am J Hum Genet*. 2003;73:1147-1156.
289. Slabicki M, Theis M, Krastev DB, Samsonov S, Mundwiller E, Junqueira M, Paszkowski-Rogacz M, Teyra J, Heninger AK, Poser I, Prieur F, Truchetto J, Confavreux C, Marelli C, Durr A, Camdessanche JP, Brice A, Shevchenko A, Pisabarro MT, Stevanin G, Buchholz F. A genome-scale DNA repair RNAi screen identifies SPG48 as a novel gene associated with hereditary spastic paraplegia. *PLoS Biol*. 2010;8:e1000408.
290. Slavotinek AM. Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays. *Hum Genet* 2008; 124: 1-17.
291. Solowska JM, Morfini G, Falnikar A, Himes BT, Brady ST, Huang D, Baas PW. Quantitative and functional analyses of spastin in the nervous system: implications for hereditary spastic paraplegia. *J Neurosci*. 2008;28:2147-2157.
292. Somerville, M. J., Mervis, C. B., Young, E. J., Seo, E.-J., del Campo, M., Bamforth, S., Peregrine, E., Loo, W., Lilley, M., Perez-Jurado, L. A., Morris, C. A., Scherer, S. W., Osborne, L. R. Severe expressive-language delay related to duplication of the Williams-Beuren locus. *New Eng. J. Med*. 353: 1694-1701, 2005.
293. Spiegel R, Raas-Rothschild A, Reish O, Regev M, Meiner V, Bargal R, Sury V, Meir K, Nadjari M, Hermann G, Iancu TC, Shalev SA, Zeigler M. 2009. The clinical spectrum of fetal Niemann-Pick type C. *Am J Med Genet Part A* 149A:446-450.
294. Steinmüller R, Lantigua-Cruz A, Garcia-Garcia R, Kostrzewa M, Steinberger D, Müller U. Evidence of a third locus in X-linked recessive spastic paraplegia. *Hum Genet*. 1997;100:287-289.

295. Stone EA, A Sidow. Physicochemical constraint violation by missense substitutions mediates impairment of protein function and disease severity. *Genome research* 15 (7), 978-986
296. Subramony SH, Nguyen TV, Langford L, Lin X, Parent AD, Zhang J. Identification of a new form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Clin Genet.* 2009;76:113–116.
297. Sunyaev, Shamil, Vasily Ramensky, Ina Koch, Warren Lathe III, Alexey S. Kondrashov and Peer Bork. Prediction of deleterious human alleles. *Hum. Mol. Genet.* 2001, 10(6): 591-597
298. Svenstrup K, Møller RS, Christensen J, Budtz-Jørgensen E, Gilling M, Nielsen JE. NIPA1 mutation in complex hereditary spastic paraplegia with epilepsy. *Eur J Neurol.* 2011;18:1197–1199.
299. Swinkels ME, Simons A, Smeets DF et al. Clinical and cytogenetic characterization of 13 Dutch patients with deletion 9p syndrome: Delineation of the critical region for a consensus phenotype. *Am J Med Genet A* 2008; 146A: 1430-1438.
300. Tamagaki A, Shima M, Tomita R, Okumura M, Shibata M, Morichika S, Kurahashi H, Giddings JC, Yoshioka A, Yokobayashi Y. Segregation of a pure form of spastic paraplegia and NOR insertion into Xq11.2. *Am J Med Genet.* 2000;94:5–8.
301. Tamary H1, Bar-Yam R, Shalmon L, Rachavi G, Krostichevsky M, Elhasid R, Barak Y, Kapelushnik J, Yaniv I, Auerbach AD, Zaizov R. Fanconi anaemia group A (FANCA) mutations in Israeli non-Ashkenazi Jewish patients. *Br J Haematol.* 2000;111(1):338-43.
302. Tang BS, Chen X, Zhao GH, Shen L, Yan XX, Jiang H, Luo W. Clinical features of hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum: report of 5 Chinese cases. *Chin Med J (Engl)* 2004;117:1002–1005.
303. Tarpey, P. S., Stevens, C., Teague, J., Edkins, S., O'Meara, S., Avis, T., Barthorpe, S., Buck, G., Butler, A., Cole, J., Dicks, E., Gray, K., et all. Mutations in the gene encoding the sigma 2 subunit of the adaptor protein 1 complex, AP1S2, cause X-linked mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* 2006, 79: 1119-1124.
304. Tesson C, Nawara M, Salih MA, Rossignol R, Zaki MS, Al Balwi M, Schule R, Mignot C, Obre E, Bouhouche A, Santorelli FM, Durand CM, Oteyza AC, El-Hachimi KH, Al Drees A, Bouslam N, Lamari F, Elmalik SA, Kabiraj MM, Seidahmed MZ, Esteves T, Gaussen M, Monin ML, Gyapay G, Lechner D, Gonzalez M, Depienne C, Mochel F, Lavie J, Schols L, Lacombe D, Yahyaoui M, Al Abdulkareem I, Zuchner S, Yamashita A, Benomar A, Goizet C, Durr A, Gleeson JG, Darios F, Brice A, Stevanin G. Alteration of fatty-acid-metabolizing enzymes affects mitochondrial form and function in hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet.* 2012;91:1051–1064.
305. Thomas Paul D., Michael J. Campbell, Anish Kejariwal, Huaiyu Mi, Brian Karlak, Robin Daverman, Karen Diemer, Anushya Muruganujan, and Apurva Narechania. PANTHER: A Library of Protein Families and Subfamilies Indexed by Function. *Genome Res.* 2003, 13: 2129-2141
306. Tomoeda, K., Awata, H., Matsuura, T., Matsuda, I., Ploechl, E., Milovac, T., Boneh, A., Scott, C. R., Danks, D. M., Endo, F. Mutations in the 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase gene are responsible for tyrosinemia type III and hawkinsinuria. *Molec. Genet. Metab.* 2000, 71: 506-510.
307. Tort, F., Garcia-Silva, M. T., Ferrer-Cortes, X., Navarro-Sastre, A., Garcia-Villoria, J., Coll, M. J., Vidal, E., Jimenez-Almazan, J., Dopazo, J., Briones, P., Elpeleg, O., Ribes, A. Exome sequencing identifies a new mutation in SERAC1 in a patient with 3-methylglutaconic aciduria. *Molec. Genet. Metab.* 2013, 110: 73-77.
308. Tran, V. K., Takeshima, Y., Zhang, Z., Habara, Y., Haginoya, K., Nishiyama, A., Yagi, M., Matsuo, M. A nonsense mutation-created intraexonic splice site is active in the lymphocytes, but not in the skeletal muscle of a DMD patient. *Hum. Genet* 2007, 120: 737-742,.
309. Tsaosidou MK, Ouahchi K, Warner TT, Yang Y, Simpson MA, Laing NG, Wilkinson PA, Madrid RE, Patel H, Hentati F, Patton MA, Hentati A, Lamont PJ, Siddique T, Crosby AH.

- Sequence alterations within CYP7B1 implicate defective cholesterol homeostasis in motor-neuron degeneration. *Am J Hum Genet.* 2008;82:510–515.
310. Turner, G., Gedeon, A., Kerr, B., Bennett, R., Mulley, J., Partington, M. Syndromic form of X-linked mental retardation with marked hypotonia in early life, severe mental handicap, and difficult adult behavior maps to Xp22. *Am. J. Med. Genet.* 2003, 117A: 245-250.
 311. Tuzun E, Sharp AJ, Bailey JA et al. Fine-scale structural variation of the human genome. *Nat Genet* 2005; 37: 727-732.
 312. Tyrer J, et al. A breast cancer prediction model incorporating familial and personal risk factors. *Stat Med* 2004; 23: 1111-1130
 313. Ullmann R, Turner G, Kirchhoff M et al: Array CGH identifies reciprocal 16p13.1 duplications and deletions that predispose to autism and/or mental retardation. *Hum Mutat* 2007; 28: 674–682.
 314. Valdmann PN, Meijer IA, Reynolds A, Lei A, MacLeod P, Schlesinger D, Zatz M, Reid E, Dion PA, Drapeau P, Rouleau GA. Mutations in the KIAA0196 gene at the SPG8 locus cause hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet.* 2007;80:152–161.
 315. Valente EM, Brancati F, Caputo V, Bertini E, Patrono C, Costanti D, Dallapiccola B. Novel locus for autosomal dominant pure hereditary spastic paraplegia (SPG19) maps to chromosome 9q33-q34. *Ann Neurol.* 2002;51:681–685.
 316. Van der Aa, N., Rooms, L., Vandeweyer, G., van den Ende, J., Reyniers, E., Fichera, M., Romano, C., Delle Chiaie, B., Mortier, G., Menten, B., Destree, A., Maystadt, I., and 18 others. Fourteen new cases contribute to the characterization of the 7q11.23 microduplication syndrome. *Europ. J. Med. Genet.* 52: 94-100, 2009.
 317. van Grunsven EG, van Berkel E, Ijlst L, Vreken P, de Klerk JB, Adamski J, Lemonde H, Clayton PT, Cuebas DA, Wanders RJ. Peroxisomal D-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: resolution of the enzyme defect and its molecular basis in bifunctional protein deficiency., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 3;95(5):2128-33.;
 318. van Grunsven EG, van Berkel E, Mooijer PA, Watkins PA, Moser HW, Suzuki Y, Jiang LL, Hashimoto T, Hoefler G, Adamski J, Wanders RJ. Peroxisomal bifunctional protein deficiency revisited: resolution of its true enzymatic and molecular basis. *Am J Hum Genet.* 1999 Jan;64(1):99-107.
 319. van Mil, S. W. C., van der Woerd, W. L., van der Brugge, G., Sturm, E., Jansen, P. L. M., Bull, L. N., van den Berg, I. E. T., Berger, R., Houwen, R. H. J., Klomp, L. W. J. Benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 is caused by mutations in ABCB11. *Gastroenterology* 127: 379-384, 2004
 320. Vandekerckhove, J., Weber, K. The complete amino acid sequence of actins from bovine aorta, bovine heart, bovine fast skeletal muscle, and rabbit slow skeletal muscle. *Differentiation* 14: 123-133, 1979.
 321. Vandewalle, J., Van Esch, H., Govaerts, K., Verbeeck, J., Zweir, C., Madrigal, I., Mila, M., Pijkels, E., Fernandez, I., Kohlase, J., Spaich, C., Rauch, A., Fryns, J.-P., Marynen, P., Froyen, G. Dosage-dependent severity of the phenotype in patients with mental retardation due to a recurrent copy-number gain at Xq28 mediated by an unusual recombination. *Am. J. Hum. Genet.* 85: 809-822, 2009.
 322. Vanier, M. T., Millat, G. Niemann-Pick disease type C. *Clin. Genet.* 64: 269-281, 2003.
 323. Vazza G, Zortea M, Boaretto F, Micaglio GF, Sartori V, Mostacciuolo ML. A new locus for autosomal recessive spastic paraplegia associated with mental retardation and distal motor neuropathy, SPG14, maps to chromosome 3q27-q28. *Am J Hum Genet.* 2000;67:504–509.
 324. Veltman JA, Jonkers Y, Nuijten I et al. Definition of a critical region on chromosome 18 for congenital aural atresia by arrayCGH. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 1578-1584.
 325. Verkerk AJ, Schot R, Dumee B, Schellekens K, Swagemakers S, Bertoli-Avella AM, Lequin MH, Dudink J, Govaert P, van Zwol AL, Hirst J, Wessels MW, Catsman-Berrevoets C, Verheijen FW, de Graaff E, de Coe IF, Kros JM, Willemsen R, Willems PJ, van der Spek PJ,

- Mancini GM. Mutation in the AP4M1 gene provides a model for neuroaxonal injury in cerebral palsy. *Am J Hum Genet.* 2009;85:40–52.
326. Vermeesch JR, Melotte C, Froyen G et al. Molecular karyotyping: array CGH quality criteria for constitutional genetic diagnosis. *J Histochem Cytochem* 2005; 53: 413-422
 327. Verny C, Guegen N, Desquiere V, Chevrollier A, Prundean A, Dubas F, Cassereau J, Ferre M, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Reynier P, Procaccio V. Hereditary spastic paraplegia-like disorder due to a mitochondrial ATP6 gene point mutation. *Mitochondrion.* 2011;11:70–75.
 328. Vissers LE, van Ravenswaaij CM, Admiraal R et al. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet* 2004; 36: 955-957.
 329. Voelkerding KV, Dames SA and Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem* 2009; 55: 641-658.
 330. Wang Y, Guo L, Cai SP, Dai M, Yang Q, Yu W, Yan N, Zhou X, Fu J, Guo X, Han P, Wang J, Liu X. Exome sequencing identifies compound heterozygous mutations in CYP4V2 in a pedigree with retinitis pigmentosa. *PLoS One.* 2012;7(5):e33673. doi: 10.1371/journal.pone.0033673. Epub 2012 May 31.;
 331. Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M et al. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature* 2008; 452: 872-876.
 332. Wijker M1, Morgan NV, Herterich S, van Berkel CG, Tipping AJ, Gross HJ, Gille JJ, Pals G, Savino M, Altay C, Mohan S, Dokal I, Cavenagh J, Marsh J, van Weel M, Ortega JJ, Schuler D, Samochatova E, Karwacki M, Bekassy AN, Abecasis M, Ebell W, Kwee ML, de Ravel T, CG Mathew, et al. Heterogeneous spectrum of mutations in the Fanconi anaemia group A gene. *Eur J Hum Genet.* 1999;7(1):52-9.
 333. Wilcken, B., Hammond, J. W., Howard, N., Bohane, T., Hocart, C., Halpern, B. Hawkinsinuria: a dominantly inherited defect of tyrosine metabolism with severe effects in infancy. *New Eng. J. Med.* 1981, 305: 865-869.
 334. Wilkinson PA, Crosby AH, Turner C, Patel H, Wood NW, Schapira AH, Warner TT. A clinical and genetic study of SPG5A linked autosomal recessive hereditary spastic paraplegia. *Neurology.* 2003;61:235–238.
 335. Wilkinson PA, Simpson MA, Bastaki L, Patel H, Reed JA, Kalidas K, Samilchuk E, Khan R, Warner TT, Crosby AH. A new locus for autosomal recessive complicated hereditary spastic paraplegia (SPG26) maps to chromosome 12p11.1-12q14. *J Med Genet.* 2005;42:80–82.
 336. Willing, M. C., Deschenes, S. P., Slayton, R. L., Roberts, E. J. Premature chain termination is a unifying mechanism for COL1A1 null alleles in osteogenesis imperfecta type I cell strains. *Am. J. Hum. Genet.* 59: 799-809, 1996.;
 337. Willing, M. C., Pruchno, C. J., Byers, P. H. Molecular heterogeneity in osteogenesis imperfecta type I. *Am. J. Med. Genet.* 45: 223-227, 1993.
 338. Windpassinger C, Auer-Grumbach M, Irobi J, Patel H, Petek E, Hörl G, Malli R, Reed JA, Dierick I, Verpoorten N, Warner TT, Proukakis C, Van den Bergh P, Verellen C, Van Maldergem L, Merlini L, De Jonghe P, Timmerman V, Crosby AH, Wagner K. Heterozygous missense mutations in BSCL2 are associated with distal hereditary motor neuropathy and Silver syndrome. *Nat Genet.* 2004;36:271–276.
 339. Winnard, A. V., Jia-Hsu, Y., Gibbs, R. A., Mendell, J. R., Burghes, A. H. M. Identification of a 2 base pair nonsense mutation causing a cryptic splice site in a DMD patient. *Hum. Molec. Genet.* 1992, 1: 645-646.
 340. Winner B, Uyanik G, Gross C, Lange M, Schulte-Mattler W, Schuierer G, Marienhagen J, Hehr U, Winkler J. Clinical progression and genetic analysis in hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum in spastic gait gene 11 (SPG11). *Arch Neurol.* 2004;61:117–121.
 341. Wong KK, deLeeuw RJ, Dosanjh NS et al. A comprehensive analysis of common copynumber variations in the human genome. *Am J Hum Genet* 2007; 80: 91-104.
 342. Wortmann, S. B., Vaz, F. M., Gardeitchik, T., Vissers, L. E. L. M., Renkema, G. H., Schuurs-Hoeijmakers, J. H. M., Kulik, W., Lammens, M., Christin, C., Kluijtmans, L. A. J.,

- Rodenburg, R. J., Nijtmans, L. G. J., and 22 others. Mutations in the phospholipid remodeling gene SERCA1 impair mitochondrial function and intracellular cholesterol trafficking and cause dystonia and deafness. *Nature Genet.* 2012, 44: 797-802.
343. Wright, J., Teraoka, S., Onengut, S., Tolun, A., Gatti, R. A., Ochs, H. D., Concannon, P. A high frequency of distinct ATM gene mutations in ataxia-telangiectasia. *Am. J. Hum. Genet.* 59: 839-846, 1996.
 344. Wynn, R. M., Davie, J. R., Chuang, J. L., Cote, C. D., Chuang, D. T. Impaired assembly of E1 decarboxylase of the branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex in type IA maple syrup urine disease. *J. Biol. Chem.* 273: 13110-13118, 1998.
 345. Xiaolin Zhu, Slavé Petrovski, Pingxing Xie, Elizabeth K. Ruzzo, Yi-Fan Lu, K. Melodi McSweeney, Bruria Ben-Zeev, Andreea Nissenkorn, Yair Anikster, Danit Oz-Levi, Ryan S. Dhindsa, Yuki Hitomi, Kelly Schoch, Rebecca C. Spillmann, Gali Heimer, Dina Marek-Yagel, Michal Tzadok, Yujun Han, Gordon Worley, Jennifer Goldstein, Yong-Hui Jiang, Doron Lancet, Elon Pras, Vandana Shashi, Duncan McHale, Anna C. Need, David B. Goldstein Whole-exome sequencing in undiagnosed genetic diseases: interpreting 119 trios *Genetics in Medicine* (2015) 17, 774–781 doi:10.1038/gim.2014.191
 346. Yang Y, Muzny DM, Reid JG, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med* 2013;369:1502–1511.;
 347. Yang Y, Muzny DM, Xia F, Niu Z, Person R, Ding Y, Ward P, Braxton A, Wang M, Buhay C, Veeraraghavan N, Hawes A, Chiang T, Leduc M, Beuten J, Zhang J, He W, Scull J, Willis A, Landsverk M, Craigen WJ, Bekheirnia MR, Stray-Pedersen A, Liu P, Wen S, Alcaraz W, Cui H, Walkiewicz M, Reid J, Bainbridge M, Patel A, Boerwinkle E, Beaudet AL, Lupski JR, Plon SE, Gibbs RA, Eng CM. Molecular Findings Among Patients Referred for Clinical Whole-Exome Sequencing. *JAMA.* 2014 Oct 18. doi: 10.1001/jama.2014.14601.;
 348. Ylikallio E, Johari M, Konovalova S, Moilanen JS, Kiuru-Enari S, Auranen M, Pajunen L, Tynnismaa H. Targeted next-generation sequencing reveals further genetic heterogeneity in axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathy and a mutation in HSPB1. *Eur J Hum Genet.* 2014 Apr;22(4):522-7. doi: 10.1038/ejhg.2013.190. Epub 2013 Aug 21.
 349. Ylstra B, van den Ijssel P, Carvalho B, Brakenhoff RH and Meijer GA. BAC to the future! or oligonucleotides: a perspective for micro array comparative genomic hybridization (array CGH). *Nucleic Acids Res* 2006; 34: 445-450.
 350. Yue, P., Melamud, E., and Moul, J. SNPs3D: candidate gene and SNP selection for association studies. *BMC Bioinformatics* 2006, 7, 166
 351. Zhao GH, Hu ZM, Shen L, Jiang H, Ren ZJ, Liu XM, Xia K, Guo P, Pan Q, Tang BS. A novel candidate locus on chromosome 11p14.1-p11.2 for autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Chin Med J (Engl)* 2008;121:430–434.
 352. Zhao X, Alvarado D, Rainier S, Lemons R, Hedera P, Weber CH, Tukel T, Apak M, Heiman-Patterson T, Ming L, Bui M, Fink JK. Mutations in a newly identified GTPase gene cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Nat Genet.* 2001;29:326–331.
 353. Zhu PP, Patterson A, Lavoie B, Stadler J, Shoeb M, Patel R, Blackstone C. Cellular localization, oligomerization, and membrane association of the hereditary spastic paraplegia 3A (SPG3A) protein atlastin. *J Biol Chem.* 2003;278:49063–71.
 354. Zhu PP, Soderblom C, Tao-Cheng JH, Stadler J, Blackstone C. SPG3A protein atlastin-1 is enriched in growth cones and promotes axon elongation during neuronal development. *Hum Mol Genet.* 2006;15:1343–53.
 355. Zivony-Elboun Y, Westbroek W, Kfir N, Savitzki D, Shoval Y, Bloom A, Rod R, Khayat M, Gross B, Samri W, Cohen H, Sonkin V, Freidman T, Geiger D, Fattal-Valevski A, Anikster Y, Waters AM, Kleta R, Falik-Zaccai TC. A founder mutation in Vps37A causes autosomal recessive complex hereditary spastic paraparesis. *J Med Genet.* 2012;49:462–472.

356. Zortea M, Vettori A, Trevisan CP, Bellini S, Vazza G, Armani M, Simonati A, Mostacciolo ML. Genetic mapping of a susceptibility locus for disc herniation and spastic paraplegia on 6q23.3-q24.1. *J Med Genet*. 2002;39:387–390.
357. Zuchner S, Kail ME, Nance MA, Gaskell PC, Svenson IK, Marchuk DA, Pericak-Vance MA, Ashley-Koch AE. A new locus for dominant hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 2p12. *Neurogenetics*. 2006a;7:127–129.
358. Zuchner S, Wang G, Tran-Viet KN, Nance MA, Gaskell PC, Vance JM, Ashley-Koch AE, Pericak-Vance MA. Mutations in the novel mitochondrial protein REEP1 cause hereditary spastic paraplegia type 31. *Am J Hum Genet*. 2006b;79:365–369.
359. Zweier C, Peippo MM, Hoyer J et al. Haploinsufficiency of TCF4 causes syndromal mental retardation with intermittent hyperventilation (Pitt-Hopkins syndrome). *Am J Hum Genet* 2007; 80: 994-1001

Приложение 1

Таблица №1А Гени включени в панела TruSight Cancer

<i>AIP</i>	<i>CEBPA</i>	<i>FANCA</i>	<i>KIT</i>	<i>PRF1</i>	<i>SLX4</i>
<i>ALK</i>	<i>CEP57</i>	<i>FANCB</i>	<i>MAX</i>	<i>PRKAR1A</i>	<i>SMAD4</i>
<i>APC</i>	<i>CHEK2</i>	<i>FANCC</i>	<i>MEN1</i>	<i>PTCH1</i>	<i>SMARCB1</i>
<i>ATM</i>	<i>CYLD</i>	<i>FANCD2</i>	<i>MET</i>	<i>PTEN</i>	<i>STK11</i>
<i>BAP1</i>	<i>DDB2</i>	<i>FANCE</i>	<i>MLH1</i>	<i>RAD51C</i>	<i>SUFU</i>
<i>BLM</i>	<i>DICER1</i>	<i>FANCF</i>	<i>MSH2</i>	<i>RAD51D</i>	<i>TMEM127</i>
<i>BMPR1A</i>	<i>DIS3L2</i>	<i>FANCG</i>	<i>MSH6</i>	<i>RB1</i>	<i>TP53</i>
<i>BRCA1</i>	<i>EGFR</i>	<i>FANCI</i>	<i>MUTYH</i>	<i>RECQL4</i>	<i>TSC1</i>
<i>BRCA2</i>	<i>EPCAM</i>	<i>FANCL</i>	<i>NBN</i>	<i>RET</i>	<i>TSC2</i>
<i>BRIP1</i>	<i>ERCC2</i>	<i>FANCM</i>	<i>NF1</i>	<i>RHBDF2</i>	<i>VHL</i>
<i>BUB1B</i>	<i>ERCC3</i>	<i>FH</i>	<i>NF2</i>	<i>RUNX1</i>	<i>WRN</i>
<i>CDC73</i>	<i>ERCC4</i>	<i>FLCN</i>	<i>NSD1</i>	<i>SBDS</i>	<i>WT1</i>
<i>CDH1</i>	<i>ERCC5</i>	<i>GATA2</i>	<i>PALB2</i>	<i>SDHAF2</i>	<i>XPA</i>
<i>CDK4</i>	<i>EXT1</i>	<i>GPC3</i>	<i>PHOX2B</i>	<i>SDHB</i>	<i>XPC</i>
<i>CDKN1C</i>	<i>EXT2</i>	<i>HNF1A</i>	<i>PMS1</i>	<i>SDHC</i>	
<i>CDKN2A</i>	<i>EZH2</i>	<i>HRAS</i>	<i>PMS2</i>	<i>SDHD</i>	

Таблица 3А Гени, включени в панела TruSight One

A2M	C1QC	CYP2C9	FZD9	IL3	MMP12	PGK1	SCT	TET1
A4GALT	C1QTNF5	CYP2D6	G6PC	IL31RA	MMP13	PGM1	SCUBE2	TEX14
A4GNT	C1R	CYP2D7P1	G6PC2	IL36RN	MMP14	PGR	SDC3	TF
AAAS	C1S	CYP2E1	G6PC3	IL4	MMP2	PGRMC1	SDCCAG8	TFAM
AADAC	C2	CYP2F1	G6PD	IL4R	MMP20	PHB	SDHA	TFAP2A
AADACL2	C2orf71	CYP2G1P	GAA	IL5	MMP3	PHEX	SDHAF1	TFAP2B
AANAT	C3	CYP2J2	GAB2	IL6	MMP7	PHF11	SDHAF2	TFB1M
AARS	C3AR1	CYP2R1	GABBR1	IL6R	MMP8	PHF2	SDHB	TFCP2
AARS2	C4A	CYP2W1	GABRA1	IL7	MMP9	PHF3	SDHC	TFF1
AASS	C4B	CYP3A4	GABRA5	IL7R	MNX1	PHF6	SDHD	TFPI
ABAT	C4BPA	CYP3A43	GABRA6	IL8	MOCOS	PHF8	SEC23A	TFR2
ABCA1	C5	CYP3A5	GABRB3	IL9	MOCS1	PHGDH	SEC23B	TFRC
ABCA10	C5AR2	CYP3A5P1	GABRD	IL9R	MOCS2	PHIP	SEC63	TG
ABCA12	C5orf42	CYP3A7	GABRG1	ILDR1	MOG	PHKA1	SECISBP2	TGFB1
ABCA13	C6	CYP46A1	GABRG2	ILK	MOGS	PHKA2	SEL1L	TGFB2
ABCA2	C6orf15	CYP4A11	GABRG3	IMMP2L	MOK	PHKB	SELE	TGFB3
ABCA3	C7	CYP4A22	GABRR2	IMMT	MPDU1	PHKG2	SELL	TGFBI
ABCA4	C7orf10	CYP4B1	GAD1	IMPA2	MPDZ	PHLDA2	SELP	TGFBR1
ABCA7	C8A	CYP4F12	GAD2	IMPAD1	MPG	PHLPP2	SELPLG	TGFBR2
ABCB1	C8B	CYP4F2	GADD45B	IMPDH1	MPHOSPH 8	PHOX2A	SEMA3A	TGFBR3
ABCB11	C8orf37	CYP4F22	GAK	IMPDH2	MPI	PHOX2B	SEMA3E	TGFBRAP1
ABCB4	C9	CYP4F3	GAL3ST3	IMPG2	MPL	PHYH	SEMA4A	TGIF1
ABCB6	C9orf72	CYP4V2	GALC	INF2	MPLKIP	PI3	SEMA4C	TGM1
ABCB7	CA1	CYP7A1	GALE	INHA	MPO	PICALM	SEMA4G	TGM2
ABCC1	CA12	CYP7B1	GALK1	INMT	MPP3	PICK1	SEMA6D	TGM5
ABCC11	CA2	CYSLTR1	GALNS	INPP4A	MPP4	PIEZO2	SEMG1	TGM6
ABCC2	CA4	CYSLTR2	GALNT12	INS	MPP6	PIF1	SEP15	TH
ABCC3	CA6	D2HGDH	GALNT18	INSIG1	MPP7	PIGA	SEPN1	THADA
ABCC4	CA8	DAG1	GALNT2	INSIG2	MPST	PIGL	SEPP1	THAP1
ABCC6	CABIN1	DAO	GALNT3	INSL3	MPV17	PIGM	SEPSECS	THBD
ABCC8	CABP4	DAOA	GALNT9	INSL6	MPZ	PIGN	SEPT12	THBS1
ABCC9	CACNA1A	DAPK1	GALNTL5	INSR	MR1	PIGO	SEPT9	THBS2
ABCD1	CACNA1C	DARC	GALP	INVS	MRAP	PIGR	SERPINA1	THBS4
ABCD3	CACNA1D	DARS2	GALT	IQCB1	MRC1	PIGV	SERPINA10	THPO
ABCD4	CACNA1E	DAZ1	GAMT	IQGAP1	MRE11A	PIK3C2G	SERPINA3	THRA
ABCG1	CACNA1F	DAZ2	GAN	IQGAP2	MRPL3	PIK3C3	SERPINA6	THRB
ABCG2	CACNA1G	DAZ3	GAP43	IQGAP3	MRPL48	PIK3CA	SERPINA7	THSD7A
ABCG5	CACNA1H	DAZL	GARS	IQSEC2	MRPS16	PIK3CB	SERPINB11	TICAM1
ABCG8	CACNA1S	DBH	GAS1	IRAK1	MRPS22	PIK3CD	SERPINB3	TIMM44

ABHD12	CACNA2D1	DBI	GAS2L2	IRAK3	MRRF	PIK3CG	SERPINB5	TIMM8A
ABHD5	CACNA2D3	DBT	GAS6	IRAK4	MS4A1	PIK3R1	SERPINB6	TIMP1
ABI3BP	CACNA2D4	DCAF13	GATA1	IRF1	MS4A12	PIK3R2	SERPINC1	TIMP2
ABO	CACNB2	DCAF17	GATA2	IRF2	MS4A2	PIK3R4	SERPIND1	TIMP3
ACACA	CACNB4	DCC	GATA3	IRF4	MS4A3	PIK3R5	SERPINE1	TINAG
ACACB	CACNG2	DCDC2	GATA4	IRF5	MS4A6A	PIKFYVE	SERPINF1	TINF2
ACAD8	CADM1	DCK	GATA6	IRF6	MS4A6E	PIN1	SERPINF2	TIRAP
ACAD9	CALCA	DCLK1	GATAD1	IRF7	MSH2	PINK1	SERPING1	TJP2
ACADL	CALCR	DCLRE1C	GATM	IRF8	MSH3	PIP4K2A	SERPINH1	TK2
ACADM	CALHM1	DCN	GBA	IRGM	MSH4	PIP5K1B	SERPINI1	TLK1
ACADS	CALM1	DCP1B	GBA3	IRS1	MSH5	PIP5K1C	SERPINI2	TLL1
ACADSB	CALM3	DCTD	GBE1	IRS2	MSH6	PITPNM3	SERTAD1	TLR1
ACADVL	CALR	DCTN1	GBGT1	IRS4	MSMB	PITX1	SESN2	TLR10
ACAN	CALR3	DCX	GC	IRX4	MSMO1	PITX2	SETBP1	TLR2
ACAT1	CAMK4	DCXR	GCDH	IRX5	MSR1	PITX3	SETD2	TLR3
ACAT2	CAMKK1	DDAH1	GCGR	ISCU	MSRB3	PIWIL3	SETD8	TLR4
ACBD5	CAMKK2	DDAH2	GCH1	ISL1	MST1	PKD1	SETDB2	TLR5
ACBD6	CAMP	DDB2	GCK	ISPD	MST1R	PKD1L1	SETX	TLR6
ACCS	CAMTA1	DDC	GCKR	ISYNA1	MSTN	PKD2	SEZ6	TLR7
ACE	CANT1	DDOST	GCLC	ITCH	MSX1	PKHD1	SEZ6L2	TLR8
ACHE	CAPN10	DDR1	GCLM	ITGA11	MSX2	PKLR	SF3B4	TLR9
ACLY	CAPN13	DDR2	GCM2	ITGA2	MT1A	PKM	SFTPA1	TM4SF19
ACO2	CAPN3	DDX11	GCNT2	ITGA2B	MT2A	PKN3	SFTPA2	TMC1
ACOX1	CARD14	DDX20	GCSH	ITGA3	MTAP	PKP1	SFTPB	TMC6
ACP5	CARD8	DDX25	GDAP1	ITGA4	MTCH2	PKP2	SFTPC	TMC8
ACSF3	CARD9	DDX39B	GDF1	ITGA6	MTFMT	PLA2G10	SFTPD	TMCO1
ACSL4	CARTPT	DDX3Y	GDF15	ITGA7	MTHFD1	PLA2G2A	SGCA	TMEM114
ACSL5	CASC16	DDX5	GDF3	ITGA9	MTHFD1L	PLA2G2D	SGCB	TMEM126A
ACSM2B	CASC5	DDX53	GDF5	ITGAE	MTHFR	PLA2G4A	SGCD	TMEM127
ACSM3	CASK	DDX58	GDF6	ITGAM	MTHFS	PLA2G4C	SGCE	TMEM135
ACTA1	CASP1	DEAF1	GDF9	ITGB2	MTM1	PLA2G5	SGCG	TMEM138
ACTA2	CASP10	DEC1	GDI1	ITGB3	MTMR14	PLA2G6	SGK1	TMEM165
ACTB	CASP12	DECR1	GNF	ITGB4	MTMR2	PLA2G7	SGK110	TMEM173
ACTC1	CASP2	DEFB1	GEMIN2	ITIH1	MTMR9	PLAGL1	SGK223	TMEM185A
ACTG1	CASP3	DEFB126	GEMIN4	ITIH3	MTNR1A	PLAT	SGSH	TMEM187
ACTN2	CASP5	DEFB4A	GFAP	ITIH4	MTNR1B	PLAU	SH2B1	TMEM2
ACTN3	CASP8	DES	GFER	ITIH6	MTO1	PLAUR	SH2B3	TMEM216
ACTN4	CASP9	DFNA5	GFI1	ITK	MTPAP	PLCB1	SH2D1A	TMEM237
ACVR1	CASQ2	DFNB31	GFI1B	ITM2B	MTR	PLCB4	SH3BP2	TMEM39A
ACVR1B	CASR	DFNB59	GFM1	ITPA	MTRR	PLCD1	SH3GL1	TMEM43
ACVR1C	CAST	DGAT1	GFPT1	ITPKC	MTTP	PLCE1	SH3PXD2B	TMEM67
ACVR2B	CAT	DGCR14	GFPT2	ITPR1	MTUS1	PLCG2	SH3TC2	TMEM70
ACVRL1	CATSPER1	DGCR2	GFRA1	ITPR3	MUC1	PLCZ1	SHANK2	TMEM8A

ACY1	CATSPER2	DGCR5	GGCX	ITSN2	MUC13	PLD2	SHANK3	TMEM9
ADA	CATSPER3	DGCR6	GGH	IVD	MUC2	PLEC	SHBG	TMIE
ADAM10	CATSPER4	DGCR8	GGT5	IYD	MUC3A	PLEKHG4	SHFM1	TMLHE
ADAM12	CAV1	DGKD	GH1	JAG1	MUC4	PLEKHG5	SHH	TMPO
ADAM17	CAV3	DGUOK	GH2	JAG2	MUC5B	PLEKHM1	SHMT1	TMPRSS11A
ADAM19	CBFB	DHCR24	GHR	JAK2	MUC6	PLG	SHOC2	TMPRSS15
ADAM33	CBL	DHCR7	GHRH	JAK3	MUC7	PLIN1	SHOX	TMPRSS3
ADAM7	CBLB	DHDDS	GHRHR	JAM3	MURC	PLIN4	SHROOM3	TMPRSS4
ADAM9	CBR1	DHFR	GHRL	JMJD1C	MUSK	PLN	SHROOM4	TMPRSS5
ADAMTS10	CBR3	DHH	GHSR	JPH2	MUT	PLOD1	SI	TMPRSS6
ADAMTS13	CBS	DHODH	GIF	JPH3	MUTYH	PLOD2	SIAE	TNC
ADAMTS16	CBX2	DHRS4L1	GIGYF2	JRK	MVK	PLOD3	SIGLEC12	TNF
ADAMTS17	CBX4	DHX16	GIMAP8	JUN	MX1	PLP1	SIGLEC14	TNFAIP2
ADAMTS18	CC2D1A	DHX36	GIP	JUP	MYB	PLP2	SIGLEC16	TNFAIP3
ADAMTS2	CC2D2A	DHX37	GIPC3	KAL1	MYBL2	PLTP	SIGMAR1	TNFRSF10A
ADAMTSL2	CCBE1	DIABLO	GIPR	KALRN	MYBPC1	PLXND1	SIL1	TNFRSF10B
ADAMTSL3	CCDC103	DIAPH1	GIT1	KANK1	MYBPC3	PMAIP1	SIM1	TNFRSF11A
ADAMTSL4	CCDC14	DIAPH2	GJA1	KANSL1	MYC	PML	SIPA1	TNFRSF11B
ADAR	CCDC170	DIAPH3	GJA3	KARS	MYCL	PMM2	SIRT1	TNFRSF13B
ADARB1	CCDC22	DICER1	GJA4	KAT6B	MYCN	PMP22	SIRT3	TNFRSF13C
ADC	CCDC28B	DIO1	GJA5	KATNAL2	MYD88	PMPCA	SIRT5	TNFRSF1A
ADCK3	CCDC39	DIO2	GJA8	KBTBD13	MYF6	PMS1	SIX1	TNFRSF1B
ADCY10	CCDC40	DIP2A	GJB1	KCNA1	MYH11	PMS2	SIX2	TNFRSF25
ADCY3	CCDC50	DIP2B	GJB2	KCNA3	MYH13	PMS2P3	SIX3	TNFRSF4
ADCY5	CCDC8	DIP2C	GJB3	KCNA5	MYH14	PNKD	SIX5	TNFSF10
ADCY6	CCDC88C	DIRC2	GJB4	KCNAB2	MYH15	PNKP	SIX6	TNFSF11
ADCY9	CCHCR1	DIS3L2	GJB6	KCNC3	MYH2	PNMT	SKI	TNFSF13B
ADCYAP1	CCK	DISC1	GJC2	KCND2	MYH3	PNP	SKIV2L	TNFSF14
ADD1	CCKAR	DISP1	GJC3	KCND3	MYH6	PNPLA1	SLBP	TNFSF15
ADH1B	CCKBR	DKC1	GJD2	KCNE1	MYH7	PNPLA2	SLC10A1	TNFSF4
ADH1C	CCL11	DKK2	GK	KCNE1L	MYH8	PNPLA3	SLC10A2	TNFSF8
ADH4	CCL13	DKK3	GLA	KCNE2	MYH9	PNPLA6	SLC11A1	TNKS
ADH5	CCL17	DLAT	GLB1	KCNE3	MYL2	PNPO	SLC11A2	TNNC1
ADH7	CCL2	DLD	GLCCI1	KCNE4	MYL3	POF1B	SLC12A1	TNNI2
ADIPOQ	CCL22	DLG3	GLDC	KCNH2	MYLIP	POGZ	SLC12A3	TNNI3
ADIPOR1	CCL26	DLG5	GLE1	KCNIP4	MYLK	POLB	SLC12A6	TNNI3K
ADK	CCL3L1	DLGAP2	GLI1	KCNJ1	MYLK2	POLD1	SLC13A2	TNNT1
ADM	CCL4L1	DLGAP3	GLI2	KCNJ10	MYO15A	POLE2	SLC14A1	TNNT2
ADNP	CCL5	DLL1	GLI3	KCNJ11	MYO18B	POLG	SLC14A2	TNNT3
ADORA1	CCL7	DLL3	GLIS2	KCNJ13	MYO1A	POLG2	SLC15A1	TNP1

ADORA2A	CCM2	DLX3	GLIS3	KCNJ15	MYO1C	POLH	SLC16A1	TNR
ADORA3	CCNA2	DLX5	GLMN	KCNJ2	MYO1E	POLL	SLC16A12	TNS3
ADRA1A	CCND1	DLX6	GLO1	KCNJ3	MYO1F	POLR1C	SLC16A2	TNXB
ADRA2A	CCR1	DMBT1	GLP1R	KCNJ5	MYO3A	POLR1D	SLC16A3	TOMM40
ADRA2B	CCR2	DMC1	GLRA1	KCNJ6	MYO5A	POLR2E	SLC17A1	TOP1MT
ADRA2C	CCR3	DMD	GLRB	KCNJ8	MYO5B	POLR2M	SLC17A3	TOPBP1
ADRB1	CCR5	DMGDH	GLRX5	KCNJ9	MYO6	POLR3A	SLC17A5	TOPORS
ADRB2	CCR6	DMP1	GLS	KCNK18	MYO7A	POLR3B	SLC17A8	TOR1A
ADRB3	CCR7	DMPK	GLTSCR1	KCNK6	MYO7B	POLRMT	SLC18A1	TOX3
ADRBK2	CCRL2	DMRT1	GLUD1	KCNK9	MYO9B	POMC	SLC19A1	TP53
ADSL	CCT5	DMXL1	GLUD2	KCNMA1	MYOC	POMGNT1	SLC19A2	TP53AIP1
ADTRP	CD109	DNAAF1	GLUL	KCNMB1	MYOCD	POMP	SLC19A3	TP53BP1
AFF2	CD14	DNAAF2	GLYCTK	KCNMB3	MYOM1	POMT1	SLC1A1	TP53I3
AFF3	CD151	DNAAF3	GM2A	KCNN3	MYOT	POMT2	SLC1A2	TP53RK
AFG3L2	CD177	DNAH11	GMIP	KCNQ1	MYOZ2	PON1	SLC1A3	TP63
AFP	CD19	DNAH5	GNA14	KCNQ2	MYPN	PON2	SLC20A2	TP73
AGA	CD1A	DNAH9	GNAI2	KCNQ3	MYT1	PON3	SLC22A1	TPCN2
AGBL4	CD1E	DNAI1	GNAQ	KCNQ4	MYT1L	POP1	SLC22A11	TPH1
AGER	CD207	DNAI2	GNAS	KCNS1	NAA10	POR	SLC22A12	TPH2
AGGF1	CD209	DNAJA4	GNAS-AS1	KCNS3	NAGA	PORCN	SLC22A14	TP11
AGK	CD22	DNAJB2	GNAT1	KCNV2	NAGLU	POU1F1	SLC22A2	TPK1
AGL	CD226	DNAJB6	GNAT2	KCTD13	NAGPA	POU3F4	SLC22A3	TPM1
AGMO	CD24	DNAJC19	GNB1L	KCTD7	NAGS	POU4F3	SLC22A4	TPM2
AGO1	CD244	DNAJC5	GNB3	KDM4C	NAIP	POU5F1	SLC22A5	TPM3
AGO2	CD247	DNAJC6	GNB5	KDM5A	NAMPT	POU5F1B	SLC22A6	TPMT
AGPAT2	CD27	DNAL1	GNE	KDM5C	NAPRT1	POU6F2	SLC22A9	TPO
AGPS	CD2AP	DNASE1	GNMT	KDM5D	NARS2	PPARA	SLC23A1	TPP1
AGRN	CD320	DNASE1L3	GNPAT	KDM6A	NAT1	PPARD	SLC24A1	TPP2
AGRP	CD36	DNASE2	GNPTAB	KDM6B	NAT2	PPARG	SLC24A2	TPRN
AGT	CD38	DND1	GNPTG	KDR	NAT8L	PPARGC1A	SLC24A5	TPSB2
AGTR1	CD3D	DNM1	GNRH1	KEL	NAV2	PPARGC1B	SLC25A12	TPTE
AGTR2	CD3E	DNM1L	GNRHR	KERA	NBAS	PPAT	SLC25A13	TRAC
AGXT	CD3EAP	DNM2	GNS	KHDC3L	NBEA	PPIA	SLC25A15	TRADD
AGXT2	CD3G	DNMT1	GOLGA3	KHK	NBEAL2	PPIB	SLC25A19	TRAF3
AHCY	CD4	DNMT3A	GOLGA5	KIAA0100	NBN	PPIG	SLC25A20	TRAF3IP1
AHI1	CD40	DNMT3B	GON4L	KIAA0196	NBPF1	PPM1D	SLC25A22	TRAF3IP2
AHR	CD40LG	DNMT3L	GORAB	KIAA0226	NCALD	PPOX	SLC25A3	TRAF6
AHRR	CD44	DOC2A	GOSR2	KIAA0232	NCAM1	PPP1R1A	SLC25A38	TRAK2
AHSG	CD46	DOCK3	GOT1	KIAA0319	NCAN	PPP1R3A	SLC25A39	TRAPPC10
AHSP	CD5	DOCK4	GP1BA	KIAA0513	NCAPD2	PPP1R3C	SLC25A4	TRAPPC2
AICDA	CD55	DOCK6	GP1BB	KIAA1033	NCF1	PPP2R1A	SLC26A1	TRAPPC9
AIF1	CD58	DOCK8	GP2	KIAA1199	NCF2	PPP2R1B	SLC26A10	TRB
AIFM1	CD59	DOCK9	GP6	KIAA1279	NCF4	PPP2R2B	SLC26A2	TRBV9

AIMP1	CD72	DOK7	GP9	KIAA1377	NCKAP1	PPP2R2C	SLC26A3	TRDN
AIP	CD79A	DOLK	GPAM	KIAA1432	NCOA1	PPT1	SLC26A4	TREM2
AIPL1	CD79B	DPAGT1	GPANK1	KIAA1462	NCOA3	PQBP1	SLC26A5	TRERF1
AIRE	CD81	DPM1	GPATCH8	KIAA2022	NCR3	PRB1	SLC26A6	TREX1
AK1	CD86	DPM3	GPBAR1	KIF11	NCS1	PRB3	SLC26A9	TRHR
AK2	CD8A	DPP10	GPC3	KIF17	NCSTN	PRB4	SLC27A4	TRIB1
AKAP10	CD96	DPP6	GPC4	KIF18A	NDE1	PRCD	SLC27A5	TRIB3
AKAP13	CDA	DPY19L2	GPC6	KIF1A	NDN	PRCP	SLC28A1	TRIL
AKAP2	CDAN1	DPYD	GPD1	KIF1B	NDOR1	PRDM2	SLC28A2	TRIM17
AKAP9	CDC42BPB	DPYS	GPD1L	KIF21A	NDP	PRDM5	SLC28A3	TRIM21
AKR1B1	CDC6	DPYSL2	GPD2	KIF22	NDRG1	PRDM9	SLC29A1	TRIM22
AKR1C2	CDC73	DRD1	GPHN	KIF5A	NDST1	PREPL	SLC29A2	TRIM32
AKR1C3	CDH1	DRD2	GPI	KIF5B	NDUFA1	PRF1	SLC29A3	TRIM37
AKR1C4	CDH12	DRD3	GPIHBP1	KIF6	NDUFA10	PRG4	SLC29A4	TRIM5
AKR1D1	CDH13	DRD4	GPR1	KIF7	NDUFA11	PRICKLE1	SLC2A1	TRIO
AKR7A2	CDH15	DRD5	GPR12	KIFAP3	NDUFA12	PRICKLE2	SLC2A10	TRIOBP
AKR7A3	CDH23	DROSHA	GPR139	KIR2DL1	NDUFA13	PRKAA2	SLC2A2	TRIP11
AKT1	CDH3	DRP2	GPR143	KIR2DL3	NDUFA2	PRKACA	SLC2A4	TRIP12
AKT2	CDH5	DSC2	GPR179	KIR2DL4	NDUFA4	PRKAG2	SLC2A9	TRMT1
AKT3	CDH8	DSC3	GPR33	KIR3DL1	NDUFA6	PRKAG3	SLC30A10	TRMU
ALAD	CDHR1	DSCAM	GPR55	KIR3DL2	NDUFA7	PRKAR1A	SLC30A2	TRD
ALAS2	CDK11A	DSCR8	GPR56	KIRREL3	NDUFA8	PRKCB	SLC30A5	TROAP
ALB	CDK4	DSG1	GPR68	KISS1	NDUFA9	PRKCG	SLC30A8	TROVE2
ALCAM	CDK5R1	DSG2	GPR98	KISS1R	NDUFAP1	PRKCH	SLC31A1	TRPA1
ALDH16A1	CDK5RAP2	DSG4	GPS1	KIT	NDUFAP2	PRKCSH	SLC33A1	TRPC3
ALDH18A1	CDK5RAP3	DSP	GPSM2	KITLG	NDUFAP3	PRKD3	SLC34A1	TRPC4
ALDH1A1	CDK7	DSPP	GPT	KL	NDUFAP4	PRKDC	SLC34A2	TRPC5
ALDH1A2	CDKL3	DST	GPX1	KLB	NDUFAP5	PRKRA	SLC34A3	TRPC6
ALDH2	CDKL5	DTNA	GPX4	KLF1	NDUFAP6	PRL	SLC35A1	TRPM1
ALDH3A2	CDKN1A	DTNBP1	GRB10	KLF10	NDUFAP7	PRLHR	SLC35C1	TRPM2
ALDH4A1	CDKN1B	DUOX2	GREM1	KLF11	NDUFB1	PRLR	SLC35D1	TRPM3
ALDH5A1	CDKN1C	DUOX2	GRHL2	KLF5	NDUFB3	PRM1	SLC35G2	TRPM4
ALDH6A1	CDKN2A	DUSP23	GRHPR	KLF6	NDUFB6	PRM2	SLC36A2	TRPM6
ALDH7A1	CDKN2B	DUX4	GRIA3	KLF7	NDUFB9	PRMT10	SLC37A4	TRPM7
ALDOA	CDKN2B-AS1	DXO	GRID1	KLHDC8B	NDUFC2	PRMT3	SLC39A13	TRPS1
ALDOB	CDKN2C	DYM	GRIK1	KLHL10	NDUFS1	PRMT7	SLC39A4	TRPV1
ALG1	CDON	DYNC1H1	GRIK2	KLHL3	NDUFS2	PRND	SLC3A1	TRPV3
ALG10B	CDSN	DYNC2H1	GRIK3	KLHL7	NDUFS3	PRNP	SLC40A1	TRPV4
ALG11	CDT1	DYRK1A	GRIK4	KLHL9	NDUFS4	PROC	SLC41A1	TRPV5
ALG12	CDY1	DYSF	GRIN1	KLK1	NDUFS5	PROCR	SLC44A2	TRRAP
ALG13	CDY2A	DYX1C1	GRIN2A	KLK12	NDUFS6	PRODH	SLC45A2	TSC1
ALG2	CEACAM16	DYX1C1-CCPG1	GRIN2B	KLK15	NDUFS7	PROK1	SLC46A1	TSC2

ALG3	CEBPA	EARS2	GRIN3A	KLK3	NDUFS8	PROK2	SLC47A1	TSEN2
ALG6	CEBPE	EBAG9	GRIP1	KLK4	NDUFV1	PROKR1	SLC47A2	TSEN34
ALG8	CEL	EBP	GRK1	KLK7	NDUFV2	PROKR2	SLC4A1	TSEN54
ALG9	CELSR1	ECE1	GRK4	KLKB1	NDUFV3	PROM1	SLC4A10	TSFM
ALK	CENPJ	ECI1	GRK5	KLRK1	NEB	PROP1	SLC4A11	TSHB
ALMS1	CEP135	ECM1	GRM1	KMT2C	NEBL	PROS1	SLC4A3	TSHR
ALOX12	CEP152	ECM2	GRM3	KMT2D	NEDD4L	PROZ	SLC4A4	TSHZ1
ALOX12B	CEP290	ECSIT	GRM5	KMT2E	NEDD9	PRPF3	SLC52A1	TSLP
ALOX15	CEP41	EDA	GRM6	KNG1	NEFH	PRPF31	SLC52A3	TSPAN12
ALOX5	CEP57	EDA2R	GRM7	KPNA1	NEFL	PRPF6	SLC5A1	TSPAN17
ALOX5AP	CEP63	EDAR	GRM8	KRAS	NEFM	PRPF8	SLC5A11	TSPAN7
ALOXE3	CEP68	EDARADD	GRN	KRIT1	NEGR1	PRPH	SLC5A2	TSPO
ALPL	CEP85L	EDN1	GRPR	KRT1	NEIL1	PRPH2	SLC5A5	TSPYL1
ALS2	CER1	EDN2	GRXCR1	KRT10	NEIL2	PRPS1	SLC5A7	TSSC4
ALS2CL	CERKL	EDN3	GSC	KRT12	NEK1	PRRC2A	SLC6A1	TSSK2
ALX1	CERS6	EDNRA	GSDMA	KRT13	NEK8	PRRT2	SLC6A11	TSSK3
ALX3	CES1	EDNRB	GSDMB	KRT14	NELFA	PRRX1	SLC6A12	TSSK4
ALX4	CES2	EEF1B2	GSE1	KRT16	NELL1	PRSS1	SLC6A13	TST
AMACR	CETP	EEF2K	GSK3B	KRT17	NEU1	PRSS12	SLC6A14	TTBK2
AMELX	CFB	EFCAB5	GSN	KRT18	NEU2	PRSS2	SLC6A18	TTC19
AMELY	CFC1	EFEMP1	GSPT1	KRT2	NEUROD1	PRSS3P2	SLC6A19	TTC21B
AMER1	CFD	EFEMP2	GSPT2	KRT3	NEUROG3	PRSS56	SLC6A2	TTC37
AMH	CFH	EFHC1	GSR	KRT31	NEXN	PRSS8	SLC6A20	TTC8
AMHR2	CFHR1	EFHC2	GSS	KRT37	NF1	PRX	SLC6A3	TTI2
AMN	CFHR2	EFNB1	GSTA1	KRT38	NF2	PRY	SLC6A4	TTLL11
AMPD1	CFHR3	EFR3A	GSTA2	KRT4	NFATC4	PRY2	SLC6A5	TTN
AMPD3	CFHR4	EFTUD2	GSTA3	KRT5	NFE2L2	PSAP	SLC6A8	TTPA
AMT	CFHR5	EGF	GSTK1	KRT6A	NFIA	PSAT1	SLC7A1	TTR
ANAPC1	CFI	EGFR	GSTM1	KRT6B	NFIX	PSCA	SLC7A10	TTY13
ANG	CFL2	EGLN1	GSTM3	KRT6C	NFKB1	PSEN1	SLC7A2	TUBA1A
ANGPT1	CFLAR	EGR2	GSTM4	KRT74	NFKBIA	PSEN2	SLC7A5	TUBA8
ANGPTL3	CFP	EGR3	GSTO1	KRT75	NFKBIL1	PSENEN	SLC7A7	TUBB1
ANGPTL4	CFTR	EHD2	GSTO2	KRT8	NFU1	PSMA6	SLC7A9	TUBB2B
ANGPTL5	CGA	EHMT1	GSTP1	KRT81	NGF	PSMB8	SLC8A1	TUBB3
ANK1	CGB	EHMT2	GSTT1	KRT83	NGFR	PSMB9	SLC9A3R1	TUBGCP4
ANK2	CHAT	EIF2AK3	GSTT2	KRT85	NHEJ1	PSMC3IP	SLC9A6	TUBGCP5
ANK3	CHD1L	EIF2B1	GSTT2B	KRT86	NHLRC1	PSMD7	SLC9A9	TUBGCP6
ANKH	CHD2	EIF2B2	GSTZ1	KRT9	NHP2	PSPH	SLC01A2	TUFM
ANKK1	CHD3	EIF2B3	GTDC2	KRTAP1-1	NHS	PSPN	SLC01B1	TULP1
ANKRD1	CHD6	EIF2B4	GTF2E1	KYNU	NID1	PSTPIP1	SLC01B3	TULP3
ANKRD11	CHD7	EIF2B5	GTF2H1	L1CAM	NINJ1	PTAFR	SLC01C1	TUSC3
ANKRD26	CHD8	EIF3H	GTF2H5	L2HGDH	NIPA1	PTCD1	SLC02A1	TWIST1
ANKS1A	CHDH	EIF4E	GTF2IRD1	L3MBTL1	NIPAL4	PTCH1	SLC02B1	TWIST2

ANKS1B	CHEK2	EIF4G1	GTF2IRD2	LAMA1	NIPBL	PTCH2	SLFN5	TXN2
ANO10	CHFR	ELAC2	GUCA1A	LAMA2	NIPSNAP1	PTCHD1	SLIT3	TXNRD2
ANO5	CHGA	ELANE	GUCA1B	LAMA3	NIPSNAP3A	PTCHD3	SLITRK1	TYK2
ANO6	CHGB	ELAVL2	GUCY2C	LAMA4	NKAIN2	PTCSC3	SLURP1	TYMP
ANO7	CHI3L1	ELF4	GUCY2D	LAMA5	NKX2-1	PTEN	SLX4	TYMS
ANTXR1	CHI3L2	ELK1	GUSB	LAMB1	NKX2-3	PTF1A	SMAD1	TYR
ANTXR2	CHIA	ELN	GYG1	LAMB2	NKX2-5	PTGDR	SMAD2	TYROBP
ANXA11	CHIT1	ELOVL4	GYTL1B	LAMB3	NKX2-6	PTGDR2	SMAD3	TYRP1
ANXA5	CHKB	ELP2	GYPA	LAMC1	NKX3-1	PTGDS	SMAD4	UBA1
AOAH	CHL1	ELP4	GYPB	LAMC2	NKX3-2	PTGER2	SMAD6	UBA3
AOC1	CHM	EMC4	GYPC	LAMC3	NLGN1	PTGER4	SMAD7	UBAC2
AP1S1	CHMP2B	EMD	GYPE	LAMP2	NLGN2	PTGES2	SMAD9	UBD
AP1S2	CHMP4B	EME1	GYS1	LAMTOR2	NLGN3	PTGIR	SMARCA2	UBE2A
AP3B1	CHN1	EMG1	GYS2	LARGE	NLGN4X	PTGIS	SMARCA4	UBE2B
AP3B2	CHRD1	EMX2	GZMB	LARS2	NLGN4Y	PTGS1	SMARCA41	UBE2I
AP4B1	CHRFAM7A	EN2	H19	LBP	NLRP1	PTGS2	SMARCA1	UBE2NL
AP4E1	CHRM1	ENAM	H2BFWT	LBR	NLRP12	PTH	SMARCB1	UBE3A
AP4M1	CHRM2	ENG	H6PD	LCA5	NLRP14	PTH1R	SMARCE1	UBE3C
AP4S1	CHRM3	ENO1	HABP2	LCAT	NLRP2	PTHLH	SMC1A	UBIAD1
AP5Z1	CHRNA1	ENO3	HACE1	LCE3B	NLRP3	PTK7	SMC1B	UBN2
APAF1	CHRNA2	ENPP1	HADH	LCE3C	NLRP7	PTPN1	SMC3	UBQLN2
APBA2	CHRNA3	ENSA	HADHA	LCE5A	NLRX1	PTPN11	SMG1	UBR1
APBB1	CHRNA4	ENTPD1	HADHB	LCN10	NMB	PTPN13	SMG6	UBR3
APBB3	CHRNA5	EOMES	HAL	LCT	NME1	PTPN14	SMN1	UBR7
APC	CHRNA7	EP300	HAMP	LDB3	NME8	PTPN2	SMN2	UCHL1
APCDD1	CHRNA9	EPAS1	HAND1	LDHA	NMNAT1	PTPN21	SMNDC1	UCP1
APEX1	CHRN1	EPB41	HAND2	LDHB	NMT2	PTPN22	SMOC1	UCP2
APH1A	CHRN2	EPB41L1	HARS	LDLR	NMU	PTPN6	SMOC2	UCP3
APH1B	CHRN4	EPB42	HARS2	LDLRAD4	NOBOX	PTPRB	SMPD1	UFD1L
APLNR	CHRNA	EPC2	HAS1	LDLRAP1	NOD1	PTPRC	SMPX	UGT1A1
APOA1	CHRNE	EPCAM	HAVCR1	LEFTY2	NOD2	PTPRCAP	SMS	UGT1A10
APOA2	CHRNA	EPHA2	HAX1	LEMD3	NODAL	PTPRD	SMUG1	UGT1A3
APOA4	CHST14	EPHA3	HBA1	LEP	NOG	PTPRF	SMYD3	UGT1A4
APOA5	CHST3	EPHA5	HBA2	LEPR	NOP10	PTPRJ	SNAI2	UGT1A5
APOB	CHST6	EPHA7	HBB	LEPRE1	NOP56	PTPRK	SNAP29	UGT1A6
APOBEC3B	CHST8	EPHB2	HBD	LEPREL1	NOS1	PTPRO	SNAPC4	UGT1A7
APOBEC3G	CHSY1	EPHB6	HBE1	LETM1	NOS1AP	PTPRQ	SNAPC5	UGT1A8
APOBEC3H	CHUK	EPHX1	HBEGF	LFNG	NOS2	PTPRT	SNCA	UGT1A9
APOC1	CIB2	EPHX2	HBG1	LGALS13	NOS3	PTRF	SNCAIP	UGT2A1
APOC2	CIC	EPM2A	HBG2	LGALS2	NOTCH1	PTS	SNCB	UGT2A3
APOC3	CIDEA	EPO	HBM	LGALS3	NOTCH2	PUS1	SNIP1	UGT2B10

APOC4	CIDEC	EPOR	HBS1L	LGI1	NOTCH3	PVR	SNORD115-1	UGT2B15
APOD	CIITA	EPX	HBZ	LHB	NOTCH4	PVRL1	SNORD116-10	UGT2B17
APOE	CILP	ERAP1	HCCS	LHCGR	NPAP1	PVRL3	SNORD116-1	UGT2B28
APOH	CIRH1A	ERAP2	HCK	LHFPL5	NPAS2	PVRL4	SNORD50A	UGT2B7
APOL1	CISD2	ERBB2	HCLS1	LHX1	NPAS3	PVT1	SNRK	UHRF1BP1
APOL3	CISH	ERBB3	HCN1	LHX3	NPAT	PWRN1	SNRNP200	UIMC1
APOM	CITED2	ERBB4	HCN2	LHX4	NPC1	PXDN	SNRPN	UMOD
APP	CKM	ERCC1	HCN4	LHX8	NPC1L1	PYCR1	SNTA1	UMPS
APRT	CLCA1	ERCC2	HCP5	LIAS	NPC2	PYCRL	SNTG2	UNC119
APTX	CLCA2	ERCC3	HCRT	LIF	NPFFR2	PYGL	SNURF	UNC13D
AQP1	CLCF1	ERCC4	HCRTTR1	LIFR	NPHP1	PYGM	SNX10	UNC5C
AQP2	CLCN1	ERCC5	HCRTTR2	LIG1	NPHP3	PYY	SNX19	UNC5CL
AQP3	CLCN2	ERCC6	HDAC4	LIG3	NPHP4	PZP	SNX3	UNC80
AQP4	CLCN5	ERCC8	HDAC8	LIG4	NPHS1	QDPR	SOBP	UNC93A
AQP5	CLCN7	ERLIN2	HDAC9	LILRA3	NPHS2	QKI	SOCS1	UNC93B1
AQP7	CLCNKA	ERMAP	HDC	LIM2	NPL	RAB11FIP5	SOCS3	UNG
AR	CLCNKB	ESAM	HDLBP	LIMK1	NPM1	RAB18	SOD1	UNKL
AREL1	CLDN1	ESCO2	HDX	LIN28A	NPPA	RAB23	SOD2	UPB1
ARF4	CLDN14	ESPN	HEATR2	LIN28B	NPPB	RAB27A	SOD3	UPF3B
ARFGEF2	CLDN16	ESR1	HELQ	LINS	NPPC	RAB28	SOGA3	UPK3A
ARG1	CLDN19	ESR2	HEPACAM	LIPA	NPR1	RAB2A	SOHLH1	UQCRB
ARHGAP24	CLEC11A	ESRRB	HERC2	LIPC	NPR2	RAB39B	SORBS1	UQCRQ
ARHGAP31	CLEC2D	ESRRG	HES6	LIPE	NPR3	RAB3GAP1	SORCS1	UROCI
ARHGAP6	CLEC4M	ETFA	HES7	LIPG	NPSR1	RAB3GAP2	SORL1	UROD
ARHGAP9	CLEC7A	ETFB	HESX1	LIPH	NPTN	RAB40AL	SORT1	UROS
ARHGEF10	CLIC2	ETFDH	HEXA	LIPI	NPY	RAB7A	SOS1	USB1
ARHGEF11	CLK2	ETHE1	HEXB	LIPN	NPY1R	RAB7L1	SOST	USF1
ARHGEF12	CLMP	ETNPPL	HEY1	LITAF	NPY2R	RABGGTA	SOX10	USH1C
ARHGEF6	CLN3	ETS1	HFE	LLGL1	NQO1	RABL6	SOX17	USH1G
ARHGEF7	CLN5	EVC	HFE2	LMAN1	NQO2	RAC1	SOX18	USH2A
ARHGEF9	CLN6	EVC2	HGD	LMBR1	NR0B1	RAC2	SOX2	USP15
ARID1A	CLN8	EVI5	HGF	LMBRD1	NR0B2	RAD21	SOX3	USP24
ARID1B	CLNK	EXO1	HGSNAT	LMF1	NR1H2	RAD21L1	SOX5	USP26
ARL11	CLOCK	EXO5	HHEX	LMNA	NR1H3	RAD23B	SOX6	USP46
ARL13B	CLPS	EXOC4	HHIP	LMNB1	NR1H4	RAD50	SOX8	USP7
ARL14EP	CLPTM1	EXOSC3	HIBCH	LMNB2	NR1I2	RAD51	SOX9	USP9X
ARL6	CLRN1	EXT1	HIF1A	LMTK3	NR1I3	RAD51C	SP100	USP9Y
ARL6IP5	CLSTN2	EXT2	HIF1AN	LMX1B	NR2E1	RAD51D	SP110	UTF1
ARMS2	CLTCL1	EXTL3	HIGD2A	LNX2	NR2E3	RAD52	SP7	UTRN
ARPC3	CLU	EYA1	HIP1	loc344967	NR2F1	RAD54B	SP8	UTS2
ARSA	CLUL1	EYA4	HIST1H2AE	LOR	NR3C1	RAD54L	SPAG16	UVSSA

ARSB	CLYBL	EYS	HIST3H3	LOX	NR3C2	RAD9A	SPAG17	VAMP7
ARSE	CMA1	EZH2	HK1	LOXHD1	NR4A2	RAET1L	SPANXN5	VANGL1
ARSF	CMPK1	F10	HK2	LOXL1	NR5A1	RAF1	SPAST	VANGL2
ART4	CNBP	F11	HLA-A	LOXL2	NRAS	RAG1	SPATA13	VAPB
ARVCF	CNDP1	F12	HLA-B	LPA	NRG1	RAG2	SPATA16	VAX1
ARX	CNGA1	F13A1	HLA-C	LPAR1	NRG3	RAI1	SPATA21	VCAM1
AS3MT	CNGA3	F13B	HLA-DMB	LPAR6	NRIP1	RALGAP1	SPATA31C1	VCAN
ASAH1	CNGB1	F2	HLA-DOA	LPIN1	NRL	RALGDS	SPATA7	VCL
ASAH2	CNGB3	F2R	HLA-DPB1	LPIN2	NRP2	RANBP2	SPECC1L	VCP
ASB10	CNKSR1	F2RL1	HLA-DPB2	LPIN3	NRTN	RANGRF	SPG11	VCX3A
ASCC1	CNKSR2	F3	HLA-DQA1	LPL	NRXN1	RAPSN	SPG20	VCY
ASCC3	CNNM2	F5	HLA-DQB1	LPP	NRXN2	RARS2	SPG21	VDR
ASCL1	CNNM4	F7	HLA-DRA	LRAT	NRXN3	RASA1	SPG7	VEGFA
ASIC3	CNOT3	F8	HLA-DRB1	LRCH1	NSD1	RASGRP2	SPI1	VHL
ASIP	CNOT4	F9	HLA-DRB5	LRFN5	NSDHL	RASSF1	SPINK1	VIM
ASL	CNPY3	FA2H	HLA-E	LRP1	NSMF	RAX	SPINK5	VIMP
ASMT	CNR1	FAAH	HLA-G	LRP2	NSUN2	RAX2	SPINT2	VIP
ASMTL	CNR2	FAAH2	HLCS	LRP4	NSUN7	RB1	SPP1	VIPAS39
ASNS	CNTF	FABP1	HLX	LRP5	NT5C1B	RB1CC1	SPR	VIPR2
ASPA	CNTN1	FABP2	HMBS	LRP6	NT5C3A	RBBP8	SPRED1	VKORC1
ASPM	CNTN4	FABP3	HMCN1	LRP8	NT5E	RBFOX1	SPRN	VLDLR
ASPN	CNTNAP2	FABP4	HMGA1	LRPAP1	NTF3	RBM10	SPRR3	VMA21
ASPRV1	CNTNAP4	FABP6	HMGA2	LRPPRC	NTF4	RBM15	SPRY2	VNN1
ASS1	CNTNAP5	FABP7	HMGCL	LRRC4	NTHL1	RBM20	SPRY3	VPREB1
ASTN2	COA5	FADD	HMGCR	LRRC6	NTNG1	RBM28	SPTA1	VPS13A
ASXL1	COCH	FADS2	HMGCS2	LRRC8A	NTRK1	RBM8A	SPTAN1	VPS13B
ATCAY	COG1	FAH	HMHA1	LRRK2	NTRK2	RBMXL2	SPTB	VPS33B
ATF1	COG4	FAM120A	HMOX1	LRSAM1	NTRK3	RBMX1A1	SPTBN2	VPS35
ATF3	COG5	FAM126A	HMOX2	LRTOMT	NUAK1	RBP3	SPTBN5	VRK1
ATF5	COG6	FAM134B	HMSD	LTA	NUBPL	RBP4	SPTLC1	VSIG4
ATF6	COG7	FAM161A	HMX1	LTBP1	NUDC	RCAN1	SPTLC2	VX1
ATG16L1	COG8	FAM205A	HMX2	LTBP2	NUDT1	RD3	SQSTM1	VX2
ATG7	COL10A1	FAM20A	HNF1A	LTBP3	NUDT6	RDH12	SRC	VTN
ATIC	COL11A1	FAM20C	HNF1B	LTBP4	NUMBL	RDH5	SRCAP	VWF
ATL1	COL11A2	FAM58A	HNF4A	LTC4S	NUP155	RDX	SRD5A2	WAS
ATM	COL12A1	FAM83H	HNMT	LTF	NUP62	RECQL4	SRD5A3	WASF3
ATN1	COL17A1	FAM8A1	HNRNPH3	LTK	NXF3	REEP1	SREBF1	WDFY3
ATOH7	COL18A1	FAM91A1	HNRNPU	LTN1	NXF5	RELN	SREBF2	WDFY4
ATP10A	COL1A1	FANCA	HOGA1	LUM	NXNL1	REN	SREK1	WDPCP
ATP10D	COL1A2	FANCB	HOMER2	LY96	NYX	REPS2	SRGAP2	WDR11
ATP13A2	COL25A1	FANCC	HOXA1	LYN	OAS1	RET	SRGAP3	WDR13
ATP13A4	COL2A1	FANCD2	HOXA10	LYST	OAS2	RETN	SRI	WDR19
ATP1A2	COL3A1	FANCE	HOXA11	LYZ	OAT	REV3L	SRP72	WDR35

ATP1A3	COL4A1	FANCF	HOXA13	LZTFL1	OAZ1	RFC2	SRPX	WDR36
ATP1B1	COL4A2	FANCG	HOXA2	LZTS1	OBSCN	RFT1	SRPX2	WDR4
ATP2A1	COL4A3	FANCI	HOXA4	MACROD2	OBSL1	RFWD2	SRR	WDR45
ATP2A2	COL4A4	FANCL	HOXB13	MAD1L1	OCA2	RFX2	SRY	WDR45B
ATP2A3	COL4A5	FANCM	HOXB6	MAD2L1	OCLN	RFX5	SSH1	WDR62
ATP2B2	COL4A6	FARS2	HOXD10	MADD	OCRL	RFX6	SST	WDR65
ATP2B4	COL5A1	FAS	HOXD13	MAF	ODC1	RFX8	SSTR2	WDR72
ATP2C1	COL5A2	FASLG	HOXD4	MAFB	OFD1	RFXANK	SSTR5	WDR81
ATP5E	COL6A1	FASN	HP	MAGEE2	OGG1	RFXAP	SSX7	WFS1
ATP5SL	COL6A2	FASTKD2	HPD	MAGEL2	OLFM2	RGMA	ST14	WHSC1
ATP6AP2	COL6A3	FBLIM1	HPGD	MAGI2	OLR1	RGR	ST3GAL3	WIPF1
ATP6V0A1	COL6A4P2	FBLN1	HPRT1	MAGT1	OMG	RGS2	ST3GAL5	WISP3
ATP6V0A2	COL6A5	FBLN5	HPS1	MAK	OPA1	RGS6	ST5	WNK1
ATP6V0A4	COL7A1	FBN1	HPS3	MAMLD1	OPA3	RGS7	ST7	WNK4
ATP6V1B1	COL8A2	FBN2	HPS4	MAN1A2	OPCML	RGS9	ST8SIA2	WNT10A
ATP7A	COL9A1	FBN3	HPS5	MAN1B1	OPHN1	RGS9BP	STAR	WNT10B
ATP7B	COL9A2	FBP1	HPS6	MAN2B1	OPN1LW	RHAG	STAT1	WNT3
ATP8A2	COL9A3	FBXL6	HPSE2	MANBA	OPN1MW	RHBDF2	STAT3	WNT4
ATP8B1	COLEC11	FBXO10	HR	MAOA	OPN1SW	RHCE	STAT5B	WNT5A
ATPAF2	COLQ	FBXO18	HRAS	MAOB	OPN4	RHD	STAT6	WNT5B
ATR	COMMD1	FBXO7	HRC	MAP2	OPRD1	RHO	STEAP3	WNT7A
ATRNL1	COMP	FBXW11	HRG	MAP2K1	OPRK1	RHOB	STEAP4	WRAP53
ATRX	COMT	FBXW4	HRH2	MAP2K2	OPRL1	RHOG	STH	WRN
ATXN1	COQ2	FBXW7	HRH3	MAP2K3	OPRM1	RHPN2	STIL	WT1
ATXN10	COQ4	FCAR	HS1BP3	MAP2K4	OTPC	RIMS1	STIM1	WT1-AS
ATXN2	COQ5	FCER1A	HS6ST1	MAP3K1	OPTN	RIMS3	STK10	WWC1
ATXN3	COQ6	FCER2	HSD11B1	MAP3K15	OR13G1	RIN2	STK11	WWOX
ATXN3L	COQ9	FCGR1A	HSD11B2	MAP4K5	OR7D4	RIPK3	STK19	XBP1
ATXN7	CORIN	FCGR2A	HSD17B1	MAP6	ORAI1	RIPK4	STK3	XDH
ATXN8OS	CORO1A	FCGR2B	HSD17B10	MAP7D3	ORC1	RLBP1	STK32A	XIAP
AUH	COX10	FCGR3A	HSD17B2	MAPK10	ORC4	RMI1	STK33	XIST
AURKA	COX14	FCGR3B	HSD17B3	MAPK8IP1	ORC6	RMRP	STK39	XK
AURKC	COX15	FCGRT	HSD17B4	MAPT	ORMDL3	RNASE3	STK4	XKR4
AUTS2	COX4I1	FCN2	HSD3B1	MARS2	OSMR	RNASEH2A	STMN1	XKRY
AVP	COX4I2	FCN3	HSD3B2	MARVELD 2	OSR1	RNASEH2B	STOX1	XPA
AVPR1A	COX6B1	FCRL3	HSD3B7	MASP1	OSTM1	RNASEH2C	STRA6	XPC
AVPR1B	COX7A1	FDFT1	HSF4	MASP2	OTC	RNASEL	STRADA	XPNPEP2
AVPR2	COX7A2	FECH	HSFY1	MAST4	OTOA	RNASET2	STRC	XPNPEP3
AXIN1	CP	FEM1A	HSN2	MASTL	OTOF	RNF113A	STS	XRCC1
AXIN2	CPA4	FEN1	HSP90AA1	MAT1A	OTOR	RNF114	STX11	XRCC2
AXL	CPA6	FERMT1	HSP90B1	MATN3	OTX2	RNF135	STX16	XRCC3
B2M	CPB2	FERMT3	HSPA1A	MATR3	OVGP1	RNF139	STX1A	XRCC4
B3GALNT1	CPE	FEV	HSPA1B	MAVS	OXCT1	RNF168	STXBP1	XRCC5

B3GALT6	CPLX2	FEZF2	HSPA1L	MAX	OXTR	RNF170	STXBP2	XRCC6
B3GALT7	CPN1	FFAR1	HSPA5	MBD1	P2RX1	RNF213	STXBP5	XYLT1
B3GAT3	CPOX	FFAR4	HSPA8	MBD3	P2RX4	RNLS	SUCLA2	XYLT2
B3GNT1	CPS1	FGA	HSPA9	MBD4	P2RX5	RNU4ATAC	SUCLG1	YAP1
B3GNT3	CPT1A	FGB	HSPB1	MBD5	P2RX7	ROBO1	SUFU	YARS
B4GALT1	CPT1B	FGD1	HSPB3	MBL2	P2RY11	ROBO2	SULF1	YARS2
B4GALT7	CPT2	FGD3	HSPB6	MBTPS2	P2RY12	ROBO3	SULT1A1	YBX2
B9D1	CPZ	FGD4	HSPB7	MC1R	P2RY4	ROCK1	SULT1A3	YTHDF2
B9D2	CR1	FGF1	HSPB8	MC2R	PABPC4L	ROCK2	SULT1C2	YWHAE
BAALC	CR2	FGF10	HSPD1	MC3R	PABPN1	ROGDI	SULT1E1	YY1
BAAT	CRADD	FGF14	HSPG2	MC4R	PACRG	ROM1	SULT2A1	ZAN
BACE1	CRB1	FGF2	HTN3	MCCC1	PAFAH1B1	ROPN1L	SULT2B1	ZAP70
BAG3	CRBN	FGF20	HTR1A	MCCC2	PAFAH1B3	ROR2	SULT4A1	ZBTB16
BAG6	CREB1	FGF23	HTR1B	MCEE	PAH	RORA	SUMF1	ZBTB18
BANF1	CREB3L3	FGF3	HTR2A	MCF2L2	PAK3	ROS1	SUMO1	ZBTB24
BANK1	CREBBP	FGF8	HTR2B	MCFD2	PAK7	RP1	SUMO4	ZBTB40
BAP1	CRELD1	FGF9	HTR2C	MCHR1	PALB2	RP1L1	SUN2	ZBTB41
BARD1	CRH	FGFBP1	HTR3A	MCL1	PALLD	RP2	SUOX	ZC3H14
BAX	CRHR1	FGFR1	HTR3B	MCM3AP	PANK2	RP9	SUPT16H	ZC3H3
BBS1	CRISP2	FGFR2	HTR3C	MCM4	PAPD7	RPA1	SURF1	ZC3HAV1
BBS10	CRK	FGFR3	HTR3E	MCM5	PAPSS2	RPA4	SUV420H1	ZCCHC12
BBS12	CRKL	FGFR4	HTR5A	MCM6	PARD3B	RPE65	SV2B	ZCCHC13
BBS2	CRLF1	FGFRL1	HTR6	MCOLN1	PARD6A	RPGR	SYCP3	ZCCHC8
BBS4	CRP	FGG	HTR7	MCPH1	PARK2	RPGRIP1	SYN1	ZDHHHC15
BBS5	CRTAP	FH	HTRA1	MDH1	PARK7	RPGRIP1L	SYN3	ZDHHHC8
BBS7	CRX	FHL1	HTRA2	MDM2	PARL	RPH3AL	SYNE1	ZDHHHC9
BBS9	CRYAA	FHL2	HTT	MDM4	PARP1	RPIA	SYNE2	ZEB1
BCAM	CRYAB	FIG4	HUS1B	MDN1	PARP2	RPL10	SYNGAP1	ZEB2
BCAP31	CRYBA1	FIGLA	HUWE1	MECP2	PASK	RPL11	SYNGR1	ZFAT
BCAT1	CRYBA4	FIP1L1	HVCN1	MED12	PAWR	RPL21	SYNM	ZFHX3
BCAT2	CRYBB1	FKBP10	HYAL1	MED13	PAX1	RPL35A	SYNPO	ZFHX4
BCHE	CRYBB2	FKBP14	HYDIN	MED13L	PAX2	RPL36	SYP	ZFP36
BCKDHA	CRYBB3	FKBP5	HYLS1	MED17	PAX3	RPL5	SYT11	ZFP36L1
BCKDHB	CRYGB	FKBP6	HYMAI	MED23	PAX4	RPN2	SYT14	ZFP57
BCL10	CRYGC	FKBPL	IAPP	MED25	PAX5	RPS10	SYT2	ZFP90
BCL11A	CRYGD	FKRP	IBSP	MEF2A	PAX6	RPS15	SYTL3	ZFPM2
BCL2	CRYGEP	FKTN	ICAM1	MEF2C	PAX7	RPS17	SYTL5	ZFY
BCL2A1	CRYGS	FLCN	ICAM4	MEFV	PAX8	RPS19	T	ZFYVE26
BCL2L11	CRYM	FLG	ICAM5	MEGF10	PAX9	RPS24	TAAR6	ZFYVE27
BCL2L2	CSAG1	FLNA	ICK	MEGF11	PC	RPS26	TAAR9	ZHX3
BCL9	CSDE1	FLNB	ICOS	MEIS1	PCBD1	RPS27A	TAB2	ZIC1
BCMO1	CSF1	FLNC	ID3	MEIS2	PCCA	RPS3	TAC3	ZIC2
BCOR	CSF1R	FLT1	IDE	MEN1	PCCB	RPS4Y2	TACO1	ZIC3

BCORL1	CSF2	FLT3	IDH1	MEP1B	PCDH11X	RPS6KA3	TACR3	ZMPSTE24
BCR	CSF2RA	FLT4	IDH2	MERTK	PCDH15	RPS6KB1	TACSTD2	ZMYND11
BCS1L	CSF2RB	FLVCR1	IDH3B	MESDC2	PCDH18	RPS6KL1	TAF1	ZNF202
BDKRB2	CSF3R	FLVCR2	IDO1	MESP2	PCDH19	RPS7	TAF15	ZNF213
BDNF	CSGALNACT1	FMN1	IDS	MEST	PCDH9	RPTOR	TAF1C	ZNF224
BEAN1	CSH1	FMN2	IDUA	MET	PCDHA10	RRH	TAF1L	ZNF24
BEST1	CSMD1	FMO1	IER3IP1	MFF	PCDHA13	RRM1	TAF2	ZNF335
BEX4	CSMD3	FMO2	IFI30	MFGE8	PCDHB4	RRM2B	TAF7L	ZNF350
BFSP1	CSNK1A1L	FMO3	IFI44L	MFI2	PCK1	RRP1B	TAL1	ZNF365
BFSP2	CSNK1D	FMO4	IFIH1	MFN2	PCK2	RS1	TALDO1	ZNF385B
BHLHA9	CSNK1E	FMO5	IFITM3	MFRP	PCM1	RSPH4A	TAP1	ZNF41
BHLHE41	CSNK2A2	FMO6P	IFITM5	MFSD2A	PCMT1	RSPH9	TAP2	ZNF469
BHMT	CSNK2A3	FMR1	IFNA10	MFSD8	PCNT	RSP01	TAPBP	ZNF480
BICC1	CSRP3	FN1	IFNA17	MGAT1	PCOLCE	RSP04	TARDBP	ZNF507
BICD1	CST3	FN3K	IFNA2	MGAT2	PCSK1	RSRC1	TAS1R1	ZNF513
BIN1	CSTA	FOLH1	IFNAR1	MGAT4C	PCSK2	RTN2	TAS1R2	ZNF526
BIRC5	CSTB	FOLR1	IFNAR2	MGEA5	PCSK9	RTN4R	TAS1R3	ZNF592
BLK	CSTF2T	FOXA1	IFNG	MGLL	PDCD1	RUNX1	TAS2R16	ZNF627
BLM	CTC1	FOXA2	IFNGR1	MGMT	PDCD10	RUNX2	TAS2R19	ZNF644
BLMH	CTDP1	FOXA3	IFNGR2	MGP	PDCD5	RUNX3	TAS2R3	ZNF674
BLNK	CTF1	FOXC1	IFNL3	MGST2	PDE10A	RUVBL1	TAS2R38	ZNF711
BLOC1S3	CTGF	FOXC2	IFRD1	MGST3	PDE11A	RXFP2	TAS2R43	ZNF750
BLOC1S6	CTH	FOXD3	IFT122	MIA3	PDE4B	RXRG	TAS2R46	ZNF75D
BLVRA	CTHRC1	FOXE1	IFT140	MIAT	PDE4D	RYK	TAS2R50	ZNF80
BMI1	CTLA4	FOXE3	IFT43	MICA	PDE6A	RYR1	TAS2R9	ZNF804A
BMP1	CTNNA3	FOXF1	IFT80	MICB	PDE6B	RYR2	TAT	ZNF81
BMP10	CTNNB1	FOXF2	IGBP1	MID1	PDE6C	RYR3	TAZ	ZNHIT6
BMP15	CTNND1	FOXG1	IGF1	MIF	PDE6G	S100A14	TBC1D1	ZNRF1
BMP2	CTNS	FOXH1	IGF1R	MIIP	PDE6H	S100B	TBC1D23	ZPBP
BMP2K	CTRC	FOXI1	IGF2	MINPP1	PDE7B	S1PR1	TBC1D24	ZPBP2
BMP4	CTSA	FOXL2	IGF2R	MIP	PDE8B	SAA1	TBC1D4	
BMP5	CTSB	FOXN1	IGFALS	MIPOL1	PDGFB	SAA2	TBCE	
BMP7	CTSC	FOXP1	IGFBP1	MIR106B	PDGFC	SACS	TBK1	
BMPER	CTSD	FOXP2	IGFBP3	MIR124-1	PDGFRA	SAG	TBL1X	
BMPR1A	CTSG	FOXP3	IGFBP5	MIR125A	PDHA1	SAGE1	TBL1XR1	
BMPR1B	CTSK	FOXRED1	IGFBP7	MIR126	PDHB	SALL1	TBL1Y	
BMPR2	CTSZ	FPGS	IGHA1	MIR140	PDHX	SALL4	TBP	
BNC2	CTTNBP2	FPR1	IGHG2	MIR146A	PDLIM3	SAMD9	TBX1	
BOLA3	CUBN	FPR2	IGHM	MIR16-1	PDLIM5	SAMHD1	TBX10	
BPGM	CUL3	FRA10AC1	IGHMBP2	MIR17	PDP1	SAR1B	TBX15	
BPI	CUL4B	FRAS1	IGKV	MIR17HG	PDPK1	SARDH	TBX19	
BPIFA1	CUL5	FREM1	IGLL1	MIR182	PDSS1	SARS2	TBX2	
BPY2	CUL7	FREM2	IHH	MIR184	PDSS2	SART1	TBX20	

<i>BRAF</i>	<i>CX3CR1</i>	<i>FREM3</i>	<i>IKBIP</i>	<i>MIR191</i>	<i>PDX1</i>	<i>SART3</i>	<i>TBX21</i>	
<i>BRAP</i>	<i>CXCL10</i>	<i>FRG1</i>	<i>IKBKAP</i>	<i>MIR196A2</i>	<i>PDXK</i>	<i>SAT1</i>	<i>TBX22</i>	
<i>BRAT1</i>	<i>CXCL11</i>	<i>FRK</i>	<i>IKBKG</i>	<i>MIR206</i>	<i>PDYN</i>	<i>SATB2</i>	<i>TBX3</i>	
<i>BRCA1</i>	<i>CXCL12</i>	<i>FRMD6</i>	<i>IL10</i>	<i>MIR24-1</i>	<i>PDZD7</i>	<i>SATL1</i>	<i>TBX4</i>	
<i>BRCA2</i>	<i>CXCL16</i>	<i>FRMD7</i>	<i>IL10RA</i>	<i>MIR27A</i>	<i>PEAR1</i>	<i>SBDS</i>	<i>TBX5</i>	
<i>BRCC3</i>	<i>CXCL5</i>	<i>FRMPD4</i>	<i>IL10RB</i>	<i>MIR2861</i>	<i>PECAM1</i>	<i>SBF2</i>	<i>TBX6</i>	
<i>BRD1</i>	<i>CXCR1</i>	<i>FRY</i>	<i>IL11RA</i>	<i>MIR30C1</i>	<i>PECR</i>	<i>SBNO1</i>	<i>TBXA2R</i>	
<i>BRIP1</i>	<i>CXCR3</i>	<i>FRZB</i>	<i>IL12A</i>	<i>MIR34B</i>	<i>PEMT</i>	<i>SC5DL</i>	<i>TBXAS1</i>	
<i>BRSK2</i>	<i>CXCR4</i>	<i>FSCB</i>	<i>IL12B</i>	<i>MIR499A</i>	<i>PENK</i>	<i>SCAP</i>	<i>TCAP</i>	
<i>BRWD1</i>	<i>CYB5A</i>	<i>FSCN2</i>	<i>IL12RB1</i>	<i>MIR502</i>	<i>PEPD</i>	<i>SCARB1</i>	<i>TCF21</i>	
<i>BRWD3</i>	<i>CYB5R3</i>	<i>FSHB</i>	<i>IL12RB2</i>	<i>MIR510</i>	<i>PER1</i>	<i>SCARB2</i>	<i>TCF4</i>	
<i>BSCL2</i>	<i>CYBA</i>	<i>FSHR</i>	<i>IL13</i>	<i>MIR890</i>	<i>PER2</i>	<i>SCARF2</i>	<i>TCF7</i>	
<i>BSG</i>	<i>CYBB</i>	<i>FTCD</i>	<i>IL16</i>	<i>MIR892B</i>	<i>PER3</i>	<i>SCG2</i>	<i>TCF7L1</i>	
<i>BSND</i>	<i>CYBRD1</i>	<i>FTH1</i>	<i>IL17A</i>	<i>MIR934</i>	<i>PEX1</i>	<i>SCG3</i>	<i>TCF7L2</i>	
<i>BST1</i>	<i>CYCS</i>	<i>FTHL17</i>	<i>IL17F</i>	<i>MIR96</i>	<i>PEX10</i>	<i>SCGB1A1</i>	<i>TCIRG1</i>	
<i>BTAF1</i>	<i>CYLD</i>	<i>FTL</i>	<i>IL17RA</i>	<i>MIRLET7E</i>	<i>PEX11B</i>	<i>SCGB1D2</i>	<i>TCN1</i>	
<i>BTBD9</i>	<i>CYP11A1</i>	<i>FTO</i>	<i>IL17RB</i>	<i>MITF</i>	<i>PEX12</i>	<i>SCGB3A2</i>	<i>TCN2</i>	
<i>BTC</i>	<i>CYP11B1</i>	<i>FTSJ1</i>	<i>IL17REL</i>	<i>MKKS</i>	<i>PEX13</i>	<i>SCN10A</i>	<i>TCOF1</i>	
<i>BTD</i>	<i>CYP11B2</i>	<i>FUCA1</i>	<i>IL18</i>	<i>MKL1</i>	<i>PEX14</i>	<i>SCN1A</i>	<i>TCP1</i>	
<i>BTK</i>	<i>CYP17A1</i>	<i>FURIN</i>	<i>IL18R1</i>	<i>MKRN3</i>	<i>PEX16</i>	<i>SCN1B</i>	<i>TCTE1</i>	
<i>BTLA</i>	<i>CYP19A1</i>	<i>FUS</i>	<i>IL18RAP</i>	<i>MKS1</i>	<i>PEX19</i>	<i>SCN2A</i>	<i>TCTE3</i>	
<i>BTN1A1</i>	<i>CYP1A1</i>	<i>FUT1</i>	<i>IL19</i>	<i>MLC1</i>	<i>PEX2</i>	<i>SCN2B</i>	<i>TCTN1</i>	
<i>BTN2A1</i>	<i>CYP1A2</i>	<i>FUT2</i>	<i>IL1A</i>	<i>MLH1</i>	<i>PEX26</i>	<i>SCN3A</i>	<i>TCTN2</i>	
<i>BTNL2</i>	<i>CYP1B1</i>	<i>FUT3</i>	<i>IL1B</i>	<i>MLH3</i>	<i>PEX3</i>	<i>SCN3B</i>	<i>TDGF1</i>	
<i>BTRC</i>	<i>CYP21A2</i>	<i>FUT6</i>	<i>IL1R1</i>	<i>MLLT3</i>	<i>PEX5</i>	<i>SCN4A</i>	<i>TDO2</i>	
<i>BUB1B</i>	<i>CYP24A1</i>	<i>FUT7</i>	<i>IL1RAPL1</i>	<i>MLPH</i>	<i>PEX6</i>	<i>SCN4B</i>	<i>TDP1</i>	
<i>C10orf11</i>	<i>CYP26A1</i>	<i>FUT8</i>	<i>IL1RL1</i>	<i>MLXIPL</i>	<i>PEX7</i>	<i>SCN5A</i>	<i>TDRD7</i>	
<i>C10orf137</i>	<i>CYP26B1</i>	<i>FUZ</i>	<i>IL1RN</i>	<i>MLYCD</i>	<i>PFAS</i>	<i>SCN8A</i>	<i>TEAD1</i>	
<i>C10orf2</i>	<i>CYP27A1</i>	<i>FXN</i>	<i>IL2</i>	<i>MMAA</i>	<i>PFKM</i>	<i>SCN9A</i>	<i>TECR</i>	
<i>C12orf10</i>	<i>CYP27B1</i>	<i>FXYD2</i>	<i>IL20RA</i>	<i>MMAB</i>	<i>PFN1</i>	<i>SCNN1A</i>	<i>TECTA</i>	
<i>C12orf57</i>	<i>CYP2A13</i>	<i>FXYD6</i>	<i>IL20RB</i>	<i>MMACHC</i>	<i>PGAM1</i>	<i>SCNN1B</i>	<i>TEK</i>	
<i>C12orf65</i>	<i>CYP2A6</i>	<i>FYCO1</i>	<i>IL21</i>	<i>MMADHC</i>	<i>PGAM2</i>	<i>SCNN1G</i>	<i>TEKT2</i>	
<i>C19orf12</i>	<i>CYP2B6</i>	<i>FZD1</i>	<i>IL21R</i>	<i>MME</i>	<i>PGAM5</i>	<i>SCO1</i>	<i>TENM4</i>	
<i>C1GALT1</i>	<i>CYP2C18</i>	<i>FZD3</i>	<i>IL23R</i>	<i>MMEL1</i>	<i>PGBD1</i>	<i>SCO2</i>	<i>TEP1</i>	
<i>C1QA</i>	<i>CYP2C19</i>	<i>FZD4</i>	<i>IL2RA</i>	<i>MMP1</i>	<i>PGC</i>	<i>SCP2</i>	<i>TERC</i>	
<i>C1QB</i>	<i>CYP2C8</i>	<i>FZD6</i>	<i>IL2RG</i>	<i>MMP10</i>	<i>PGD</i>	<i>SCRIB</i>	<i>TERT</i>	