

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**  
**КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ**

\*\*\*\*\*

**САВИНА САВЧЕВА ТИНЧЕВА**

**ГЕНЕТИЧНО ОХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА АВТОЗОМНО РЕЦЕСИВНИ  
НЕВРОЛОГИЧНИ И НЕВРОМУСКУЛНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ В БЪЛГАРИЯ:  
ПИРИДОКСИН ЗАВИСИМА ЕПИЛЕПСИЯ И МИОТОНИЯ КОНГЕНИТА ТИП БЕКЕР**

# **ДИСЕРТАЦИЯ**

**за присъждане на образователна и научна степен**

**„ДОКТОР“**

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

**Професионално направление: 4.3. Биологически науки**

**Докторска програма: Молекулярна биология**

**НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:**

**Акад. Ваньо Иванов Митев, дм, дбн**

**Доц. Албена Първанова Тодорова – Георгиева, дбн**

**София, 2017**

Дисертационният труд съдържа 120 страници, 44 фигури и 20 таблици.

Цитирани са 118 литературни източника и 18 електронни източника.

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

Включените в дисертацията изследвания са извършени в:

- Катедра по Медицинска Химия и Биохимия, Медицински Университет - София
- Генетична Медико-Диагностична Лаборатория „Геника“, София

Настоящото изследване е финансирано частично от Съвета по медицинска наука на Медицински Университет – София по договори № 3/2015 и 1/2016.

**СЪДЪРЖАНИЕ**

Използвани съкращения.....	1
Резюме .....	2
Summary .....	4
Въведение .....	6
1. Литературен обзор .....	9
1.1. Неврологични заболявания и неврогенетика.....	9
1.2. Епилептични енцефалопатии.....	11
1.2.1. Кофактор зависими епилепсии .....	11
1.2.2. Пиридоксин зависима епилепсия.....	12
1.2.2.1. Клинична картина .....	12
1.2.2.2. Честота на заболяването .....	13
1.2.2.3. Генетична основа на заболяването и засегнат белтъчен продукт .....	13
1.2.2.4. Диагностика на заболяването.....	17
1.2.2.5. Диференциална диагностика.....	19
1.2.2.6. Терапия на заболяването .....	21
1.2.2.7. Прогноза на заболяването .....	22
1.3. Невромускулни заболявания .....	23
1.3.1. Миотония конгенита тип Бекер.....	23
1.3.1.1. Клинична картина .....	23
1.3.1.2. Фенотипна вариабилност.....	27
1.3.1.3. Честота на заболяването .....	28
1.3.1.4. Генетична основа и засегнат белтъчен продукт .....	28
1.3.1.5. Диференциална диагностика.....	31
1.3.1.6. Физиология и патофизиология на CIC-1.....	32
1.3.1.7. Терапия на заболяването и прогноза .....	33
1.4. Редки болести.....	35

---

1.5. Автозомно рецесивни неврологични заболявания .....	36
2. Цел и Задачи .....	38
2.1. Цел .....	38
2.2. Задачи .....	38
2.2.1. Пиридоксин зависима епилепсия .....	38
2.2.2. Миотония конгенита тип Бекер .....	38
3. Материали и методи .....	40
3.1. Материали .....	40
3.1.1. Клиничен материал .....	40
3.1.2. Биологичен материал .....	41
3.2. Методи .....	43
3.2.1. Преданалитична обработка на материала .....	43
3.2.1.1. Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв по солеви метод .....	43
3.2.1.2. Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна или капилярна кръв по фенол-хлороформен метод .....	44
3.2.1.3. Изолиране на ДНК от филтърни бланки чрез кит NucleoSpin Tissue, MACHEREY-NAGEL, Germany .....	46
3.2.1.4. Директна спектрофотометрия .....	46
3.2.2. Аналитична обработка на материала .....	47
3.2.2.1. Полимеразна верижна реакция; ПВР (Polymerase chain Reaction; PCR) .....	47
3.2.2.2. Електрофореза в агарозен гел .....	55
3.2.2.3. Директно секвениране по Sanger с флуоресцентно белязани дидезокси нуклеотиди .....	56
3.2.2.4. Мултиплексна лигазно зависима амплификация (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification, MLPA) .....	60
3.2.2.5. Short PCR и TP-PCR .....	63
3.2.3. Литературни бази данни, използвани в проучването .....	66

---

4. Резултати и обсъждане .....	67
4.1. Пиридоксин зависима епилепсия.....	67
4.1.1. Изследвана група пациенти.....	67
4.1.2. Клинични данни и молекулярно-генетични резултати .....	68
4.1.2.1. Семейство 2.....	68
4.1.2.2. Семейство 5.....	72
4.1.2.3. Семейства с негативен <i>ALDH7A1</i> статус.....	73
4.1.3. Дискусия .....	74
4.1.4. Заключение .....	77
4.2. Миотония конгенита тип Бекер.....	78
4.2.1. Изследвана група пациенти.....	78
4.2.2. Клинични данни и молекулярно-генетични резултати .....	80
4.2.2.1. Семейства 1 и 2.....	80
4.2.2.2. Семейство 3.....	82
4.2.2.3. Семейство 4.....	85
4.2.2.4. Семейство 5.....	85
4.2.2.5. Семейства 6 и 7.....	89
4.2.2.6. Семейство 8.....	90
4.2.2.7. Семейство 9.....	93
4.2.2.8. Молекулярно-генетичен анализ на <i>SCN4A</i> гена .....	94
4.2.3. Заключение .....	95
4.3. Скрининг на два предполагаеми ендемични региона за миотония конгенита тип Бекер .....	96
4.3.1. Скрининг на регион Мездра.....	97
4.3.2. Скрининг на регион Гоце Делчев.....	98
4.3.3. Заключение .....	99
4.4. Две автозомно рецесивни невромускулни заболявания в едно семейство.....	101
4.4.1. Атаксия на Фридрайх .....	101
4.4.2. Мускулна дистрофия пояс-крайник тип 2A (Калпаинопатия) .....	102

---

4.4.3. Родословие на таргетното семейство и клинична картина.....	102
4.4.4. Молекулярно-генетичен анализ .....	104
4.4.5. Заключение .....	107
4.5. Обобщение на резултатите и заключение .....	108
5. Изводи .....	110
6. Библиография .....	111
6.1. Чуждоезична литература .....	111
6.2. Българска литература.....	116
6.3. Електронни източници .....	116
7. Публикации и научни прояви във връзка с дисертационния труд .....	118
7.1. Публикации във връзка с дисертационния труд.....	118
7.2. Научни прояви във връзка с дисертационния труд .....	118
7.3. Забелязани цитати.....	119
8. Приноси .....	120

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ПЗЕ – пиридоксин зависима епилепсия

ПФЗЕ - пиридоксал 5'-фосфат зависима епилепсия

ПВР/PCR – Полимеразна верижна реакция/Polymerase chain reaction

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

РНК – рибонуклеинова киселина

н. дв./bp – нуклеотидни двойки/base pairs

ЕЕГ – електроенцефалография

ЕМГ – електромиография

ЕДТА – етилен диаамин тетраацетат

H<sup>+</sup> - водороден йон

MLPA – Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification

GWAS – Genome-Wide Association Studies

DMSO – диметилсулфоксид

дНТФ – дезоксинуклеозидтрифосфати

ддНТФ – дидезоксинуклеозидтрифосфати

TP-PCR - Triplet Repeat Primed PCR

FRDA – Атаксия на Фридрайх (Friedreich ataxia)

LGMD2A – Мускулна дистрофия пояс-крайник тип 2A, Калпаинопатия (Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2A)

DMD – Мускулна дистрофия на Дюшен (Duchenne Muscular Dystrophy)

XLI – X-свързана ихтиоза (X-linked Ichtyosis)

## РЕЗЮМЕ

Настоящият дисертационен труд е насочен към неврологичните заболявания с автозомно рецесивно унаследяване. Представител от групата на епилептичните енцефалопатии е пиридоксин зависимата епилепсия (ПЗЕ). Дължи се на дефекти в гена *ALDH7A1* [Mills *et al.*, 2006]. Миотония конгенита тип Бекер е наследствено заболяване, спадащо към групата на невромускулните заболявания. Причинява се от мутации в *CLCN1* гена [Lorenz *et al.*, 1994; Lehmann-Horn *et al.*, 1996] и също се унаследява по автозомно рецесивен начин.

С помощта на най-съвременни молекулярни методики за първи път в България бяха генетично верифицирани случаи на пиридоксин зависима епилепсия и миотония конгенита тип Бекер, като беше проследено и унаследяването при техните родители. При две от общо шестте семейства с клинична диагноза ПЗЕ бяха открити мутации в *ALDH7A1* гена, причиняващи фенотипната изява. Открита беше нова непубликувана до момента в световната литература замяна, при това от най-рядко срещания тип за този ген – делеция.

По отношение на миотония конгенита тип Бекер клинично поставената диагноза беше потвърдена на молекулярно-генетично ниво при седем от общо деветте насочени за анализ семейства. В *CLCN1* гена също беше идентифицирана една новооткрита в световен мащаб мутация. Генетичното верифициране на клинично поставената диагноза е от съществено значение с цел подбор на подходящо лечение - при пиридоксин зависимата епилепсия подходящата терапия не се изразява в конвенционални антиепилептични медикаменти, а в непосредствено приложение на пиридоксин. От друга страна идентификацията на генетичния вариант, причиняващ патологията, е ключова за изясняване на носителския статус на родствениците на пациентите и дори за установяване на носителска честота за дадения молекулен дефект в определен предполагаем ендемичен регион. В хода на настоящата научна разработка бяха скринирани две субпопулации на територията на България по отношение на миотония конгенита тип Бекер. От популационна гледна точка специален интерес представляваха регионите Гоце Делчев и Мездра. Установихме значителни честоти на хетерозиготно

носителство по отношение на определени мутации: 0.65% за p.Tyr524Cys в Регион Мездра и 2.59% за p.Val273Met в Гоце Делчев съответно. Познаването на генетичните особености на дадена субпопулация е от съществено значение за семейното планиране и генетичното консултиране на населението в този регион.

Интересът към заболяванията с този тип на унаследяване в поколението се поражда от възможността генетичните дефекти да останат дълго време скрити в асимптоматични индивиди. Тази особеност на автосомно рецесивните заболявания е илюстрирана от семейство, в което едновременно и независимо едно от друго сегрегират две редки наследствени невромускулни заболявания – атаксия на Фридрайх и калпаинопатия. При всички засегнати индивиди бяха доказани молекулярно генетичните дефекти в съответния ген и е проследено унаследяването им в родословието. Пациентите с атаксия на Фридрайх от това семейство са първите доказани носители на точкова мутация в *FXN* гена за българската популация, при това на нова непубликувана до момента в световната литература.

## SUMMARY

The present dissertation is focused on the neurological disorders with autosomal recessive manner of inheritance. Pyridoxine dependent epilepsy (PDE) is an autosomal recessive example of epileptic encephalopathy. The disorder is caused by mutations in the *ALDH7A1* gene [Mills *et al.*, 2006]. Myotonia congenita type Becker is an inherited disease belonging to the group of neuromuscular disorders. It is associated with mutations in the *CLCN1* gene [Lorenz *et al.*, 1994; Lehmann-Horn *et al.*, 1996] and is again inherited in an autosomal recessive manner.

By the means of latest molecular technologies, for the first Bulgarian cases of pyridoxine dependent epilepsy and myotonia congenita type Becker have been verified at the molecular genetic level, determining also the carrier status of their parents. In two of the altogether six tested families, the *ALDH7A1* disease causing mutations have been identified. We found one novel unpublished nucleotide change enriching the spectrum of reported mutations with one of the rarest type for the *ALDH7A1* gene – a deletion.

In the group of myotonia congenita type Becker, the clinical diagnosis was verified at the molecular genetic level in seven out of the nine tested families. There has been identified also a novel mutation in the *CLCN1* gene. Genetic verification of the clinical diagnosis is of crucial importance in order to define the appropriate treatment of the patients – in the case of PDE the appropriate treatment consists in immediate administration of pyridoxine rather than conventional anticonvulsants.

On the other hand, identification of the disease causing mutation is the key to clarify the carrier status of the patient's relatives and even to determine the carrier frequency of a given molecular defect in a presumable endemic region. In regard to myotonia congenita type Becker, we have screened two subpopulations residing on the territory of Bulgaria. The regions of Gotse Delchev and Mezdra were interesting from populational point of view. We determined significant carrier frequencies of the following nucleotide changes: 0.65% for the p.Tyr524Cys mutation in the region of Mezdra and 2.59% for the p.Val273Met mutation in the region of Gotse Delchev respectively. Knowing the genetic features of a given subpopulation

is of crucial importance during family planning and genetic counseling of the population of the region.

The interest in autosomal recessive disorders emerges from the possibility that they remain hidden in asymptomatic individuals for many generations. This peculiarity of the autosomal recessive disorders can be illustrated with a family with two simultaneously and independently segregating rare inherited neuromuscular disorders – Friedreich ataxia and calpainopathy. In all affected individuals, the molecular genetic changes in the corresponding genes have been identified and the inheritance in the pedigree has been followed-up. The Friedreich ataxia patients from this family represent the first reported carriers of a point mutation in the *FXN* gene for the Bulgarian population, even more they are carriers of a novel so far unpublished mutation.

„Трябва да има нещо дълбоко скрито зад нещата.“  
(“Something deeply hidden had to be behind things.”)

Алберт Айнщайн

## ВЪВЕДЕНИЕ

Неврогенетиката е наука, изучаваща ролята на генетичните фактори в развитието и функционирането на нервната система. Както показва и самото наименование, тя представлява комбинация от аспекти на невробиологията и генетиката, фокусирайки се по-специално върху това, как генетичният материал на даден организъм влияе върху изявата на фенотипните му характеристики. Неврогенетиката се оформя като наука през втората половина на 20 век и се развива много бързо, следвайки развитието на технологиите. Тя възниква от напредъка в областта на молекулярната биология и генетиката и стреми да се изясни връзката между гените, поведението, мозъка и неврологичните заболявания. Областта започва да се разраства през 60-те години на 20 век с трудовете на Seymour Benzer, считан за баща на неврогенетиката [Harris, 2008].

В контекста на човешката, и по-специално на медицинската генетика, неврогенетиката разглежда измененията в наследствената информация като причина за развитие на неврологични заболявания, генотип-фенотипната корелация и евентуалната възможност за лечение чрез генна терапия.

Неврологичните заболявания са многобройна и разнообразна група заболявания, обединени от факта, че засягат централната или периферната нервна система. Епилептичните енцефалопатии и невромускулните заболявания представляват два основни клона от тази група. Много интересен представител на епилептичните енцефалопатии е пиридоксин зависимата епилепсия (ПЗЕ). Тя спада към групата на кофактор-зависимите епилепсии, които се характеризират с добро повлияване от терапия с даден кофактор, а не от класически антиепилептични медикаменти. Честотата на заболяването варира в различни популационни проучвания – от 1:20 000 в Германия [Ebinger *et al.*, 1999], 1:700 000 в Обединеното Кралство и Ирландия [Baxter, 1999]. Клинично се характеризира с комбинация от различен тип гърчове, които обикновено

започват още през първите часове от живота на пациента. Те не се повлияват от конвенционални антиконвулсанти, а само от непосредствено приложение на пиридоксин. Лечението трябва да продължи през целия живот на пациента, при прекъсване на ежедневния прием на пиридоксин се наблюдава бърз рецидив на епилептичните пристъпи. ПЗЕ е автозомно рецесивно наследствено заболяване, което се дължи на молекулни дефекти в гена *ALDH7A1*, кодиращ ензима алфа-аминоадипат семиалдехид дехидрогеназа (антиквитин) [Mills *et al.*, 2006]. До момента са описани по-малко от 100 мутации, разпръснати по цялата дължина на гена. Екзони 4, 6, 9, 11 и 14 се считат за „горещ регион“ при европейската популация, в който попадат около 60% от описаните до момента мутации [Mills *et al.*, 2010; Stockler *et al.*, 2011].

Миотония конгенита е наследствено заболяване, спадащо към групата на невромускулните заболявания. Тя представлява недистрофично скелетно мускулно нарушение, характеризиращо се най-напред с невъзможност за релаксиране на мускулите след волево съкращение. Симптомите се задълбочават след период на покой и отшумяват след раздвижване – феномен, наречен „warm-up effect“. Заболяването се причинява от мутации в *CLCN1* гена [Lorenz *et al.*, 1994; Lehmann-Horn *et al.*, 1996], кодиращ белтък CIC-1 [Brugnoni *et al.*, 2013]. Съществуват 2 основни форми на миотония конгенита: тип Томсън (MIM# 160800) и тип Бекер (MIM# 255700), различаващи се по начина на унаследяване. Миотония конгенита тип Томсън е с автозомно доминантно унаследяване, а тип Бекер – с автозомно рецесивно. Последната обикновено се извява в по-късна детска възраст, но с по-тежка симптоматика в сравнение с Томсън формата [Thomsen, 1876; Becker *et al.*, 1977]. Среща се по-често от доминантната форма с честота съответно от 0.6 до 0.3 на 100 000 в общата популация [<http://www.rarediseases.org>], с изключение на северните скандинавски държави, където заболяването е значително по-често, засягайки 1 на 10 000 души [<https://ghr.nlm.nih.gov>]. До момента повече от 160 мутации от всякакъв тип (missense, nonsense, делеции, splice-site мутации) са докладвани по дължината на всичките 23 екзона на *CLCN1* гена [Lossin *et al.*, 2008; Brugnoni *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015].

Настоящият дисертационен труд е насочен към неврологичните заболявания с автозомно рецесивно унаследяване. В тази връзка специален интерес представляват вече споменатите редки заболявания пиридоксин зависимата епилепсия (от групата на

епилептичните енцефалопатии) и миотония конгенита тип Бекер (като представител на невромускулните заболявания). Интересът към заболяванията с този тип предаване в поколението се поражда от възможността генетичните дефекти да останат дълго време скрити в асимптоматични индивиди. По този начин в едно единствено семейство могат дори да се съберат две различни редки заболявания, без членовете му да подозират за съществуването на което и да е от тях. С помощта на най-съвременни молекулярни методики за първи път в България бяха генетично верифицирани случаи на пиридоксин зависима епилепсия и миотония конгенита, както и беше проследено унаследяването при техните родители. Генетичното верифициране на клинично поставената диагноза е от съществено значение от една страна при редки болести с нестандартен тип лечение - при пиридоксин зависимата епилепсия подходящата терапия не се изразява в прилагане на конвенционални антиепилептични медикаменти. От друга страна идентификацията на генетичния вариант, причиняващ патологията, е ключова за изясняване на носителския статус на родствениците на пациентите и дори за установяване на носителска честота за дадения молекулен дефект в определен предполагаем ендемичен регион – в хода на дадената разработка бяха скринирани две субпопулации на територията на България по отношение на миотония конгенита тип Бекер. Познаването на генетичните особености на симптоматичните индивиди, на дадено родословие, а дори и на субпопулацията е от съществено значение за семейното планиране и генетичното консултиране на пациентите и техните близки.

## 1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

### 1.1. НЕВРОЛОГИЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ И НЕВРОГЕНЕТИКА

Терминът неврологично заболяване се дефинира като патологично състояние, засягащо и нарушаващо нормалното предаване на електрическите импулси в нервната система – било то централната или периферната нервна система, или и двете. Към основните симптоми, които могат да се проявят по време на развитието на заболяването, се включват нарушения във функцията на моторната система, на волевите и неволевите движения, на сетивната система, когнитивната функция, паметта и абстрактното мислене. Поради сравнително високата им обща честота, като цяло неизвестните механизми на патогенеза и същественото влияние върху живота на засегнатите индивиди, семействата им и обществото, изясняване на етиологията и патофизиологията на неврологичните заболявания е едно от най-големите предизвикателства, пред които е изправена модерната науката. Ролята на генетичния компонент варира много широко при неврологичните заболявания – от моногенност, като при мускулната дистрофия на Дюшен, до предразположение и много по-сложни мултифакторни зависимости, като при Болест на Алцхаймер и Паркинсон. Молекулярно генетични и епидемиологични проучвания доведоха до оформяне на две основни групи гени, имащи отношение към развитието на дадено заболяване: гени, причиняващи заболяването (моногенни заболявания) и такива, определящи предразположение към развитие на даденото заболяване (мултифакторни заболявания) [Faghihi *et al.*, 2004].

Фокусът на неврогенетиката е насочен именно към изясняване на наследствения фактор в патогенезата, включвайки аспекти от невробиологията и генетиката. Неврогенетиката се оформя като наука през втората половина на 20 век и се развива много бързо, следвайки развитието на технологиите. Тя възниква от напредъка в областта на молекулярната биология и генетиката и стремежа да се изясни връзката между гените, поведението, структурите на централната и периферната нервна система и неврологичните заболявания. Областта започва да се разраства през 60-те години на 20 век с трудовете на Seymour Benzer, считан за баща на неврогенетиката [Harris, 2008].

Пионерната му работа с *Drosophila* спомага за изясняване връзката между циркадните ритми и гените [Benzer, 1968], което довежда до по-нататъшно изучаване на поведенческите особености и наследствената информация. Той също така започва научно-изследователска работа в областта на невродегеренацията при плодовата мушица в опит да открие начин за потискане на неврологичните заболявания при човека. Много от техниките, които Benzer използва, и изводите, до които стига, са допринесли за бъдещото развитие на неврогенетиката [Leslie, 2007].

В ранните си етапи неврогенетиката се базира на статистическа интерпретация за оценяване на вероятността за скаченост – чрез определяне на LOD (logarithm of odds) индекси на родословните дървета, и други обсервационни методи като метода на близначните двойки, оценяващ фенотипните прилики и разлики на фона на унаследената генетична информация. В края на 80-те години на 20-ти век развитието на рекомбинантните ДНК технологии позволява по-широкото използване на ДНК полиморфизмите за определяне на връзката между ДНК и вродени заболявания (linkage analysis) [Tanzi, 1991; Greenstein *et al.*, 1994]. През 90-те години все по-големият напредък в областта на молекулярно-генетичните технологии води до все по-голяма достъпност и разбираемост на генетичния анализ. През това десетилетие се откриват много специфични гени, играещи роля в патогенезата на неврологични заболявания, като например за Чуплива X хромозома, Болест на Алцхаймер, Болест на Паркинсон и Амиотрофична Латерална Склероза [Tandon, 2000]. 21-ви век е белязан от рязък скок в използваните методики, благодарение на които вече е възможно да се изучават директно цели геноми. При така наречените genome-wide association studies (GWAS) се анализира целия набор от генетични варианти в рамките на един геном. При сравняване на информацията, получена от различни индивиди, може да се установи асоциация на даден вариант с определена фенотипна изява – например неврологично заболяване. Това води до стремглаво откриване на все повече връзки между изменения в наследствената информация и генетични болести. Установяване на гена, причиняващ или асоцииран с дадено заболяване, спомага за разкриване на молекулните механизми, стоящи в основата на развитието на заболяването. С помощта на клетъчни и животински модели е възможно да се идентифицира ролята на мутациите при моногенните заболявания или на генетичните варианти при предразположенията, а от там да се

работи по посока на идентифициране на молекулни мишени за генна терапия [Faghihi, 2004].

## **1.2. ЕПИЛЕПТИЧНИ ЕНЦЕФАЛОПАТИИ**

Голяма група неврологични заболявания са епилептичните енцефалопатии. Тя обединява заболявания, които се характеризират с когнитивна и невропсихологична регресия, дължаща се на прекомерна иктална и интериктална епилептогенна активност по време на мозъчното развитие. Прогресията при тези заболявания води до необратими увреди в развиващия се мозък. Повечето епилептични енцефалопатии се третират с антиепилептични лекарствени препарати, но те често не могат да овладеят пристъпите, а дори и ако го направят, тази мярка е само симптоматична и не е специфична. В терапевтичен план е особено важно да се идентифицира етиологията на заболяването, за което има специфично лечение. Само при малък брой от тези състояния има установена специфична терапия, включваща прилагане на определени витамини или производни на витамини, което би могло да промени естествения ход на заболяването и да спре прогресията му [Agadi *et al.*, 2013]. Такъв е случаят при кофактор зависимите епилептични енцефалопатии, като например пиридоксин зависимата, пиридоксал 5'-фосфат зависимата, биотин зависимата и фолат зависимата епилепсия.

### **1.2.1. КОФАКТОР ЗАВИСИМИ ЕПИЛЕПСИИ**

Ранното поставяне на диагноза и начало на лечение при кофактор зависимите епилепсии е от критично значение както за овладяване на епилептичните пристъпи, така и за мозъчното развитие и предотвратяване на вторично увреждане на мозъка от прекомерната епилептогенна активност. Разпознаването на тези специфични заболявания е ключово за правилното им третиране, поради резистентността на гърчовете към класически антиепилептични медикаменти и необходимостта от специфични кофактори [Tein, 2015]. Кофактор зависимите епилептични енцефалопатии

неправилно биха могли да бъдат определени като резистентни на лечение поради липсата на ефект от прилагането на стандартна терапия.

## 1.2.2. ПИРИДОКСИН ЗАВИСИМА ЕПИЛЕПСИЯ

### 1.2.2.1. Клинична картина

Пиридоксин зависимата епилепсия (ПЗЕ; MIM# 266100) е рядко неврометаболично заболяване, което клинично се характеризира с комбинация от различен тип епилептични пристъпи. Обикновено гърчовете се появяват още през първите часове от живота на пациента и са неподдатливи на терапия с конвенционални антиконвулсанти. Единствено непосредствено приложение на пиридоксин хидрохлорид оказва влияние, като при прекъсване на терапията бързо се наблюдава рецидивирание на епилептичните пристъпи. Четири клинични критерия се използват за поставяне на диагноза ПЗЕ:

- 1) гърчове, резистентни на стандартна антиепилептична терапия;
- 2) добър отговор към пиридоксинова терапия;
- 3) абсолютен контрол на гърчовете при приложение на пиридоксинова монотерапия;
- 4) рецидивирание на епилептичните пристъпи при прекратяване на пиридоксиновата терапия [Millet *et al.*, 2011].

Освен резистентните гърчове пациентите проявяват множество други съпътстващи проблеми, като раздразнимост, плач, недобро хранене, гастроинтестинални симптоми (емеза, абдоминална дистензия), нарушения на съня, лицеви гримаси, анормални очни движения. Въпреки че гърчовете най-често са продължителни, достигайки дори до повтарящи се епизоди на *status epilepticus*, повтарящи се самоограничаващи се частични, генерализирани или атонични гърчове, миоклонични гърчове и инфантилни спазми също могат да бъдат наблюдавани. При някои пациенти се наблюдава умствено изоставане, като то може да варира от леко до тежко (най-вече засягащо говора). При лечение с пиридоксин повечето пациенти

достигат до абсолютен контрол на епилептичните пристъпи, но 75-80% от пациентите остават с някаква степен на интелектуално изоставане [[http://www.orpha.net/consor4.01/www/cgi-bin/OC\\_Exp.php?lng=EN&Expert=3006](http://www.orpha.net/consor4.01/www/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=EN&Expert=3006)].

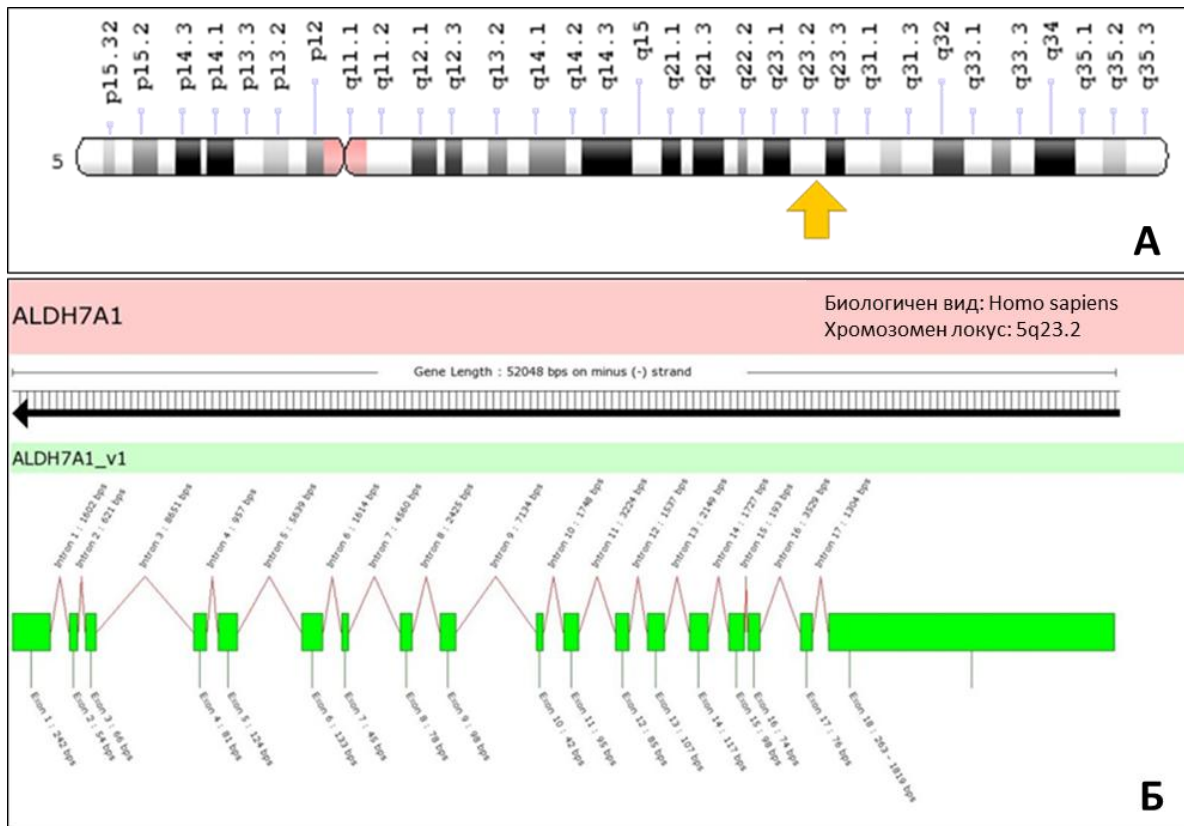
Според началото на заболяването ПЗЕ се разделя на две групи – с ранно и с късно начало [Baxter *et al.*, 1999]. ПЗЕ с ранно начало е типичната форма на ПЗЕ, изявява се с появата на гърчове (фокални, генерализирани тонични, клонични или миоклонични) още в първите часове/дни след раждането, които не се повлияват от класически антиепилептични лекарства. ПЗЕ с късно начало може да не се прояви значително време след раждането, понякога дори до 3 годишна възраст, няма наличие на енцефалопатия или структурни нарушения в мозъка, гърчовете отново не се повлияват от класическите антиепилептични лекарства. В някои атипични случаи може и да се наблюдава начален, но краткотраен отговор при терапия с класически антиепилептични медикаменти; възможно е първоначално неповлияване от терапия с пиридоксин, но след няколко месеца терапията да даде очаквания ефект; наблюдават се по-дълготрайни интервали без гърчове при спиране на пиридоксиновата терапия [Mills *et al.*, 2010].

#### **1.2.2.2. Честота на заболяването**

Честотата на заболяването варира в различни популационни проучвания – от 1:20 000 в Германия [Ebinger *et al.*, 1999] до 1:700 000 в Обединеното Кралство и Ирландия [Baxter *et al.*, 1999].

#### **1.2.2.3. Генетична основа на заболяването и засегнат белтъчен продукт**

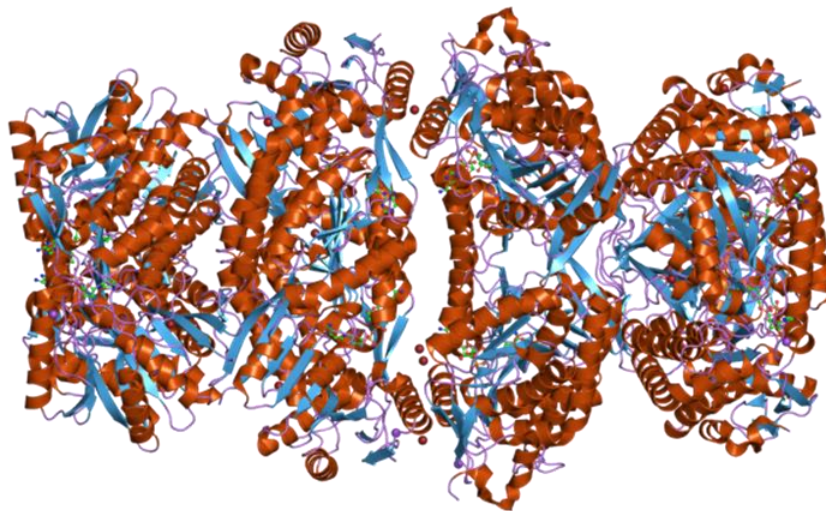
Пиридоксин зависимата епилепсия е описана за пръв път през 1954 г. от Hunt и сътр. [Hunt *et al.*, 1954]. Генетичната причина за заболяването е открита значително по-късно – през 2006 г. [Mills *et al.*, 2006]. ПЗЕ се причинява от мутации в *ALDH7A1* гена (MIM\* 107323), кодиращ ензим алфа-аминоадипат семиалдехид дехидрогеназа (антиквитин). Разположен е на дългото рамо на 5-та хромозома (5q23.2) и съдържа 18 екзона (Фигура 1).



**Фигура 1. *ALDH7A1* ген.** А. Локализация на *ALDH7A1* гена върху 5-та хромозома (5q23.2). Б. Схематично представяне на *ALDH7A1* гена <http://www.aldh.org/website/aldh/aldhrecord.php?genename=ALDH7A1>.

До момента са описани по-малко от 100 мутации, разпръснати по цялата дължина на гена. Екзони 4, 6, 9, 11 и 14 се считат за „горещ“ регион при европейската популация, в които се разполагат около 60% от описаните до момента мутации [Mills *et al.*, 2010; Stockler *et al.*, 2011]. Заболяването се унаследява автосомно рецесивно, т.е. за развитието му е необходимо наличие на мутации и в двете копия на *ALDH7A1* гена. Родителите на пациентите са хетерозиготни носители на дефект в този ген, т.е. имат само едно копие с мутация и обикновено са асимптоматични. Съответно родители, които са хетерозиготни носители, имат 25% вероятност за всяко дете да бъде болно, 50% вероятност да е здрав носител и 25% да е здрав неносител на дефект в *ALDH7A1* гена.

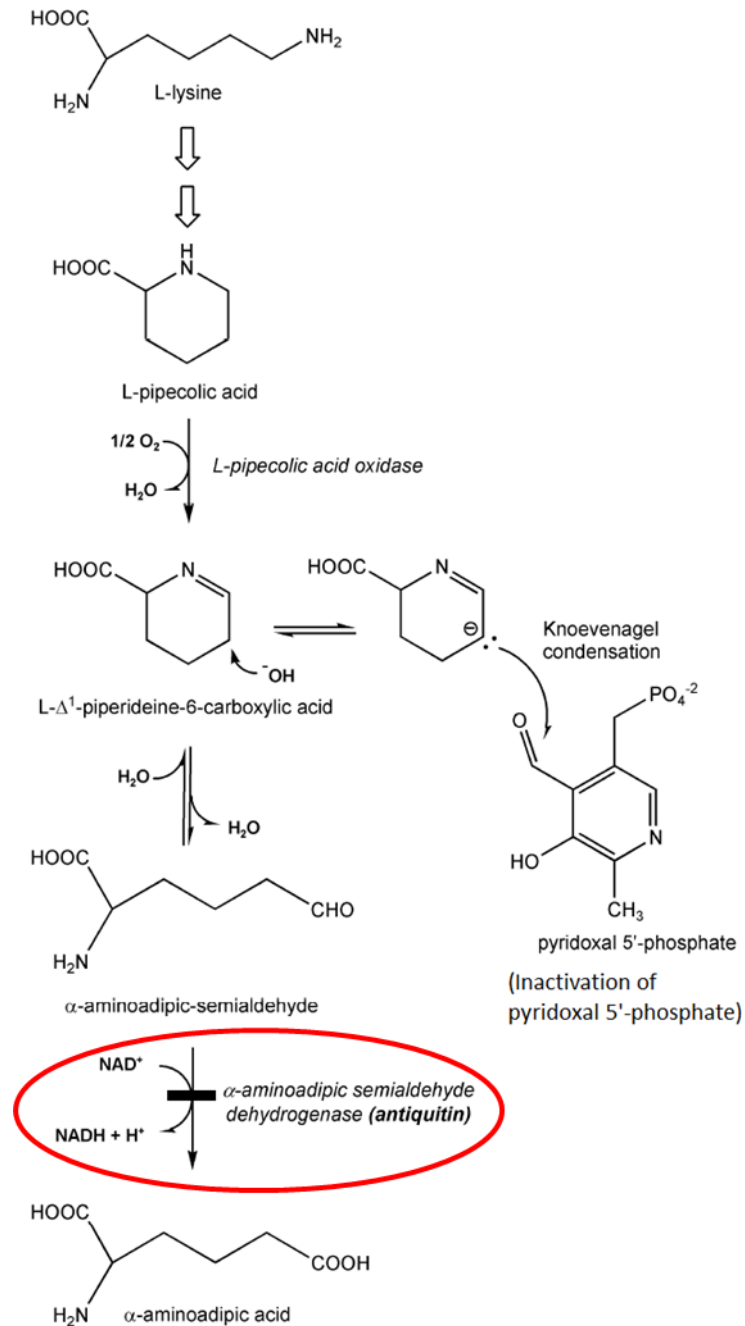
Както вече беше споменато продуктът на гена *ALDH7A1* е белтъкът антиквитин, който е изграден от 510 аминокиселинни остатъка (Фигура 2).



**Фигура 2. Структура на белтъка антиквитин (алфа-аминоадипат семиалдехид дехидрогеназа).**

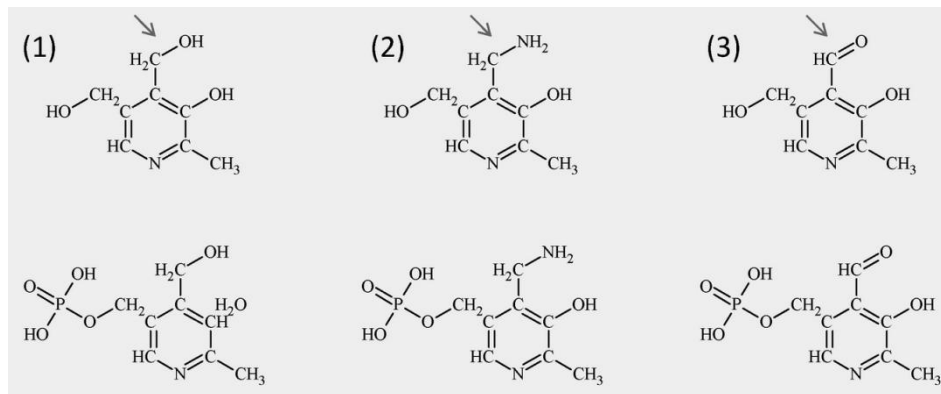
Той спада към подсемейство 7 на семейството на алдехид дехидрогеназите. Счита се, че тези ензими играят ключова роля за детоксификацията на алдехидите, получени в резултат на алкохолния метаболизъм и липидната пероксидация. Конкретният представител участва в разграждането на аминокиселината лизин, което се извършва в митохондриите. Според скорошни проучвания белтъкът се среща както в цитозола, така и в митохондриите, като тези 2 форми са резултат от транслация от алтернативни инициационни сайтове. Идентифицирани са и множество псевдогени на *ALDH7A1* гена [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>].

Антиквитинът участва в катаболизма на аминокиселината лизин [[http://www.orpha.net/consor4.01/www/cgi-bin/OC\\_Exp.php?lng=EN&Expert=3006](http://www.orpha.net/consor4.01/www/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=EN&Expert=3006)] в мозъка по т.нар. пипеколинов път (Фигура 3). Нарушаването на функцията му води до натрупване на L- $\Delta^1$ -пиперидин-6-карбоксилат, който кондензира с пиридоксал фосфата и го инактивира, което причинява недостатъчност на пиридоксал фосфат в мозъка [Mills *et al.*, 2006].



**Фигура 3. Пипеколинов път на разграждане на аминокиселината лизин в мозъка [Ghatge *et al.*, 2012]. С червен овал е оградена реакцията, при която настъпва метаболитният блок при ПЗЕ. Натрупаният L- $\Delta^1$ -пиперидин-6-карбоксилат кондензира с пиридоксал фосфата и го инактивира.**

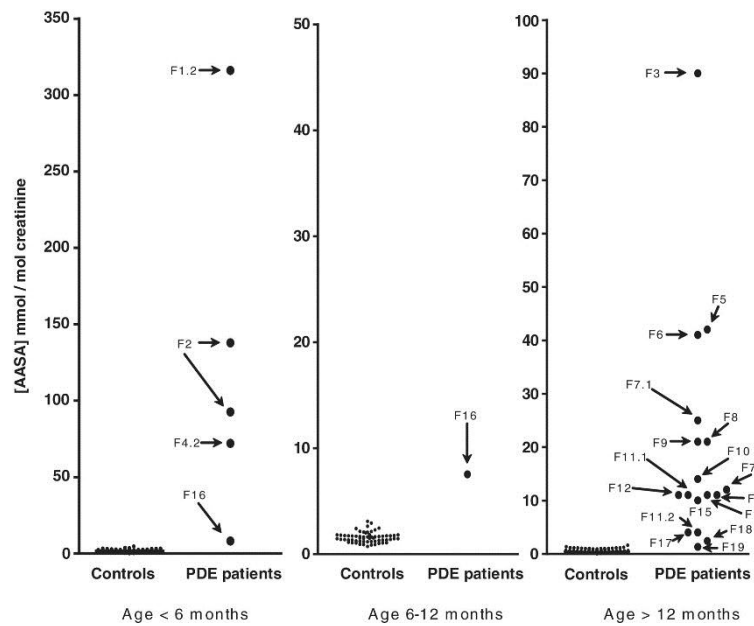
Именно пиридоксал фосфатът е активният витамин на пиридоксина (Фигура 4). Той е кофактор за множество ензими от централната нервна система, което предполага, че епилептичните пристъпи при ПЗЕ са резултат от нарушения метаболитизъм на някои аминокиселини и невротрансмитери в гръбначно мозъчната течност [Plecko *et al.*, 2007].



**Фигура 4. Витамин В6: структура на шестте В6 витаминера.** Витамин В6 е представен в човешкото тяло от шест витаминера: 1) пиридоксин и пиридоксин 5'-фосфат; 2) пиридоксамин и пиридоксамин 5'-фосфат; 3) пиридоксал и пиридоксал 5'-фосфат. Кофакторна активност има само пиридоксал фосфатът. Със стрелки са отбелязани различните групи в позиция 4' [<http://www.hellmann-lab.com/research.php>].

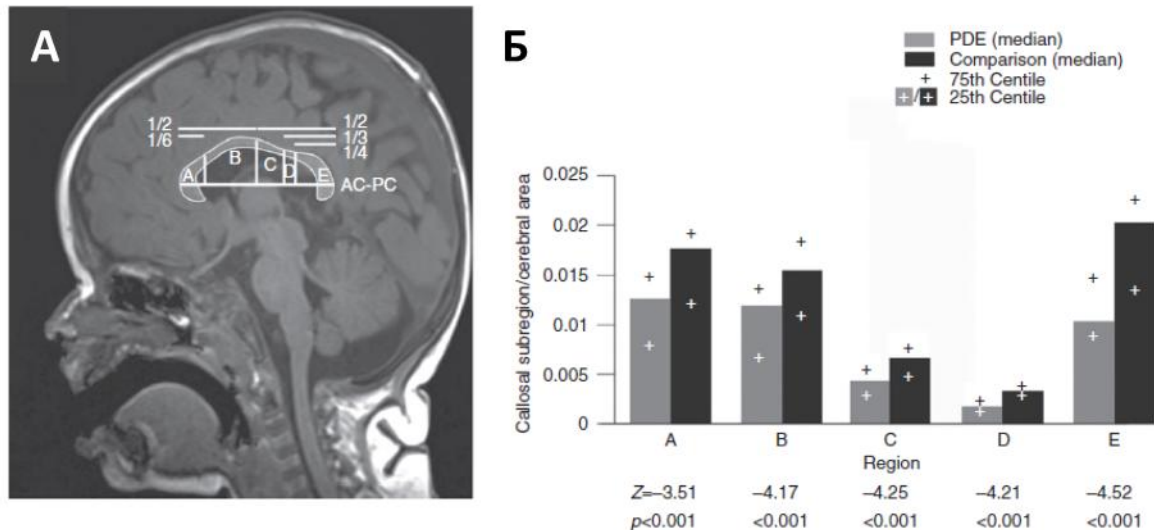
#### 1.2.2.4. Диагностика на заболяването

До скоро биохимичната основа на пиридоксин зависимата епилепсия беше неизвестна и диагностиката се извършваше само клинично. През 2005 год. Plecko и сътр. описват за първи път увеличени нива на пипеколова киселина в плазма и ликвор при пациенти с ПЗЕ. Този биохимичен маркер обаче не е специфичен за даденото заболяване, тъй като се наблюдава и при чернодробни заболявания и пероксизомални дефекти [Peduto *et al.*, 2004]. Специфичен биохимичен маркер за диагностициране на ПЗЕ е повишеното ниво на метаболита алфа-аминоадипат-семиалдехид в плазма, ликвор и урина, което остава високо с години дори при провеждане на адекватна терапия [Plecko *et al.*, 2007] (Фигура 5).



**Фигура 5. Анализ на алфа-аминоадипат-семиалдехид ( $\alpha$ -AASA) в урина при пациенти с мутации в *ALDH7A1* гена и здрави контроли [Plecko *et al.*, 2007]. Анализът се извършва посредством течна хроматография-мас спектрометрия (Liquid chromatography–mass spectrometry), като се измерва съотношението  $\alpha$ -AASA/креатинин в урина. Наблюдава се възрастово различие в нивата на  $\alpha$ -AASA в урината. При възрастово отговаряща контролна група ПЗЕ пациентите могат да бъдат ясно отдиференцирани.**

Множество разнообразни ЕЕГ находки са описани при ПЗЕ, но никоя от наблюдаваните аномалии не е специфична за това заболяване [Mikati *et al.*, 1991; Nabbout *et al.*, 1999; Naasan *et al.*, 2009; Bok *et al.*, 2010; Mills *et al.*, 2010; Schmitt *et al.*, 2010]. Аналогично, редица образни аномалии са откривани при ПЗЕ пациенти [Baxter *et al.*, 1996; Gospe *et al.*, 1998; Mills *et al.*, 2010; Friedman *et al.*, 2014], но единствено изтъняването на corpus callosum се забелязва винаги при ядрено-магнитен резонанс (Фигура 6) [Friedman *et al.*, 2014].

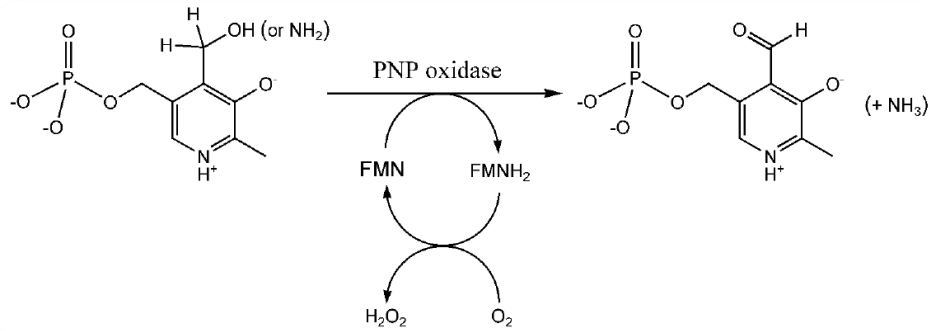


**Фигура 6.** Подрегиони на corpus callosum и относителната им дебелина спрямо целия мозъчен обем при пациенти с пиридоксин зависима епилепсия и контролни групи. А. Части на corpus callosum според Hofer и Frahm (2006). В. Изтъняване на всеки от регионите при ПЗЕ-пациенти [Friedmann *et al.*, 2014].

Точната диагноза при пациента може да се постави само след провеждане на ДНК анализ за търсене на молекулни дефекти по цялата дължина на *ALDH7A1* гена. Ако не се открият мутации в *ALDH7A1* гена, то тогава е удачно да се търсят молекулни дефекти и в *PNPO* гена, отговорен за пиридоксал фосфат зависима епилепсия [Plesko *et al.*, 2014].

#### 1.2.2.5. Диференциална диагностика

Пиридоксал 5'-фосфат зависима епилепсия (ПФЗЕ; MIM# 610090) е автосомно рецесивно наследствено заболяване, което се дължи на молекулни дефекти в гена *PNPO* (MIM\* 603287). Той кодира ензима пиридоксин 5'-фосфат оксидаза [Mills *et al.*, 2005], катализиращ превръщането на пиридоксин фосфат и пиридоксамин фосфат в активен пиридоксал фосфат (Фигура 7).



**Фигура 7: Превръщане на пиридоксин 5'-фосфат /пиридоксамин 5'-фосфат в активен пиридоксал 5'-фосфат под действие на пиридоксин 5'-фосфат оксидаза [Ghatge *et al.*, 2012]. PNP oxidase - пиридоксин 5'-фосфат оксидаза; FMN- ФМН (флавин мононуклеотид).**

Децата с ПФЗЕ обикновено са недоносени и веднага след раждането проявяват симптоми подобни на тези при органична ацидемия (хипогликемия и лактатна ацидоза), придружени с трудно овладяеми гърчове. Новородените са с нарушена постнатална адаптация, наподобяваща хипоксично-исхемична неонатална енцефалопатия. В гръбначно-мозъчната течност и плазмата се наблюдават характерни биохимични отклонения, като повишени нива на глицин, треонин, хистидин и 5-метокситирозин, понижени хомованилова киселина и 5-хидроксииндолацетат. В урината е повишена екскрецията на ваниллактат. Наблюдаваните биохимични отклонения в показателите се дължи на дефицит във функцията на определени ензими, тъй като те изискват за работата си кофактора пиридоксал фосфат.

Гърчовете не се повлияват от антиепилептични препарати или пиридоксин. За лечението на ПФЗЕ се използва пиридоксал фосфат (един от витамините на витамин В6, Фигура 4) [Hoffmann *et al.*, 2007; Bagci *et al.*, 2008]. Обичайната дневна доза пиридоксал фосфат е 30–50 мг/кг/ден разделена в 3-4 приема [Hoffmann *et al.*, 2007]. Нелекувана ПФЗЕ води до смърт или тежки неврологични нарушения.

Докладвани са обаче пациенти, които се повлияват от терапия с пиридоксин. При тези болни първоначалната диагноза била ПЗЕ, но не са били открити мутации в *ALDH1A7* гена, а в *PNPO* гена, с което е доказана ПФЗЕ [Plecko *et al.*, 2014]. Именно поради близката клинична картина на двете заболявания диференциалната

диагностика на пиридоксин зависимата епилепсия включва и пиридоксал 5'-фосфат зависимата епилепсия.

Диференциалната диагностика включва и други заболявания, водещи до епилептична енцефалопатия като например други вродени метаболитни нарушения (дефицит на глюкозен транспортер тип 1, 4-хидрокси бутират ацидурия и молибденов дефицит), моногенни заболявания и фетална или неонатална мозъчна травма. Освен вече споменатата пиридоксал фосфат зависима епилепсия, хиперпролинемия тип 2 и инфантилна хипофосфатазия също трябва да бъдат изключени [[http://www.orpha.net/consor4.01/www/cgi-bin/OC\\_Exp.php?lng=EN&Expert=3006](http://www.orpha.net/consor4.01/www/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=EN&Expert=3006)].

#### 1.2.2.6. Терапия на заболяването

Стандартната терапия при ПЗЕ включва доживотен ежедневен прием на пиридоксин орално (15-30 mg/kg/ден, разделени на 3 дози при бебета; до 200 mg/ден при новородени и 500 mg/ден възрастни) за контрол на гърчовете, както и регулярни прегледи. За първоначално прекъсване на *status epilepticus* са необходими до 5 дози от 100 mg пиридоксин интравенозно, под строго наблюдение на пациента за знаци на кардио-респираторен арест [[http://www.orpha.net/consor4.01/www/cgi-bin/OC\\_Exp.php?lng=EN&Expert=3006](http://www.orpha.net/consor4.01/www/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=EN&Expert=3006)]. Освен това пациентите се подлагат и на диета, бедна на аминокиселината лизин [van Karnebeek *et al.*, 2012]. При някои пациенти е описана комбинирана терапия с пиридоксин и фолиева киселина, но до момента няма обяснение по какви механизми фолиевата киселина оказва терапевтичен ефект при дефекти в *ALDH7A1* гена [Gallagher *et al.*, 2009]. При рисковата бременност майката може да приема пиридоксин (100 mg/ден) през втората половина от бременността и новородените трябва да се третират профилактично с пиридоксин до изясняване на носителския им статус.

Прекомерната употреба на пиридоксин обаче трябва да бъде избягвана, поради опасността от развитие на обратима сензорна невропатия в резултат от пиридоксинова невротоксичност. В литературата са описвани случаи на сензорна невропатия при възрастни пациенти с пиридоксин зависима епилепсия при терапия с твърде висока доза пиридоксин (2 g/ден) [McLachlan *et al.*, 1995, Rankin *et al.*, 2007].

### 1.2.2.7. Прогноза на заболяването

Прогнозата за ПЗЕ може много да варира и зависи до някъде от генотипа, аномалиите, които са настъпили при мозъчното развитие и отговора към терапията с пиридоксин. По-късно поставена диагноза и съответно по-късно начало на терапия обикновено се асоциира с по-значими увреждания на централната нервна система [[http://www.orpha.net/consor4.01/www/cgi-bin/OC\\_Exp.php?lng=EN&Expert=3006](http://www.orpha.net/consor4.01/www/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=EN&Expert=3006)]. За момента няма ясно утвърдени генотип-фенотипни корелации [Mills *et al.*, 2006; Kanno *et al.*, 2007; Plecko *et al.*; 2007; Bennett *et al.*, 2009; Scharer *et al.*, 2010; Stockler *et al.*, 2011, Bok *et al.*, 2012; Tlili *et al.*, 2013; Pérez *et al.*, 2013; Van Karnebeek *et al.*, 2014].

Най-честата мутация p.Glu399Gln в екзон 14 на *ALDH7A1* гена е отговорна за около 30% от дефектните алелни копия. Тази missense мутация е наблюдавана както при класически случаи, така и при атипични с късно начало [Bennett *et al.*, 2009]. Missense мутациите, които водят до наличие на остатъчна активност на ензима, се асоциират с по-добра прогноза по отношение на психичното развитие на пациента [Scharer *et al.*, 2010].

### **1.3. НЕВРОМУСКУЛНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ**

В контекста на неврогенетиката друга много голяма група болести, която трябва да бъде разгледана, е тази на невромускулните заболявания. Терминът включва много широк набор от болести, свързани с нарушения във функцията на невромускулната система. Могат да бъдат придобити или унаследени, като последните са от интерес за неврогенетиката. Като цяло невромускулните заболявания често имат прогресивен характер и се изявяват в мускулна слабост и умора. Началото на симптоматиката може да бъде много различно при различните представители на тази група заболявания: още при раждане, в детска възраст или значително по-късно. Наследствените невромускулни заболявания могат да се дължат на унаследен дефект или на спонтанно възникнала мутация при засегнатия индивид. Според клетките, които се засягат, невромускулните заболявания могат да бъдат разделени в следните категории:

2. Мускулни дистрофии – засягащи структурата на мускулните клетки
3. Заболявания на периферните моторни неврони – засягащи неврони, които контролират мускулите на ръце, крака, шия и лице
4. Заболявания на невромускулните контакти – засягащи местата на свързване на нервните и мускулните клетки
5. Миопатии – засягащи тонуса и съкращаването на волевата мускулатура, може да включват възпаление на мускулната и други тъкани
6. Метаболитни мускулни заболявания – засягащи грешки в метаболизма на мускулните клетки.

#### **1.3.1. МИОТОНИЯ КОНГЕНИТА ТИП БЕКЕР**

##### **1.3.1.1. Клинична картина**

Миотония конгенита е недистрофично скелетно-мускулно заболяване, спадащо към групата на миопатиите. Тя се характеризира с мускулна скованост и невъзможност за релаксация на мускулите след волево съкращение или механична стимулация. Наименованието на заболяването произлиза от гръцката дума за мускул „*μυο-*“ и

латинската за напрежение „*tonus*“. За първи път е описана от датско-немския лекар Asmus Julius Thomas Thomsen през 1876 г., като самият той е страдал от това заболяване [Thomsen, 1876]. Симтомите - под формата на продължителни мускулни контракции, са по-изявени след период на покой и отшумяват след раздвижване – феномен, познат като „ефект на загряване“. За съжаление този ефект бързо отслабва при прекратяване на физическата активност. При някои индивиди се наблюдава често падане в резултат на прибързани движения или загуба на равновесие. По време на падането пациентът може да изпита частична или пълна парализа, която преминава непосредствено след падането. Това може да бъде изключително опасно при падане в студена вода. При децата падане се наблюдава значително по-често от колкото при възрастните пациенти, дължащо се най-вероятно на импулсивността на поведението им.

Заболяването миотония конгенита може да бъде разделена на два основни типа: тип Томпсън (MIM# 160800) и тип Бекер (MIM# 255700). Различават се по тежестта на симптоматиката и начина на унаследяване. Миотония конгенита тип Томпсън, носеща името на Julius Thomsen, се унаследява автозомно доминантно, за разлика от автозомно рецесивната миотония конгенита тип Бекер. Последната е кръстена на немския професор Peter Emil Becker, който открива рецесивния подтип на заболяването [Becker, 1966]. Той обикновено се проявява с по-тежък фенотип и в по-късна детска възраст [Thomsen, 1876; Becker, 1977]. В този смисъл терминът конгенитална (вродена) отговаря стриктно само на формата тип Томпсън, при тип Бекер началото на заболяването може да се отложи във времето до 4-6 годишна възраст [Lossin *et al.*, 2008]. Автозомно рецесивната форма засяга най-напред мускулите на долните крайници и в последствие прогресира към мускулите на ръцете, шията и лицето. С времето е възможно да се развие лека перманентна мускулна слабост [Becker *et al.*, 1977]. И при двете форми на заболяването засегнатите индивиди развиват асоциирана с миотонията мускулна скованост и аномално разрастване на мускулите (хипертрофия). Значително увеличаване на мускулната маса и изразеността на скелетната мускулатура води до атлетичен вид на пациентите и вероятно се дължи на почти постоянното състояние на контракция на мускулите (Фигура 8) [Varkey *et al.*, 2003]. Хипертрофията по-често засяга долните крайници и е по-ясно изразена при автозомно рецесивната миотония тип Бекер.



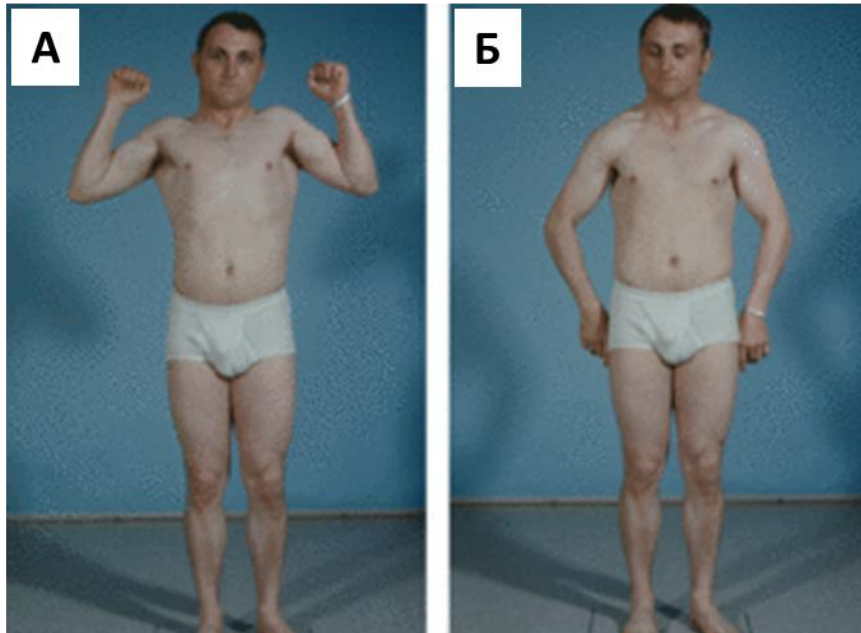
Myotonia and muscular overdevelopment.  
Disease affects both males and females.

**Фигура 8.** Хипертрофия на скелетната мускулатура при миотония конгенита [Varkey *et al.*, 2003].

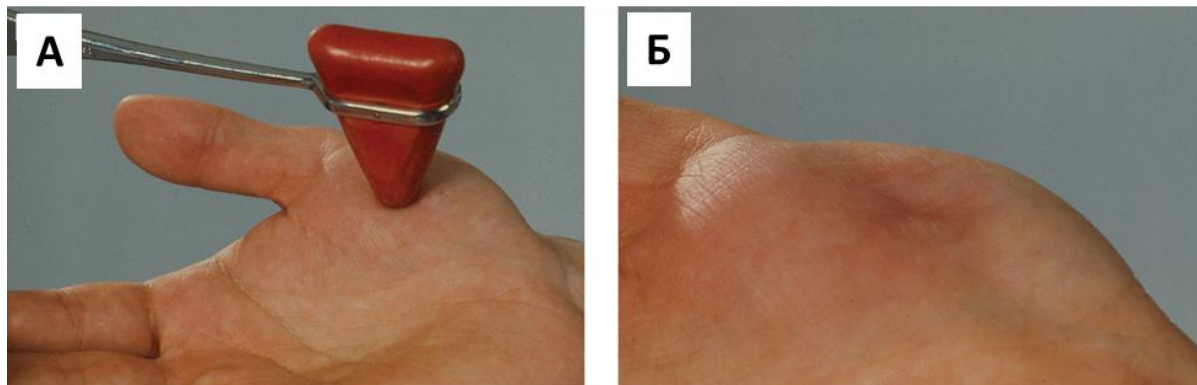
Миотонията е генерализирана и дискомфортна, мускулните болки не са типични за заболяването, но се наблюдават при някои пациенти [Fialho *et al.*, 2007]. Тежестта на скованост може да бъде повлияна от различни фактори [Heatwole *et al.*, 2007; Mankodi, 2008] като емоция [Thomsen, 1876; Gutmann *et al.*, 1991; Trip *et al.*, 2009], температура [Thomsen, 1876; Gutmann *et al.*, 1991; Trip *et al.*, 2009], упражнения [Thomsen, 1876; Colding-Jørgensen, 2005] и при бременност [Lacomis *et al.*, 1999; Trip *et al.*, 2009].

„Ефектът на загряване“ е описан от Томсън през 1876, но етиологията му все още остава неясна. Пациентите изпитват облекчаване на мускулната скованост след повтаряща се контракция на мускула, до степен на почти напълно изчезване. Ефектът трае около 5 мин [Birnberger *et al.*, 1975]. Съществуват много хипотетични механизми на този феномен, но никой от тях не е категоричен за момента.

По време на неврологичен преглед симптомите могат да бъдат наблюдавани под формата на акционна миотония, т.е. след волево съкращение, или чрез перкусионна миотония - след механично стимулиране (Фигури 9 и 10).



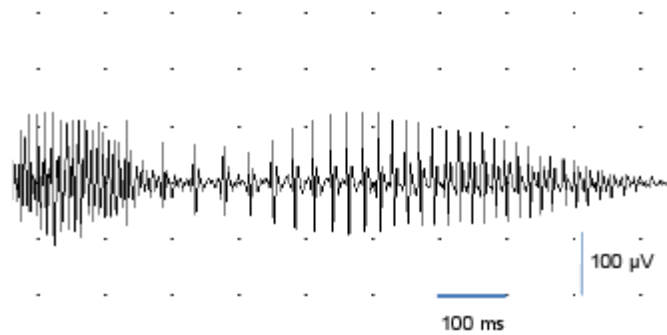
**Фигура 9. Тежка акционна миотония.** А. Пациентът е стегнал мускулите на ръцете си. В. Пациентът не може да отпусне мускулите на ръцете след волево съкращение [<http://oxfordmedicine.com/view/10.1093/med/9780199873937.001.0001/med-9780199873937-chapter-9>].



**Фигура 10. Перкусионна миотония на тенара.** А. След отпускане на ръката, тенарът се удря с чукче. В. Постоянна контракция под формата на тръпчинка е видима за поне 10 sec след съкращение [<http://oxfordmedicine.com/view/10.1093/med/9780199873937.001.0001/med9780199873937-chapter-9>].

Серумната креатин киназа е в нормални граници или леко увеличена и при двете форми на миотония конгенита. При ЕМГ се наблюдават характерни спонтанни повтарящи се електрични разряди, наречени „миотонични залпове“ (Фигура 11).

Нормално мускулът отговаря на единичен стимул с единичен акционен потенциал, докато при миотония отговарят представлява серия от акционни потенциали. При много леки форми е възможно отклоненията в ЕМГ да са единствената проява на заболяването, без наличие на мускулна скованост или миотонични реакции – такива случаи се наричат „латентна миотония“ [Rüdel *et al.*, 1985; Lossin *et al.*, 2008].



**Фигура 11. ЕМГ на пациент с миотония конгенита.** Наблюдават се типичните за заболяването „миотонични залпове“ [<http://oxfordmedicine.com/view/10.1093/med/9780199873937.001.0001/med-9780199873937-chapter-9>].

Мускулната биопсия обикновено е без отклонения, макар понякога да се наблюдават неспецифични аномалии, като повишена вариабилност на размера на мускулните влакна, увеличен брой мускулни влакна с централни ядра и липса на тип IIB влакна.

Ранни симптоми, които могат да бъдат наблюдавани при пациент в детска възраст са: проблеми с преглъщането, задавяне, сковани движения с подобрение при повтаряне, често падане, затруднено отваряне на клепачите след стискане на очите или плач (von Graefe's sign) [Wakeman *et al.*, 2008].

Възможни усложнения са аспирационна пневмония (предизвикана от проблеми с преглъщането), често задавяне при бебетата (отново поради проблеми с преглъщането), коремна мускулна слабост, хронични ставни проблеми, травми в резултат на падане.

### 1.3.1.2. Фенотипна вариабилност

Както при доминантната, така и при рецесивната форма на миотония конгенита се наблюдава голяма фенотипна вариабилност. Тежестта на симптомите може да

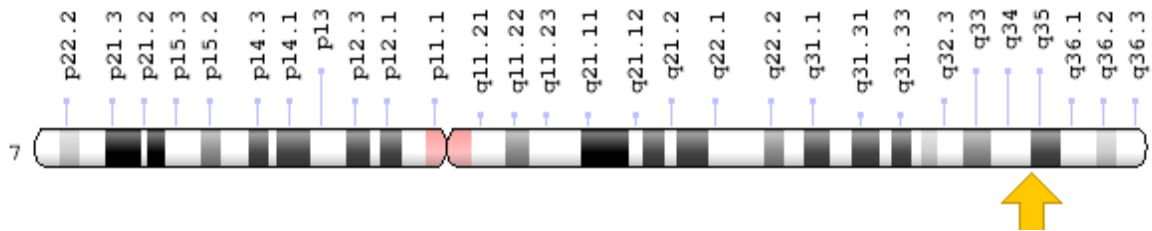
варира значително както между различни индивиди, така и през живота на конкретния индивид. Това може до известна степен да се дължи на факта, че до момента са известни повече от 160 различни мутации, причиняващи заболяването, всяка от които със собствени особености. От друга страна миотония конгенита е заболяване, дължащо се на дефект на йонен канал, а този тип молекули са чувствителни към вътрешни и външни фактори на средата. Доказано е, че бременност [Basu *et al.*, 2010] и употреба на диуретици [Bretag *et al.*, 1980] водят до утежняване на миотонията, като и двете състояния се свързват със загуба на двувалентни катиони като например магнезиеви и калциеви йони [Raman *et al.*, 1991]. Добре известно е, че адреналинът влошава миотонията и пациент с миотония конгенита може да изпита внезапно засилване на двигателните затруднения при особено стресираща ситуация, по време на която се отделя значително количество адреналин в организма. Много пациенти изпитват влошаване на симптоматиката при понижаване на околната температура [Nielsen *et al.*, 1982].

#### **1.3.1.3. Честота на заболяването**

Миотония конгенита тип Бекер се среща по-често от доминантната форма на Томпсън, със съответстващите им честоти от около 0.6 и 0.3 на 100 000 сред общата популация. Изключение правят само северно скандинавските народи, където миотония конгенита е значително по-често заболяване и засяга 1 на 10 000 души [<https://ghr.nlm.nih.gov/condition/myotonia-congenita>]. Миотония конгенита спада към т. нар. Заболявания от финладското наследство (Finnish heritage disease) и съответно е с висока честота във Финландия и сред финландския етнос.

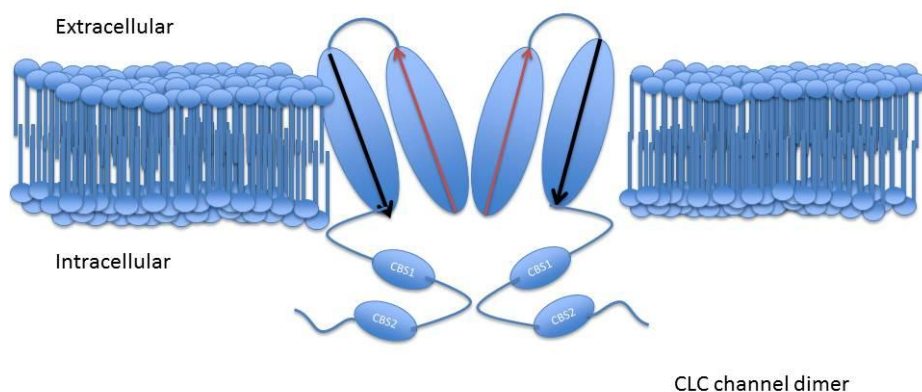
#### **1.3.1.4. Генетична основа на заболяването и засегнат белтъчен продукт**

Миотония конгенита е едно от първите заболявания при човека, доказано, че се дължи на дефект, засягащ йонен канал (каналопатия). И в двете си форми се причинява от мутации в *CLCN1* гена (MIM\* 118425). Той е локализиран върху дългото рамо на 7-ма хромозома (7q35, Фигура 12) [Lorenz *et al.*, 1994; Lehmann-Horn *et al.*, 1996] и кодира хлорен йонен канал ClC-1 в скелетно-мускулните клетки.



**Фигура 12.** Локализация на *CLCN1* гена върху 7-ма хромозома (7q35) [<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CLCN1>].

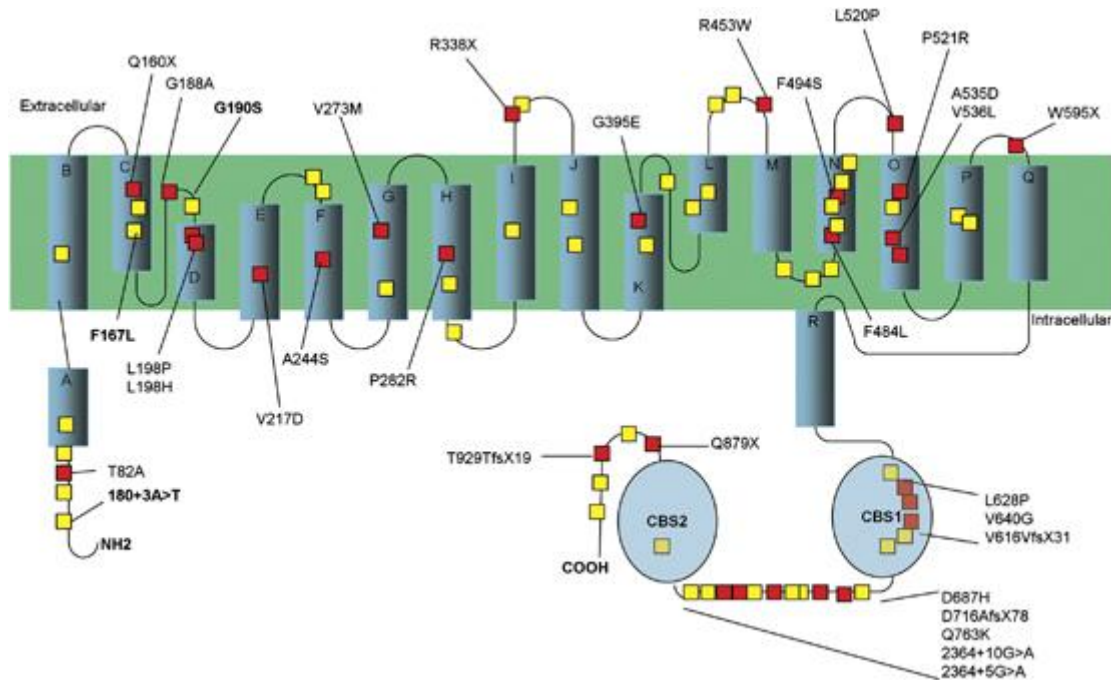
CLC-1 белтъкът играе ключова роля за реполяризацията на плазмената мембрана [Brugnoni *et al.*, 2013]. Представява трансмембранен протеин, съставен от 991 аминокиселинни остатъка. Най-общо може да бъде разделен на 2 части: amino (N)-терминален трансмембранен участък (до около 590 АК) и карбоксилен (C)-терминален цитоплазмен участък [Tang and Chen, 2011]. Функционира като хомодимер (Фигура 13) – всеки мономер в N-терминалния си участък се състои от 18  $\alpha$ -спирали, 16 от които трансмембранни. Повечето от тези спирали не са ориентирани перпендикулярно на мембраната, а са силно наклонени спрямо равнината ѝ [Chen, 2011]. C-терминалният край е локализиран от саркоплазмената страна на мембраната и е относително дълъг – съдържа две идентични цистатион b-синтазни домена, които са също от съществено значение за функцията на канала. Най-вероятно двата цистатион b-синтазни домена се огъват един спрямо друг, формирайки потенциално АТФ-свързващо място. Загуба на функцията на CLC-1 протеина води до хиперполяризация на клетъчната мембрана. Резултатът е невъзможност за релаксация след волева контракция, което представлява един от основните симптоми на заболяването [Kubisch *et al.*, 1998].



**Фигура 13.** Модел CLC хлорен канал. Всеки канал е формиран от 2 мономера, ориентирани антипаралелно. Всеки мономер има отделна пора, през която могат да преминават Cl-йони [<https://en.wikipedia.org>].

Скелетно-мускулният потенциал-зависим хлорен канал (ClC-1) се експресира почти изключително в скелетно-мускулните клетки [Steinmeyer *et al.*, 1991]. Спада към семейството на силно консервативните потенциал-зависими хлорни канали (ClCs). Експресират се в много видове организми от бактерии и дрожди до висши растения и животни. По настоящем са известни 9 различни потенциал-зависими хлорни канала [Jentsch, 2008] и мутации в много от тях се асоциират със заболявания при човека. Третичната и четвъртична структура на ClCs са различни от тези на потенциал-зависими катионни канали, като връзката между структурата и функцията на хлорните канали не е толкова добре изяснена. При липса на достатъчен брой функционално активни хлорни канали сарколемата става хипервъзбудима и след стимул продължава да бъде електрически активна по-дълго време от обичайното за скелетно-мускулна клетка. В резултат се наблюдава удължено във времето съкращение или забавена релаксация на мускула.

До момента са известни повече от 160 мутации, като броят им постоянно нараства, илюстрирайки алелната хетерогенност на заболяването. Те могат да бъдат от всякакъв тип (missense, nonsense, делеции, splice-site мутации) и се детектират по цялата дължина на *CLCN1* гена с всичките му 23 екзона (Фигура 14) [Lossin *et al.*, 2008; Brugnoni *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015]. Мутации, водещи до пълна загуба на функция (nonsense, frameshift, splice-site), обикновено водят до развитие на автозомно рецесивната форма на заболяването – тип Бекер. Доминантните мутации, причиняващи миотония тип Томсън, обикновено са missense мутации и оказват отрицателен доминантен ефект (чрез нарушаване на зависимостта от потенциала на целия димер) върху функцията на йонния канал [Mazon *et al.*, 2011]. С напредъка в областта на молекулярната генетика става ясно, че рецесивни мутации, могат да се срещат и с доминантно унаследяване при някои индивиди. Причината за този феномен за момента не е известна, възможно е да се дължи на вариабилна пенетрантност [Koty *et al.*, 1996; Kubisch *et al.*, 1998], непълна доминантност [Plassart-Schiess *et al.*, 1998], различия в алелната експресия [Dunø *et al.*, 2004] и по-ниска експресия при жени [Becker *et al.*, 1977; Mailänder *et al.*, 1996].



**Фигура 14.** Предполагаема структура на ClC-1 белтъка според Dutzler *et al.*, 2002 и Estévez *et al.*, 2004 и откритите до момента мутации по цялата дължина на белтъка [Brugnoni *et al.*, 2013].

Мутации в *CLCN1* гена са идентифицирани и при други форми на миотония. Хетерозиготно носителство на с.2680C>T (p.Arg894X) е докладвано при пациент с хиперкалиемична периодична парализа [Zhang *et al.*, 1996] и дистрофична миотония тип 2 (DM2) [Suominen *et al.*, 2008].

#### 1.3.1.5. Диференциална диагностика

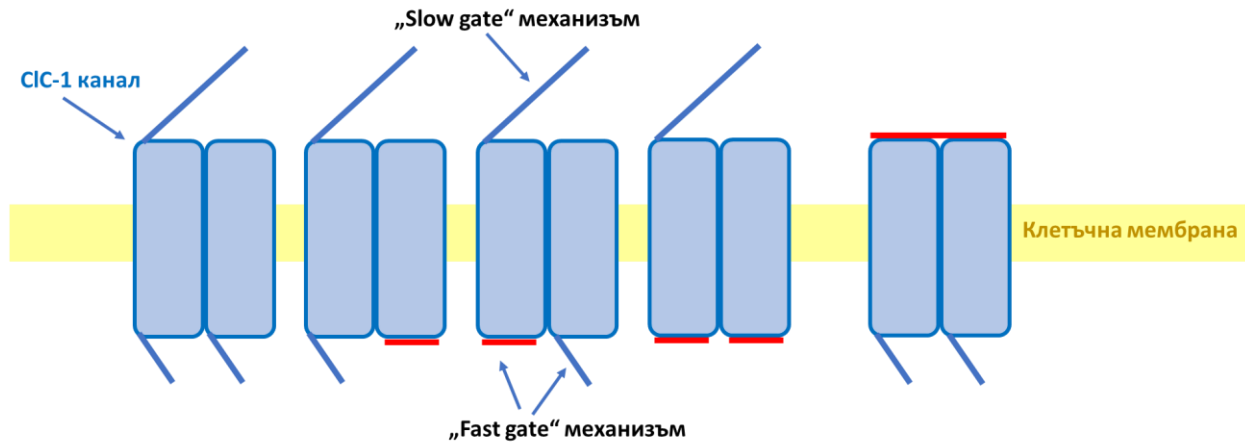
В литературата са съобщавани случаи на пациенти с клинична диагноза миотония тип Томпсън, при които обаче не са открити мутации в гена за хлоридния канал ClC-1, а в ген, кодиращ  $\alpha$ -субединицата на потенциал зависим натриев канал - *SCN4A* (MIM\* 603967, Trip *et al.*, 2007). Дефекти в *SCN4A* гена обикновено се асоциират с две други редки невромускулни заболявания: парамиотония конгенита и калий-отженяваща се миотония. Двете заболявания обаче са с автозомно доминантен модел на унаследяване. Аналогично на пациентите с *CLCN1* гена, тези с мутация в *SCN4A* могат да имат широко варираща фенотипна изява, значително усложнявайки различаването им от миотония конгенита. До 20% от пациентите с клинична диагноза миотония конгенита в действителност се оказват носители на мутации в *SCN4A*. Това обуславя при

провеждане на молекулярно генетични изследвания като втора стъпка да се преминава към анализ на *SCN4A* гена, разбира се след изключване на мутации в *CLCN1* гена.

#### 1.3.1.6. Физиология и патофизиология на ClC-1

До 80% от проводимостта на сарколемата в покой се дължи на ClC-1 каналите. Физиологичната роля на Cl-канали се състои в поддържане на електричната стабилност на мембраната – осигуряват възстановяване на състоянието на покой след преминаване на акционен потенциал.

Функционалният хлорен канал съществува под формата на хомодимер, като двата мономера са разположени антипаралелно един на друг. Всяка от субединиците формира отделна пора, изградена от 18  $\alpha$ -спирални участъка с различна дължина (Фигура 14). Характерна особеност на ClC-каналите е, че могат да се отворят на две отделни степени [Miller, 1982; Miller *et al.*, 1984]. Отварянето и затварянето на ClC-1 каналите се осъществяват по два различни пропускателни механизма: бърз “fast gating” и бавен “slow gating” (Фигура 15). Както показват и имената, при първия механизъм отварянето на канала се извършва значително по-бързо отколкото при втория. При “fast gate” отделните пори могат да се отворят и затворят самостоятелно [Duffield *et al.*, 2003; Dutzler, 2004]. При “slow gate” двете пори се деактивират и затварят едновременно [Duffield *et al.*, 2003; Dutzler, 2004]. Като цяло обаче механизмите на пропускане на ClCs остават недобре изяснени за момента [Dutzler, 2004; Jentsch, 2008]. Функционални експресионни проучвания водят до значително увеличаване на познанията по отношение на природата на тези канали и патофизиология на миотония конгенита [Pusch, 2002]. При затворен “slow gate” йоните не могат да преминават през пората. Когато “slow gate” е отворен, “fast gate”-овете се отворят спонтанно и независимо един от друг, като са възможни 3 различни “fast gate”-състояния: с две отворени пори, една отворена и една затворена и две затворени пори.  $H^+$  транспорт подпомага отварянето на “slow gate” на ClC-каналите. При всяко отваряне или затваряне на “slow gate” един  $H^+$  се пренася през мембраната. “Slow gate” се повлиява също от свързване на аденозини нуклеотиди към вътреклетъчните цистатион b-свързващи домени.



**Фигура 15.** Схематично представяне на хлорен канал от ClC семейството при еукариоти. „Двуцевна“ структура на ClCs с две пори, които могат да пропускат независимо една от друга („бърз“ пропускателен механизъм), но все пак са свързани чрез „бавния“ пропускателен механизъм [Модифицирана по Pusch, 2002].

Предполага се, че мутации, предизвикващи доминантната форма на миотония конгенита, засягат „slow gate“ пропускателния механизъм, за разлика от рецесивните мутации, които засягат един от „fast gates“ [Saviane *et al.*, 1999; Duffield *et al.*, 2003]. При доминантните форми мутантната субединица оказва доминантно негативен ефект върху дивия тип субединица и причинява изместване в зависимостта от потенциала. При рецесивната форма мутантният канал обикновено показва тотална загуба на функцията и при двата мономера [Pusch *et al.*, 1995; Pusch, 2002]. Това би могло да обясни, защо мутации в един същ ген могат да водят до изява както на доминантно, така и на рецесивно заболяване, както и защо рецесивно унаследяващата се миотония се характеризира обикновено с по-тежка клинична изява. Наличието на известен брой нормални канали при хетерозиготните пациенти (при доминантно унаследено заболяване) може все пак да осигури остатъчно преминаване на Cl-йони през сарколемата. Въпреки това мутации с електрофизиологични характеристики, съответстващи на доминантно унаследяване, са докладвани при родословия с рецесивно унаследяване [Kubisch *et al.*, 1998; Pusch, 2002].

### 1.3.1.7. Терапия на заболяването и прогноза

При някои случаи на миотония конгенита тип Бекер не се налага лечение или терапевтичният ефект на лекарствените препарати не оправдава страничните ефекти, причинени от тях. Ако все пак се налага, за облекчаване на симптомите може да се

прилагат хинин, фенитоин, карбамазепин, мексилетин и и други антиконвулсанти. Физиотерапия и други рехабилитационни методи могат да бъдат полезни за подпомагане на мускулната функция.

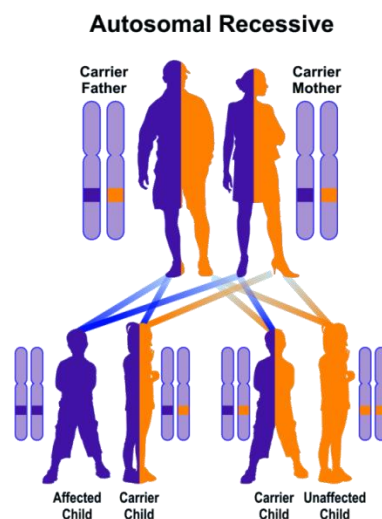
Миотонията като цяло не е заболяване с летален изход, но тежко засегнатите индивиди могат да бъдат изложени на живото-застрашаващи ситуации поради невъзможността им да се отдръпнат от потенциалната опасност [Chen Sun, 2011].

#### 1.4. РЕДКИ БОЛЕСТИ

Множество генетични заболявания все още са слабо проучени, тъй като спадат към групата на редките болести. За Европа редките заболявания се дефинират като такива, които се срещат с честота по-малка от 1:2000 души. Около 7000 заболявания спадат към тази група. Малкият брой засегнати индивиди, както и често наблюдаваната фенотипна вариабилност дори сред пациенти с едно и също генетично заболяване, сериозно затрудняват опознаването и разбирането им. На фона на държави с малък брой население, като например в България, много от наследствените болести са представени едва от единични случаи. Социо-икономическото им значение обаче не бива да бъде пренебрегвано. Взети заедно редките болести представляват значителна част от заболяванията, водещи до възпрепятстване на социалния живот, тежка инвалидизация и дори смърт при хората. Средно 6 – 8% от населението на Европа страда от рядко заболяване. При инбредни групи честотата на редките заболявания изкуствено се повишава значително. Близкородствените бракове могат да се дължат на географски ограничения, религиозни вярвания или традиционни битови разбирания. В тези групи вероятността от събирането на два дефекта в един ген е значително повишена на фона на средно популационната. Всичко това определя необходимостта науката да се обърне към тази група болести, да се опита да открие общите принципи на патогенеза и да се развива по посока на прилагане на теоретичните знания към практиката. Изясняване на генотип-фенотипните корелации е от съществено значение за коректно прогнозиране на развитието на заболяването. А определянето на молекулярно-генетичния дефект, стоящ в основата на даден патологичен фенотип, е първата стъпка към намиране на подходяща терапия, съответстваща на първопричината за заболяването, а не просто симптоматично лечение.

## 1.5. АВТОЗОМНО РЕЦЕСИВНИ НЕВРОЛОГИЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

Обект на настоящия дисертационен труд са две редки заболявания, представители на основните групи неврологични заболявания – пиридоксин зависима епилепсия от групата на епилептичните енцефалопатии и миотония конгенита тип Бекер от тази на невромускулните заболявания. Поради широкия спектър на термина неврологични заболявания при изучаването им е от първостепенна важност да бъдат открити общите принципи на патогенеза. Фокусът на генетиката е насочен към начина на предаване на заболяванията в поколението. Именно в това се състои и връзката между двете изследвани в настоящата работа заболявания. Както пиридоксин зависимата епилепсия, така и миотония конгенита тип Бекер се унаследяват по автозомно рецесивен път. Макар те да се характеризират с много силно различаваща се клинична картина, елементът, който ги обединява е на генетично ниво. От тази гледна точка генетиката може да бъде много мощен инструмент за разбиране на възникването, развитието, потенциалното лечение и превенцията на заболяванията, както и нов критерий за класификацията им на базата на причиняващото ги изменение в наследствения материал на индивида.



**Фигура 16.** Автозомно-рецесивно унаследяване на наследствено заболяване. Хетерозиготните родители са „скрити“ носители на заболяването, т.е. те са фенотипно здрави. В поколението съществува 25% вероятност двата дефекта да се съберат у един и същ индивид и той вече да има патологична фенотипна изява, поради липса на здраво копие от дадения ген.

Автозомно рецесивните заболявания винаги са били от голям интерес за генетиката, поради скрития им характер. Тези заболявания не се проявят до момента, в който у един същ индивид не се съберат две дефектни копия на един и същ ген (Фигура 16). При носителите на един дефект не се наблюдава патологична симптоматика, поради наличие на второ „здрaво“ копие на дадения ген, компенсиращо функцията на увреденото. Затова генетичните изменения с рецесивен характер на унаследяване дълго време остават скрити, носителите им са клинично здрави и не знаят за наличието на измененията. По този начин в едно единствено семейство могат дори да се съберат две различни редки заболявания (каквото е случаят с по-надолу разгледаното семейство), без членовете му да подозират за съществуването на което и да е от тях. Приема се, че всеки човек е носител на средно 5 рецесивни мутации, въпреки наличието на които все пак остава без патологична фенотипна изява поради наличие на второ здраво копие на гена. Обикновено едва след раждане на болно дете в семейството, се изяснява носителския статус на родителите. Тук генетиката намира своето най-основополагащо и възникнало с естественото развитие на науката приложение – превенция на заболяванията. Единствено познаването на носителския статус на индивидите може да позволи коректна генетична консултация и семейно планиране. В хода на постоянно развиващите се наука и технологии в днешно време генетиката придобива и съвсем нов още по-богат смисъл - разбиране на механизма на възникване на заболяването и възможност за специфична и високо ефективна терапия.

## 2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

### 2.1. ЦЕЛ

Целта на настоящия дисертационен труд е молекулярно генетично охарактеризиране на някои автозомно рецесивни неврологични и невромускулни заболявания, а именно пиридоксин зависима епилепсия и миотония конгенита тип Бекер при български пациенти и извършване на селективен *CLCN1* мутационен скрининг в таргетни географски региони на страната.

### 2.2. ЗАДАЧИ

#### 2.2.1. Пиридоксин зависима епилепсия

- Въвеждане и оптимизиране на молекулярно генетичен подход за идентификация на патологични замени в *ALDH7A1* гена
- Приложение на разработения подход върху подбрана група пациенти с клинична диагноза пиридоксин зависима епилепсия
- Провеждане на други генетични изследвания при пациентите с неизяснена генетична причина за клиничната картина
- Сравняване на получените резултати с публикуваната световна литература по проблема
- Опит за установяване на генотип-фенотипна корелация с цел прогнозиране на хода на развитие на заболяването

#### 2.2.2. Миотония конгенита тип Бекер

- Въвеждане и оптимизиране на молекулярно генетичен подход за идентификация на патологични замени в *CLCN1* гена
- Приложение на разработения подход върху подбрана група пациенти с клинична диагноза миотония конгенита тип Бекер

- Провеждане на други генетични изследвания при пациентите с неизяснена генетична причина за клиничната картина
- Сравняване на получените резултати с публикуваната световна литература по проблема
- Извършване на мутационен скрининг по отношение на два потенциални ендемични региона в България
- Изчисляване на процент хетерозиготност и алелна честота по отношение на конкретните мутации за всеки от регионите и сравняване на получените резултати с данни за други популации.

### 3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### 3.1. МАТЕРИАЛИ

##### 3.1.1. Клиничен материал

В рамките на настоящия дисертационен труд бяха проведени молекулярно-генетични изследвания при общо 542 пробанда, сред които пациенти с клинична диагноза пиридоксин зависима епилепсия, пациенти с клинична диагноза миотония конгенита тип Бекер, здрави новородени деца от двата потенциални ендемични региона за миотония конгенита тип Бекер в България и здрави контроли, както и едно семейство, в което едновременно и независимо сегрегират две редки невромускулни заболявания, а именно атаксия на Фридрайх и калпаинопатия. По-конкретно изследваните лица могат да бъдат разделени в следните групи:

1. **Пиридоксин зависима епилепсия:** Изследвани са общо 8 пациента от 6 семейства и родителите на всички пациенти (12 на брой), т.е. общо 20 души.
2. **Миотония конгенита тип Бекер:** Изследвани са общо 11 пациента от 9 семейства и 21 техни родственици: 1 сестра, 1 съпруг, 1 фетус и 18 родители, т.е. общо 32 души.
3. **Скрининг на двата предполагаеми ендемични региона за миотония конгенита тип Бекер:**
  - Регион Гоце Делчев: 116 новородени от региона и 107 контроли от цяла България
  - Регион Мездра: 154 новородени от региона и 107 контроли от цяла България.
4. **Семейство с атаксия на Фридрайх и калпаинопатия:** Изследвани са общо 6 родственика  
т.е. общо 542 души.

Пациентите с клинична диагноза пиридоксин зависима епилепсия, миотония конгенита тип Бекер, атаксия на Фридрайх и калпаинопатия са диагностицирани и насочени за ДНК анализ от:

1. Специализирана Болница за Активно Лечение по Детски Болести ЕАД, гр.София
2. Университетска Специализирана Болница за Активно Лечение по Неврология и Психиатрия „Св. Наум“, гр. София
3. Университетска Многопрофилна Болница за Активно Лечение Александровска, гр. София
4. Университетска Многопрофилна Болница за Активно Лечение „Царица Йоанна – ИСУЛ“, гр. София
5. Университетска Многопрофилна Болница „Софиямед“, гр. София
6. МБАЛ за женско здраве "Надежда"

Клиничната диагноза е поставена на базата на стандартни клинични и лабораторни изследвания: ЕЕГ в будно състояние и сън, биохимични изследвания на кръв и урина, поведенчески фенотип и степен на умствено изоставане, генеалогичен анализ, и др.

Информирано съгласие по отношение на генетичните изследвания е подписано от всички пациенти или съответно техните родители. Изследванията, обект на настоящата дисертация, са одобрени от КЕНИМУС.

Настоящото изследване е финансирано частично по договори № 3/2015 и 1/2016 на МУ-София.

### **3.1.2. Биологичен материал**

При провеждане на изследвания на ниво ДНК и в частност при изследванията, извършени в настоящия дисертационен труд, се използва високомолекулна ДНК, изолирана от левкоцити от венозна или капилярна кръв. Използват се 3-6 ml венозна кръв, взета в пластмасова епруветка (тип вакутейнер) и антикоагулант етилен диамин тетраацетат – натриева сол (ЕДТА). Капилярна кръв се взима в пластмасови епруветки от 1 ml със същия антикоагулант - ЕДТА. Кръвните проби се взимат след нахранване и се

съхраняват на +4°C до времето за обработка (за изолиране на високомолекулна ДНК се съхраняват не повече от 48 часа).

За целите на мутационния скрининг в двата предполагаеми ендемични региона беше изолирана ДНК от филтърни бланки на новородени от дадените географски области. Филтърните бланки са набавяни за целите на неонаталния скрининг и са предоставени на екипа ни от Националната Генетична Лаборатория. Процедурата по изготвянето им включва взимане на няколко капки капилярна кръв от пета или пръст (Фигура 17). Тя се нанася върху специална абсорбираща филтърна хартия и се оставя да изсъхне на въздух за няколко часа [Guidelines for the Shipment of Dried Blood Spot Specimens, 1995]. Така подготвените филтърни бланки се съхраняват в найлонови опаковки с ниска газова пропускливост и съдържащи изсушител за намаляване на влажността. Основно предимство на този вид проби е възможността да бъдат съхранявани на стайна температура, без това да навреди на качеството на материала, както и лесното им транспортиране.



**Фигура 17. Филтърни бланки.** А. Процедура за взимане на капилярна кръв от новородено за изготвяне на филтърна бланка; В. Подготвяне за транспортиране в специална найлонова опаковка [<http://www.spotonsciences.com/dbstechnology/>].

## 3.2. МЕТОДИ

### 3.2.1. Преданалитична обработка на материала

#### 3.2.1.1. Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв по солеви метод

**Принцип:**

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

**Процедура:**

**Лизиране на еритроцитите и утаяване на ядрените клетки:**

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

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

**Лизиране на ядрените клетки:**

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

**Утаяване на белтъците:**

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

**Преципитация на ДНК:**

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

**Буфери използвани за изолирането на ДНК:**

Лизис буфер (pH=7.4):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  - 155mM;  $\text{KHCO}_3$  – 10mM;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  – 0.1mM

SE буфер (pH=8.0): NaCl – 75mM;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  – 25 mM

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

**Апаратура:**

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

**3.2.1.2. Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна или капилярна кръв по фенол-хлороформен метод**

**Принцип:**

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

**Процедура:**

**Разрушаване на клетките и клетъчните ядра:**

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

**Екстрахиране на белтъците:**

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

**Преципитация на ДНК:**

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

**Буфери използвани за изолирането на ДНК:**

SE буфер (pH=8.0): NaCl – 75mM; Na<sub>2</sub>EDTA – 25 mM

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

**Апаратура:**

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

### 3.2.1.3. Изолиране на ДНК от филтърни бланки чрез кит NucleoSpin Tissue, MACHERY-NAGEL, Germany

**Принцип:**

Принципът се базира на взаимодействието между силика-гел мембрана и ДНК.

**Процедура:**

От добре напоено с кръв място на филтърната бланка се изрязват дискове с диаметър 3 mm (по 3 броя от пробанд). Те се използват за изолиране на ДНК материал, като се подлагат на обработка с комерсиален кит. Следват се инструкциите на производителя (NucleoSpin Tissue кит).

**Апаратура:**

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

### 3.2.1.4. Директна спектрофотометрия

**Принцип:**

Измерването на концентрацията и качеството на геномната ДНК се извършва спектрофотометрично. Методът се основава на специфичното поглъщане на светлина с дължината на вълната  $\lambda=260$  nm от пуриновите и пиримидиновите бази в ДНК.

**Процедура:**

В пластмасова кювета с размер 10 mm x 2 mm се измерва абсорбцията при дължина на вълната 260 nm и 280 nm срещу контрола от TE буфер. Отношението  $\lambda_{260}/\lambda_{280}$  показва качеството на ДНК. То трябва да е между 1.8 и 2.0. Стойности <1.8 показват наличието на примеси от белтъци, а >2.0 – от РНК.

**Апаратура:**

Спектрофотометър BioPhotometer, Eppendorf.

### 3.2.2. Аналитична обработка на материала

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

- Протокол за размножаване на всички екзони и екзон-интронните граници на *ALDH7A1* гена

Необходимите праймери за амплификация на *ALDH7A1* гена са дизайнирани чрез компютърна програма: In-Silico PCR [<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>]. Секвенциите на праймерите и размерът на амплификационните продукти са представени в Таблица 1.

**Таблица 1. Секвенции на праймери и размер на фрагмента при амплификация на *ALDH7A1* гена.**

Екзон	Секвенция на праймера	Размер на фрагмента
1	F - GTCTGCCCAATGGGTTCTC R - CATGCTACTACCGCATCCAG	390 bp
2	F - TTGTTTTTCTTCCCCGTTTG R - AGTCTCCCCCAGACAGTCTT	328 bp
3	F - CCTGTTTTACCGGGTTCTAGC R - ACAGTATCACAGCCCCCAAG	382 bp
4	F - TCTCCTCTGTGCCTTCCAGT R - GGGTGACAGCAAGACTCCAT	408 bp
5	F - CATGTTTTGCTTCCCCCTTT R - TTTGCACAGTCAATAGCCAGA	300 bp
6	F - TATCCCATGGCTGTGTAGCA R - ATTGAAGAAGCCAGGTGTGG	395 bp
7	F - AAAGACACCCAGCTGAAGGA R - ATGACATGGCACTGAAAGCA	393 bp
8	F - AGTGGGCTGAAAAAGCAAGA R - CATCCTCCAATAGGAGTTAGGC	405 bp
9	F - CCCTGGGACAGACTTTCTTG R - GGAAAAGGTTGAGGGGAAAA	321 bp
10	F - GGCTGTGTAGCAGTGTGCAG R - CCTCTGCCTTCAAAACAAGC	290 bp
11	F - CCATCCTGGGTGACAAGAAC R - GCCAGCCACATCTAGAGAGC	367 bp
12	F - TGCATTTATCATACTATGCCCTTG R - CAGCCAGGGTCGAAACCTA	301bp
13	F - CACGTATGTCTCCAAAGCA R - GCTTTTCCAATATGCCCAGA	381bp

<b>14</b>	F - ATCCTCTGACCCCAAGTCCT R - CCAACACTGGTCCACTACCC	409 bp
<b>15-16</b>	F - TTAGGGGAAAAATCCCAAAAT R - GAGGAGATGACGCAGGACTC	755 bp
<b>17</b>	F - TTTCATTGATACCAACTATGAGCC R - TACAGAAACCACGCACGAGA	381 bp
<b>18</b>	F - CGGGATCCATACTAACATTGTC R - TGGGGTCATAGGGGGATTAG	358 bp

За всеки фрагмент са оптимизирани условията за провеждане на ПВР, като са променяни следните параметри на полимеразната верижна реакция: концентрация на компонентите, температура и време за хибридизация на праймерите, време за синтез на желанния продукт. Оптималните концентрации на компонентите в реакционната смес за ПВР са посочени в Таблица 2.

**Таблица 2. Оптимална концентрация на компонентите, участващи в полимеразната верижна реакция за намножаване на всички екзони и екзон-интронни граници на *ALDH7A1* гена.**

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

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

**Таблица 3. Оптимална програма за провеждане на ПВР за получаване на специфични продукти на екзони от *ALDH7A1* гена.**

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	94°C	5 min	1
Денатурация	94°C	30 sec	35
Хибридизация на праймерите	60°C	30 sec	
Синтез на нова верига	72°C	40 sec	
Краен синтез	72°C	5 min	1

- **Протокол за размножаване на всички екзони и екзон-интронните граници на *PNPO* гена**

Необходимите праймери за амплификация на *PNPO* гена са дизайнирани отново чрез In-Silico метод [<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>]. Секвенциите на праймерите и размерът на амплификационните продукти са представени в Таблица 4.

**Таблица 4. Секвенции на праймери и размер на фрагмента при амплификация на *PNPO* гена.**

Екзон	Секвенция на праймера	Размер на фрагмента
<b>1</b>	F - GCCTCGTTACCGAAAAGCT R - CCTCCCCGCTGTAGATGACT	434 bp
<b>2</b>	F - GTGACTAGAACAGTGCCAGGTC R - GGAACCATAAAATTGGCATCC	290 bp
<b>3</b>	F - CTGGAGGGGGTGCTGAG R - GTGGCATAAGAAGGTGACTGAG	273 bp
<b>4</b>	F - CCTGCGCACTACAGCTCTC R - GGACCTTCGCTAGACGTAGC	228 bp
<b>5</b>	F - CGATCGAACAGAGAGGAACG R - GGACATCTCCTGGCATCTCC	303 bp
<b>6</b>	F - CCAGCACATATCCCCAGG R - GGAGATCTGTGATTCCCCAG	239 bp
<b>7</b>	F - CTGGGGAATCACAGATCTCC R - GGTGAGTTTAGAAAGAAGGGC	414 bp

След последваща оптимизация са установени оптималните условия за провеждане на ПВР (Таблица 5).

**Таблица 5. Оптимална концентрация на компонентите, участващи в полимеразната верижна реакция за намножаване на всички екзони и екзон-интронни граници на *PNPO* гена.**

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

Оптималната програма за провеждане на ПВР за получаване на специфичен продукт е представена в Таблица 6.

**Таблица 6. Оптималната програма за провеждане на ПВР на екзони от *PNPO* гена.**

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	94°C	5 min	1
Денатурация	94°C	30 sec	30
Хибридизация на праймерите	61 °C	30 sec	
Синтез на нова верига	72°C	1 min	
Краен синтез	72°C	5 min	1

- **Протокол за намножаване на всички екзони и екзон-интронните граници на *CLCN1* гена**

Необходимите праймери за амплификация на *CLCN1* гена са дизайнирани отново чрез In-Silico метод [<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>]. Секвенциите на праймерите и размерът на амплификационните продукти са представени в Таблица 7.

Таблица 7. Секвенции на праймери и размер на фрагмента при амплификация на *CLCN1* гена.

Екзон	Секвенция на праймера	Размер на фрагмента
1	F - CGACCCCAAGCAGATCAGAT R - GGCACCACTGTCTCCCCTCAT	421 bp
2	F - GCATGCAGTCAACACCCAGAA R - GCAATGGGATGCCCAAGTTA	329 bp
3	F - GGGTATAGCACCCAAAGTAAAGTAGT R - GCAGGCCTGGGTCTGGTCTT	457 bp
4-5	F - CCTGAGAACATGCCGGGTA R - CCTGTCCCCTGATCCACTT	677 bp
6	F - GGACCTCTGTGTAACCTCCCGTAT R - GGATTAGTGCGATGCTGCTT	338 bp
7	F - GGGACCACAAGGACTCCTTT R - CCTGGTAATACCAGCACTTGTGGAT	302 bp
8	F - CCACTACTGCTTCCACCCAGAT R - GCCGCCATTATTCCTTTT	352 bp
9-10	F - GGAAGGAAGGAATTAATCCTGAA R - GCAAGCCACCCAGAGGCATT	624 bp
11-12	F - GTGGACTAAAGGAACTTCAGCTT R - CCCCTTCTACCCTATGCAAA	632 bp
13-14	F - GGATCAGCTATCCCAGGATTTCT R - CCGTATTGTGTAGCCTAGAATGAA	582 bp
15-16	F - GGTCATGTCTCTCATTCCGTGTT R - GGATGGCCCCCTAAAGACAAA	784 bp
17	F - CCAGGAAGCTGAGAAAGATGT R - CCCACTACTTTCAGGGAAACTA	488 bp
18	F - GCTTTCCAGAACATCCACCAA R - CAGGTCCTAGTGACCAGAGAGAA	267 bp
19-20	F - GCTCTTTGGAGGCAAATGTTA R - CCCATCCAGACCACATTCTATT	578 bp
21-22	F - CGTTTGGGGTCAAAATCAGGTA R - GGGAAATCTGAGGGGACTTCT	471 bp
23	F - CCCCGTTTTGCCACTCTATAT R - CTGGAAGAGGCCACGACATT	627 bp

След последваща оптимизация са установени оптималните условия за провеждане на ПВР (Таблица 8).

**Таблица 8. Оптимална концентрация на компонентите участващи в полимеразната верижна реакция за намножаване на изследваните екзони от *CLCN1* гена.**

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

Оптималната програма за провеждане на ПВР за получаване на специфичен продукт е представена в Таблица 9.

**Таблица 9. Оптималната програма за провеждане на ПВР на екзони от *CLCN1* гена.**

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

- **Протокол за намножаване на всички екзони и екзон-интронните граници на *FXN* гена**

Необходимите праймери за амплификация на *FXN* гена са дизайнирани отново чрез In-Silico метод [<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>]. Секвенциите на праймерите и размерът на амплификационните продукти са представени в Таблица 10.

**Таблица 10. Секвенции на праймери и размер на фрагмента при амплификация на *FXN* гена.**

Екзон	Секвенция на праймера	Размер на фрагмента
1	F - GCAGCCTGAATTTGTGCAT R- GCTAGTCCAGCGCGCGTA	599 bp
2	F - GGCACCTCGAATGTAGAAGTAGCA R - GGTGGATACTCAGTCACATGGAA	322 bp
3	F - CATGTTATTTTCATCAATTTAATGAATTTAA R - GCTACTTGATGCTTAGCTCTGCT	330 bp
4	F - G TACTTGTAGAAAATGGAAAGTGTTGAGA R - GTGTTGGGATTACAGGTGTCAG	328 bp
5	F - GGCAGCATTTGTGGAATCA R - GGGTCTTGGCCTGATAGCTT	274 bp

След последваща оптимизация са установени оптималните условия за провеждане на ПВР (Таблица 11).

**Таблица 11. Оптимална концентрация на компонентите участващи в полимеразната верижна реакция за намножаване на всички екзони и екзон-интронни граници на *FXN* гена.**

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

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

Таблица 12. Оптималната програма за провеждане на ПВР на екзони от *FXN* гена.

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	94°C	5 min	1
Денатурация	94°C	45 sec	35
Хибридизация на праймерите	60 °C	45 sec	
Синтез на нова верига	72°C	1 min	
Краен синтез	72°C	5 min	1

- **Протокол за размножаване на екзони 4 и 7 на *CAPN3* гена**

Използваните праймери за амплификация на екзони 4 и 7 на *CAPN3* гена, в които попадат най-честите мутации за българската популация [Todorova *et al.*, 2007], са публикувани [Richard *et al.*, 1999]. Оптималните концентрации на реагентите за провеждане на ПВР са представени в Таблица 13.

Таблица 13. Оптимална концентрация на компонентите участващи в полимеразната верижна реакция за размножаване на всички екзони и екзон-интронни граници на *CAPN3* гена.

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

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

**Таблица 14. Оптималната програма за провеждане на ПВР на екзони 4 и 7 от *CAPN3* гена.**

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	94°C	5 min	1
Денатурация	94°C	30 sec	35
Хибридизация на праймерите	60 °C	30 sec	
Синтез на нова верига	72°C	45 sec	
Краен синтез	72°C	5 min	1

### 3.2.2.2. Електрофореза в агарозен гел

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

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

#### Използвани буфери:

1x TBE буфер: TRIS – 90 mmol/l; Борна киселина – 90 mmol/l; Na<sub>2</sub>EDTA – 1 mmol/l  
Буфер за нанасяне на пробите: 0.25% бромфенол блу; 25% фикол.

#### Апаратура:

За изготвяне на агарозния гел: Микровълнова фурна – SM 20 MW, SOGO, China; нивелирна масичка; ваничка за изливане на агарозен гел (2500x1800 mm); стартови гребени с размер 2x22 бр., размери на ямките 5x4x1 mm;

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

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

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

### **3.2.2.3. Директно секвениране по sanger с флуоресцентно белязани дидезокси нуклеотиди**

#### ***Принцип на метода на Sanger:***

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

**Принцип на работа на автоматичен секвенатор ABI3130 Sequence Genetic Analyzer:**

В настоящото изследване за разделянето на фрагментите е използван автоматичен секвенатор ABI3130 Sequence Genetic Analyzer на фирмата Applied Biosystems.

Разделянето на фрагментите в автоматичния секвенатор ABI3130 се извършва на принципа на капилярната гел-електрофореза. Използваните при секвенционната реакция терминаращи дидезоксинуклеотиди са флуоресцентно белязани, поради което се осъществява лазерна детекция. Всеки от четирите дидезоксинуклеотида (ddG, ddA, ddT и ddC) е белязан с два флуорофора – флуоресцин и един от четирите типа родамин. Флуоресцинът има висок екстинкционен коефициент при  $\lambda = 488 \text{ nm}$  (това е и дължината на вълната, емитирана от аргоновия лазер, който се използва в автоматичните секвенатори). Играейки ролята на донор, флуоресцинът поглъща енергията на лазерния лъч и я прехвърля към акцепторния родамин върху същата молекула. Всеки от четирите акцептора емитира светлина с определена дължина на вълната, която се детектира от апарата, и така се идентифицира съответният нуклеотид.

**Процедура:**

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

**Намножаване на желанния ДНК фрагмент чрез ПВР**

Извършва се при споменатите по-горе условия за съответните участъци – екзоните и екзон-интронните граници на всеки от изследваните гени.

**Пречистване на намножения продукт:**

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

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

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

**Техника:**

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

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

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

**Провеждане на секвенционна реакция:**

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

**Техника:**

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

Режимът за провеждане на секвенционната реакция е:

Денатурация – 95°C – 20 sec;

Хибридиране на праймера – 50°C – 15 sec;

Синтез на верига – 60°C – 3 min.

Този цикъл се повтаря 25 пъти.

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

**Преутаяване на секвенционния продукт:**

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

**Техника:**

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

Получената утайка се промива с 200 µl 80% етанол, вортексира се и се центрофугира за 10 min на 12 000 rpm на стайна температура. Супернатантата се премахва чрез изсмукване на вакуум. Утайката се суши на стайна температура на тъмно за 12 часа.

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

**Разтваряне на секвенционния продукт:**

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

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

**Визуализиране и отчитане на пробите:**

Секвенционните данни се обработват автоматично от програмата ABI3130 Data Collection Software и се анализират посредством програмата Sequencing Analysis v5.1.1, при което се получават в готов вид под формата на електрофореграма.

**Апаратура:**

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

Електрофоретичното разделяне на секвенционните продукти се извършва на автоматичен секвенатор ABI Prism 3130 Genetic Analyzer.

**3.2.2.4. Мултиплексна лигазно зависима амплификация (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification, MLPA)****Принцип на MLPA анализа:**

MLPA анализът е метод за геномно профилиране Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) [Schouten *et al.*, 2002; [www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)]. Базиран е на мултиплексна ПВР и може да се използва за детекция на броя копия ДНК или РНК секвенции, т.е. позволява детекция на делеции и дупликации. Характерна особеност на тази методика е, че на амплификация се подлагат не таргетните секвенции, а MLPA-сондите, които хибридизират към таргетните последователности. За разлика от стандартна мултиплексна ПВР при MLPA анализа се използва само една двойка праймери. Получените амплификационни продукти от различните MLPA-ките са с дължина между 130 и 480 б.дв. и могат да бъдат анализирани посредством капилярна електрофореза. Сравнявайки получения електрофоретичен профил с референтна проба, може да бъде установено нарушение в броя копия на даден ген.

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

**Процедура за MLPA анализ:**

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

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

**Хибридизация със специфични за отделните генни фрагменти сонди:**

Към денатурираните проби се добавят по 1.5 µl от сондите и 1.5 µl буфер за хибридизация. Пробите се размесват добре, денатурират се 1 min на 95°C и се инкубират за хибридизация на 60°C най-малко 16 часа.

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

**Реакция на лигиране:**

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

Лигаза 65 буфер А	3.0 µl
Лигаза 65 буфер В	3.0 µl
Вода	25.0 µl
Лигаза	<u>1.0 µl</u>
	по 32 µl на проба

**Полимеразна верижна реакция:**

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

Salsa PCR буфер	4.0 µl
Вода	26.0 µl
MLPA лигазна реакция reaction	10.0 µl

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

Salsa PCR-прайме	2.0 µl
Salsa Enz.Dil. буфер	2.0 µl
Вода	5.5 µl
Salsa полимераза	<u>0.5 µl</u>
	10 µl на проба

**Условия на амплификационната реакция:**

95°C – 30 sec

60°C – 30 sec                      33 цикъла

72°C – 60 sec

Следва инкубиране на пробите на 72°C – 20 мин.

**Приготвяне на пробите за електрофоретично разделяне:**

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

**Капилярна електрофореза:**

Електрофорезата се провежда на къса капиляра 47 cm (Applied Biosystems) в полимер POP7 (Applied Biosystems).

**Визуализиране и отчитане на пробите:**

Електрофоретичният профил се обработва и анализира посредством програмата GeneMapper v4.0, при което резултатите се получават в готов вид под формата на електрофореграма.

**Апаратура:**

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

Електрофоретичното разделяне на секвенционните продукти се извършва на автоматичен секвенатор ABI Prism 3130 Sequence Genetic Analyzer.

**Използвани MLPA китове в дисертационния труд:**

SALSA MLPA P350 CLCN1-KCNJ2

[[www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)]

**3.2.2.5. Short PCR и TP-PCR**

**Принцип:**

При молекулярната диагностика на генетични заболявания, дължащи се на нуклеотидни експанзии се използва комбинация от две разновидности на ПБР: short PCR и TP-PCR.

Методът Short PCR е описан от Campuzano *et al.* (1996) позволява амплификация и определяне на дължината на нормалните (неекспандирали) алели. За амплификация на алели, претърпяли експанзия обаче се прилага друг протокол - Triplet repeat primed PCR (TP-PCR) [Warner *et al.*, 1996]. За извършването му освен обичайно използвана двойка праймери, се използва и локус специфичен праймер, фланкиращ повтора. Той позволява амплификация от множество начални точки във вътрешността на повтора и задава специфичността на амплификационната реакция. Бележи се флуоресцентно, с цел детекция на дължината на получените фрагменти след електрофоретичното им разделяне на автоматичен секвенатор ABI Prism 3130 Genetic Analyzer. Получава се характерна "стълбичка" от флуоресцентните сигнали на получените фрагменти.

**Процедура за извършване на Short PCR:**

Амплификацията при провеждане на Short PCR се осъществява при концентрации на реагентите, както са представени в Таблица 15.

Таблица 15. Оптимална концентрация на компонентите, участващи в Short PCR.

Компонент на реакционната смес	Обем ( $\mu$ l)
ДНК	2
Праймер F (10 pmol/ $\mu$ l)	2
Праймер R (10 pmol/ $\mu$ l)	2
Разтвор на дезоксинуклеотидтрифосфати, дНТФ (10mM) (GENET BIO, Chungnam, Korea)	1.5
10x буфер (GENET BIO, Chungnam, Korea)	2
Термостабилна полимераза Taq M, (GENET BIO, Chungnam, Korea)	0.4
Дестилирана вода	До краен обем 20

Оптималната програма за провеждане на Short PCR за получаване на специфичен продукт е представена в Таблица 16.

Таблица 16. Оптимална програма за провеждане на Short PCR.

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	94°C	3 min	1
Денатурация	94°C	45 sec	30
Хибридизация на праймерите	66°C	30 sec	
Синтез на нова верига	72°C	2 min	
Краен синтез	72°C	5 min	1

**Процедура извършване на TP-PCR:**

Амплификацията при провеждане на Short PCR се осъществява при концентрации на реагентите, както са представени в таблица 17.

Таблица 17. Оптимална концентрация на компонентите, участващи в TP-PCR.

Компонент на реакционната смес	Обем ( $\mu\text{l}$ )
ДНК	2
Праймер P1 (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	2
Праймер P3 (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	2
Праймер P4 (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	0.2
Разтвор на дезоксинуклеотидтрифосфати, дНТФ (10mM) (GENET BIO, Chungnam, Korea)	2
10x бufer (GENET BIO, Chungnam, Korea)	2.5
Термостабилна полимераза Taq M, (GENET BIO, Chungnam, Korea)	0.4
Дестилирана вода	До краен обем 25

Оптималната програма за провеждане на ПВР за получаване на специфичен продукт е представена в Таблица 18.

Таблица 18. Оптимална програма за провеждане на TP-PCR.

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	94°C	3 min	1
Денатурация	94°C	30 sec	30
Хибридизация на праймерите	66°C	30 sec	
Синтез на нова верига	72°C	30 sec	
Краен синтез	72°C	10 min	1

#### Приготвяне на пробите за електрофоретично разделяне:

При Short PCR по 2.5  $\mu\text{l}$ , а при TP-PCR по 5  $\mu\text{l}$  от всяка амплифицирана проба се смесват с 12  $\mu\text{l}$  Hi-Di формаид (Applied Biosystems) и 0.7  $\mu\text{l}$  ROX 500 size standard (Applied Biosystems). Така приготвените проби се денатурират на 95°C – 5 мин и се поставят в лед.

**Капилярна електрофореза:**

Електрофорезата се провежда на къса капиляра 36 cm (Applied Biosystems) в полимер POP7 (Applied Biosystems).

**Визуализиране и отчитане на пробите:**

Електрофоретичният профил се обработва и анализира посредством програмата GeneMapper v4.0, при което резултатите се получават в готов вид под формата на електрофореграма. Нормалните алели при здрави индивиди са в диапазона 5-60 GAA повтора. При пациенти с атаксия на Фридрайх броят на повторите варира от 66 до 1700.

**Апаратура:**

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

Електрофоретичното разделяне на секвенционните продукти се извършва на автоматичен секвенатор ABI Prism 3130 Sequence Genetic Analyzer.

**3.2.3. Литературни бази данни, използвани в проучването**

При секвенционния анализ на изследваните гени разчетената секвенция на продуктите от ПВР се сравнява с публикуваната за всеки ген в GenBank базата данни. Използваните референтни генни секвенции в настоящото проучване са: NM\_001201377.1 (*ALDH7A1*) и NM\_000083.2 (*CLCN1*). Откритите нуклеотидни замени са описани според номенклатурните насоки на Human Genome Variation Society [<http://www.hgvs.org/mutnomen/>]. За сравнителния анализ на откритите мутации при български пациенти с публикуваните данни в литературата са използвани редица проучвания на други автори, цитирани в раздел „Резултати и Обсъждане“, както и следните публично достъпни мутационни бази данни:

- ENSEMBL - <http://www.ensembl.org/index.html>
- The Human Gene Mutation Database - <http://www.hgmd.org/>
- Leiden Open Variation Database - <http://www.lovd.nl>

## 4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Групата от пациенти, обект на молекулярно-генетични изследвания в настоящия дисертационен труд, се състои от общо 542 пробанда, сред които пациенти с клинична диагноза пиридоксин зависима епилепсия, пациенти с клинична диагноза миотония конгенита тип Бекер, здрави новородени деца от двата потенциални ендемични региона за миотония конгенита тип Бекер в България и здрави контроли, както и представители на семейство, в което едновременно и независимо сегрегират две редки невромускулни заболявания, а именно атаксия на Фридрайх и калпаинопатия.

Резултатите от молекулярно-генетичните изследвания са представени в 3 публикации [Tinceva *et al.*, 2015a; Tinceva *et al.*, 2015b; Tinceva *et al.*, 2016].

### 4.1. Пиридоксин зависима епилепсия

По отношение на кофактор зависимите епилепсии настоящата разработка има пилотна роля. До момента в България не са докладвани пациенти с генетично верифицирана диагноза за кофактор зависима епилепсия. Настоящият труд поставя началото на молекулярно-генетичната диагностика на тази група заболявания в България с въвеждане на методика за извършване на генетичен анализ при пациенти с клинична диагноза пиридоксин зависима епилепсия.

#### 4.1.1. Изследвана група пациенти

В рамките на настоящия труд бяха изследвани 8 пациента с клинична диагноза пиридоксин зависима епилепсия от общо 6 семейства. Две от семействата са представени от по 2 пациента – двуйчни близнаци. Всички изследвани пациенти са с класическа форма на ПЗЕ – епилептични пристъпи, започнали скоро след раждането, неповлияващи се от конвенционална антиепилептична терапия, но с незабавен отговор при приложение на пиридоксин и рецидивирание на симптоматиката при прекратяване на терапията. В таблица 19 са представени всички пациенти с диагноза ПЗЕ, обект на

настоящото проучване, заедно с някои клинични и молекулярно-генетични данни. Всички пациенти са от български произход.

**Таблица 19. Клинични и молекулярно-генетични данни на пациенти с диагноза ПЗЕ, обект на настоящата дисертация.**

семейство	засегнати индивиди	пол	първи симптоми (след раждането)	възраст по време на изследване (месеци)	произход	ALDH7A1 мутации	тип на мутацията	PNPO мутации
1	едно дете	женски	1 седмица	11	български	не	-	не
2	двуйайчни близнаци	мъжки и женски	2 часа	3	български	c.297delG, p.Trp99*	делеция; <b>нова</b>	-
						c.328C>T, p.Arg110*	nonsense	-
3	двуйайчни близнаци	мъжки	5 дни	1	български	не	-	не
4	едно дете	мъжки	3 дни	5	български	не	-	не
5	едно дете	мъжки	няма данни	3	български	c.328C>T, p.Arg110*	nonsense	-
						c.584A>G, p.Asn195Ser	missense	-
6	едно дете	женски	1 месец	2	български	не	-	не

При всичките осем пациента бяха секвенирани по метода на Sanger екзоните и екзон-интронните граници на *ALDH7A1* гена. При семейства 2 и 5 в хода на нашата работа бяха открити мутации в *ALDH7A1* гена и съответно беше доказана на молекулярно-генетично ниво клиничната диагноза пиридоксин зависима епилепсия. Родителите на всички пациенти бяха изследвани с цел уточняване на носителския им статус.

#### 4.1.2. Клинични данни и молекулярно-генетични резултати

##### 4.1.2.1. Семейство 2:

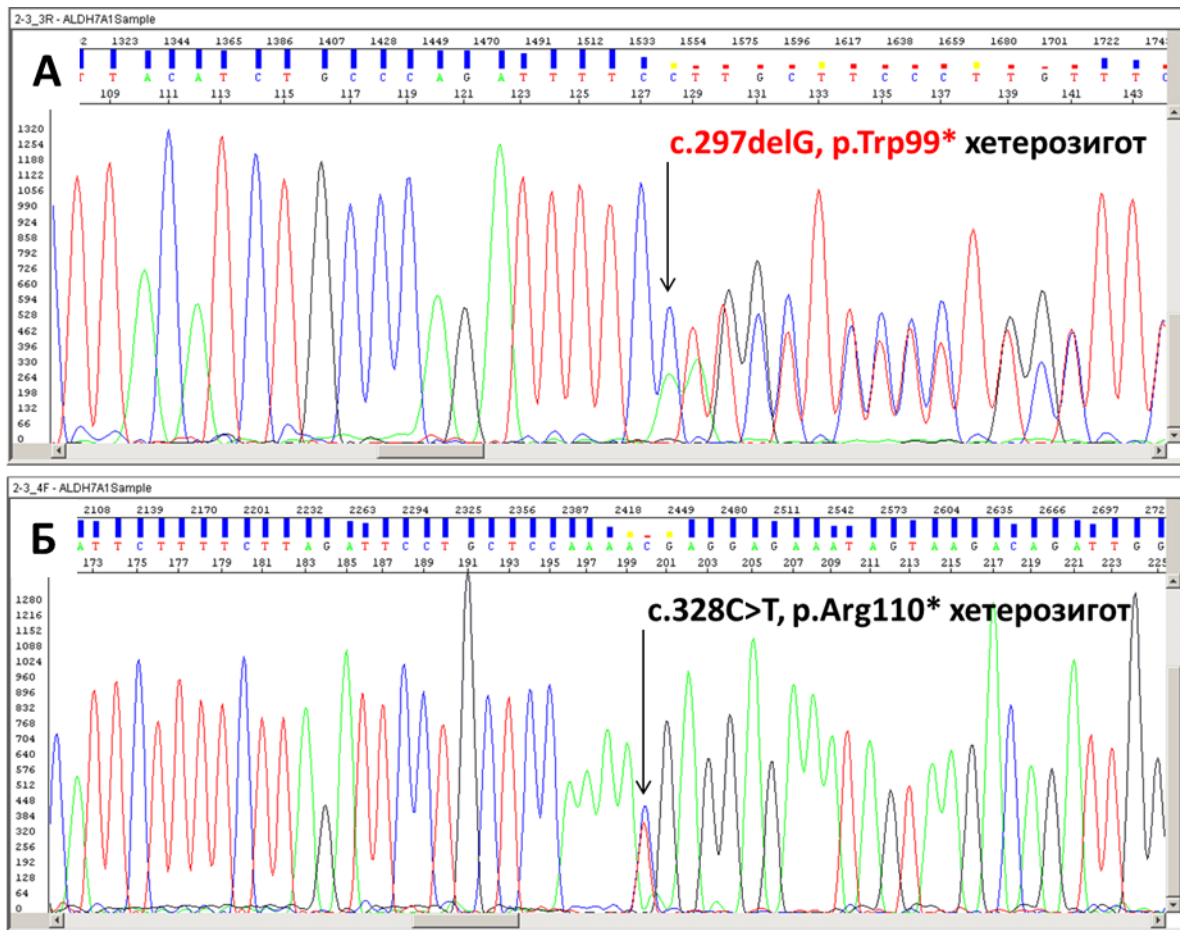
##### Клинична картина

Семейство 2 е представено от двойка двуйайчни близнаци от български произход, заченати *in vitro*. Родени са с цезарово сечение от 37-годишна майка. Теглото им при раждане е било съответно 2740 g при момчето и 2620 g при момичето. Налични са данни за перинатална асфикция. Два часа след раждането децата получават първите си

епилептични пристъпи – мултифокални клонични гърчове, неповлияващи се от антиепилептични медикаменти (Фенобарбитал 38.4 mg и 29.6 mg/kg телесно тегло и диазепам като постоянна инфузия). На 20-тия час след раждането и при двете деца интравенозно е приложен 50 mg пиридоксин, довеждайки до незабавно прекратяване на епилептичните прояви. Умерена мускулна хипотония и понижена двигателна активност е наблюдавана през следващите 3 дни. При момчето е приложена втора доза пиридоксин (50 mg) на 12-тия ден като терапия за мултифокални клонични гърчове и тонично хоризонтално очно отклонение. През първия месец друга антиепилептична терапия не е прилагана и при двете деца. Изписани са без епилептични оплаквания, на специална хранителна формула за преждевременно родени бебета, съдържаща 119 mcg витамин B6 на 100 ml. Биохимичните кръвни изследвания не са показали отклонения, без електролитни нарушения, хипогликемия и хипокалциемия. Децата са приети отново на възраст 2 месеца поради епилептичен рецидив – генерализиран тонично-клоничен гърч с фиксиране на погледа и продължителност от 3 – 6 минути. След незабавно прилагане на пиридоксин (100 mg интравенозно), гърчовете са напълно овладяни. Проведените ЕЕГ в будно състояние и при сън не са показали отклонения. Пациентите са изписани с комбинирана терапия от 25 mg витамин B6 дневно (приеман орално) и валпроат с цел превенция на рецидиви.

### Молекулярно-генетичен анализ

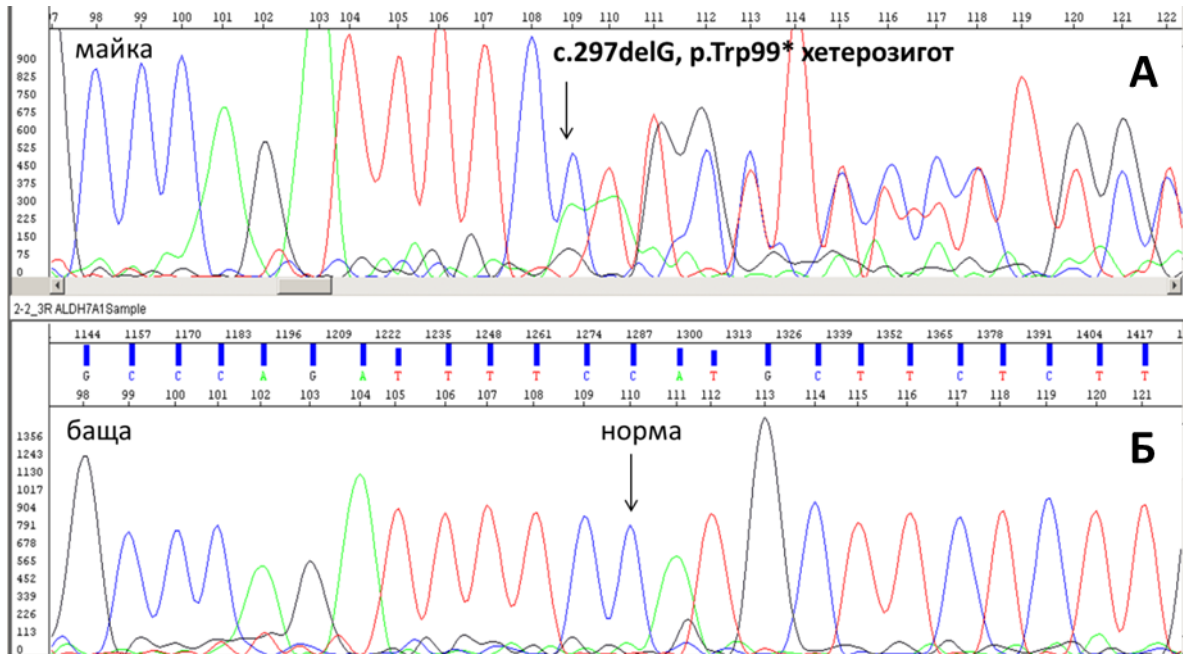
Секвенирането на *ALDH7A1* гена при пациентите от семейство 2 показва, че и двамата близнаци са носители на едни и същи дефекти в хетерозиготно състояние: с.297delG, p.Trp99\* в трети екзон и с.328C>T, p.Arg110\* в четвърти екзон (Фигура 18).



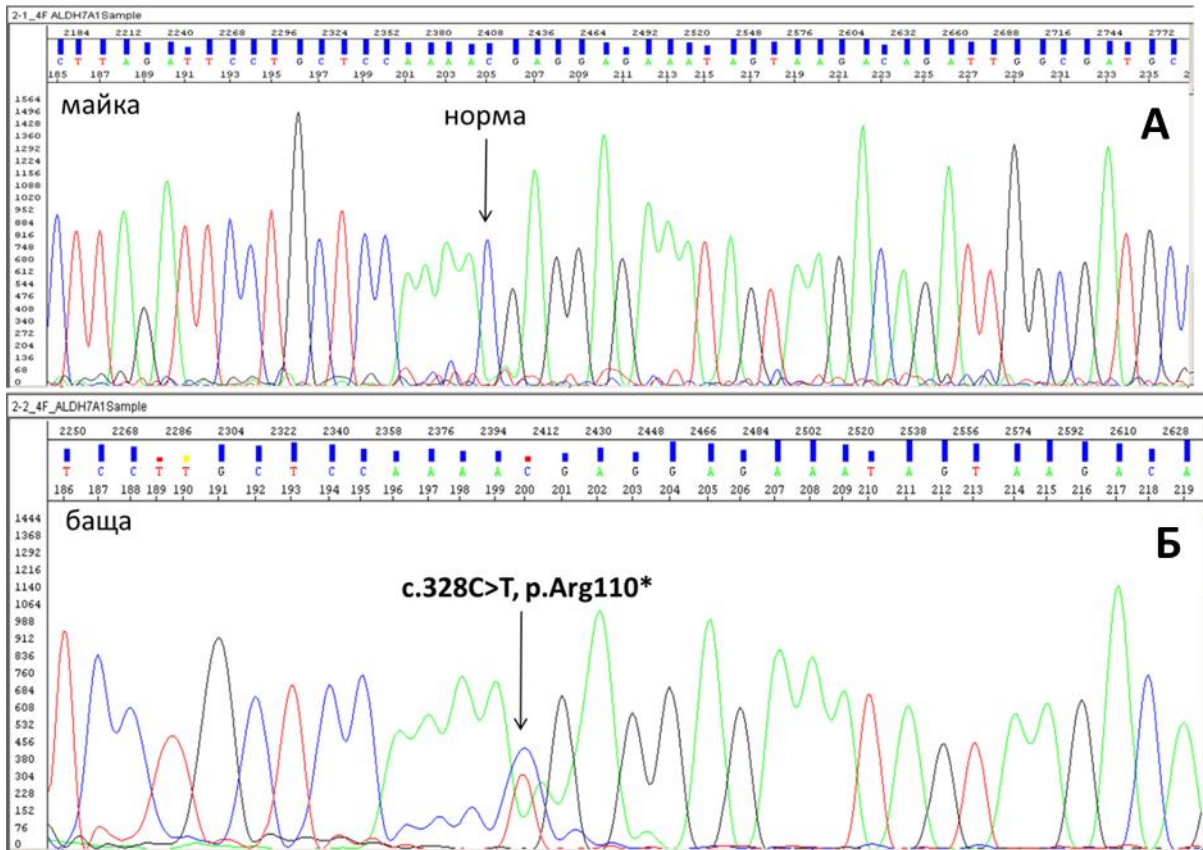
**Фигура 18. Секвенционен профил на *ALDH7A1* гена при пациентите от семейство 2.** Представени са участък от трети (панел А) и четвърти екзон (панел Б), където съответно попадат двете мутации c.297delG, p.Trp99\* и c.328C>T, p.Arg110\*.

Двете деца са унаследили делецията от асимптоматичната им майка. Клинично здравият им баща от своя страна е носител на точковата замяна c.328C>T, p.Arg110\* (Фигури 19 и 20). Мутацията c.297delG, p.Trp99\* беше докладва за пръв път от нашия екип. До момента няма данни в световната литература тази замяна на кодон за аминокиселината триптофан със стоп кодон да е откривана от други изследователски групи. Представлявайки делеция на една базова двойка, тази мутация води до изместване на рамката на четене на генетичната информация. Това води до непосредствено формиране на стоп кодон на позиция 99 от аминокиселинната последователност. Белтъчният синтез се прекратява преждевременно - дори преди достигане на аминокиселините, изграждащи каталитичното място на ензима [[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_001189333.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001189333.1)]. Тези последствия от c.297delG, p.Trp99\* определят потенциалната патогенност на мутацията – в резултат от

възникването ѝ сериозно е възпрепятствано синтезирането на функционален белтъчен продукт.



**Фигура 19.** Секвенционен профил на трети екзон на *ALDH7A1* гена при родителите от семейство 2. А. Мутацията c.297delG, p.Trp99\* е унаследена от децата от асимптоматичната им майка (която е хетерозиготен носител на същата мутация). Б. Бащата не е носител на c.297delG, p.Trp99\*. Секвенционният профил при майката (панел А) показва нарушаването на рамката на четене на гена – непосредствено след еднонуклеотидната делеция започва изместване на рамката на четене (frameshift), което води до припокриване на пиковите в електрофореграмата.



**Фигура 20.** Секвенционен профил на четвърти екзон на *ALDH7A1* гена при родителите от семейство 2. А. Майката не е носител на с.328C>Т, р.Arg110\*. Б. Мутацията с.328C>Т, р.Arg110\* е унаследена от клинично здравия баща (който е хетерозиготен носител на същата мутация).

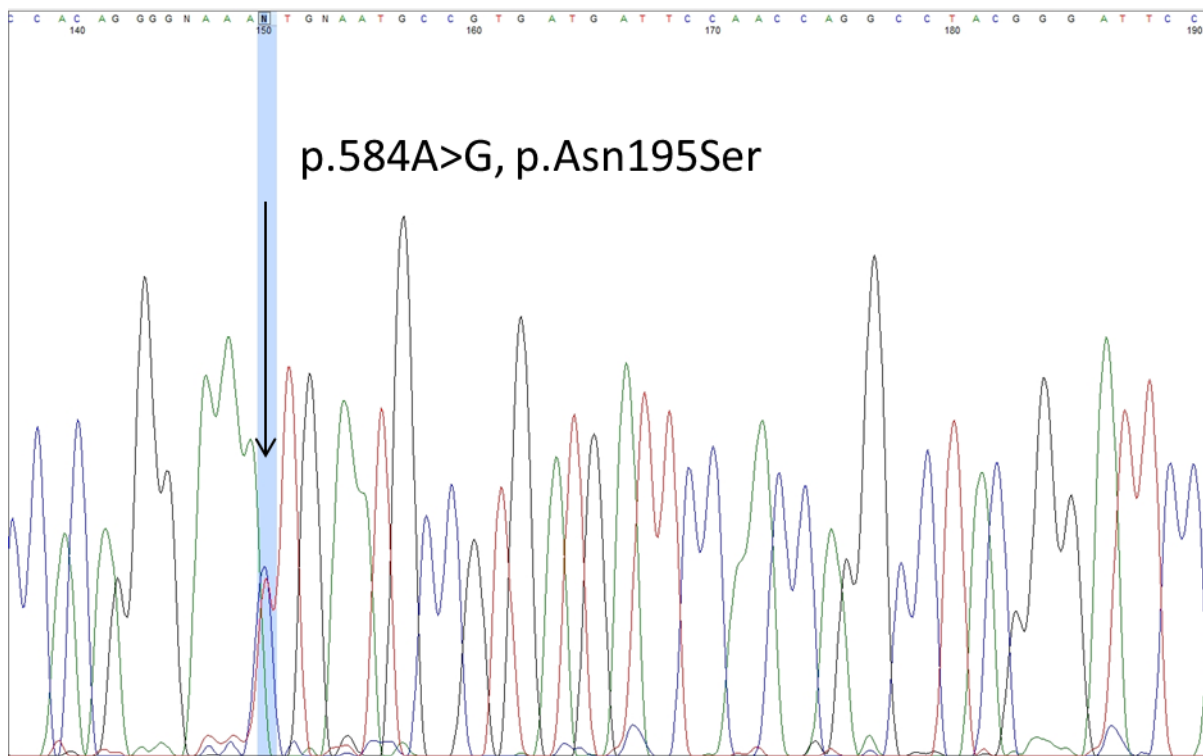
#### 4.1.2.2. Семейство 5:

##### Клинична картина

Пациентът е момче на възраст 3 месеца по време на молекулярно-генетичния анализ, от български произход, без фамилна история по отношение на епилепсия. Наблюдавани са парциални, вторично генерализирани гърчове, неповлияващи се от конвенционални антиконвулсанти. Терапия с 100 mg витамин В6 е довела до незабавно спиране на епилептичните прояви. Пациентът е изписан с поддържаща терапия - витамин В6 и валпроат. Рецидиви не са отчетени (нормални ЕЕГ резултати в будно състояние и сън), без изоставане във физическото и психическо развитие.

### Молекулярно-генетичен анализ

При това семейство също бяха открити 2 мутации в *ALDH7A1* гена, но този път и двете вече публикувани от други автори. Едната замяна отново е nonsense мутацията c.328C>T, p.Arg110\* в екзон 4. Тя е унаследена при пациента от неговия фенотипно здрав баща. Втората мутация, открита при пациента от семейство 5, е missense замяна c.584A>G, p.Asn195Ser, локализирана в екзон 6 на *ALDH7A1* гена (Фигура 21). Майката на болното дете е носител на тази замяна в хетерозиготно състояние и съответно няма изявена клинична картина.



Фигура 21. Секвенционен профил на участък от шести екзон на *ALDH7A1* гена при пациента от семейство 5, обхващащ района на замяната c.584A>G, p.Asn195Ser.

#### 4.1.2.3. Семейства с негативен *ALDH7A1* статус:

При семейства 1, 3, 4 и 6 не бяха открити патологични изменения в *ALDH7A1* гена. С цел изясняване на диагнозата при тях беше взето под внимание и друго наследствено заболяване с подобна клинична картина - пиридоксал 5'-фосфат зависима епилепсия (ПФЗЕ). ПФЗЕ отново е автозомно рецесивно наследствено заболяване, но се дължи на

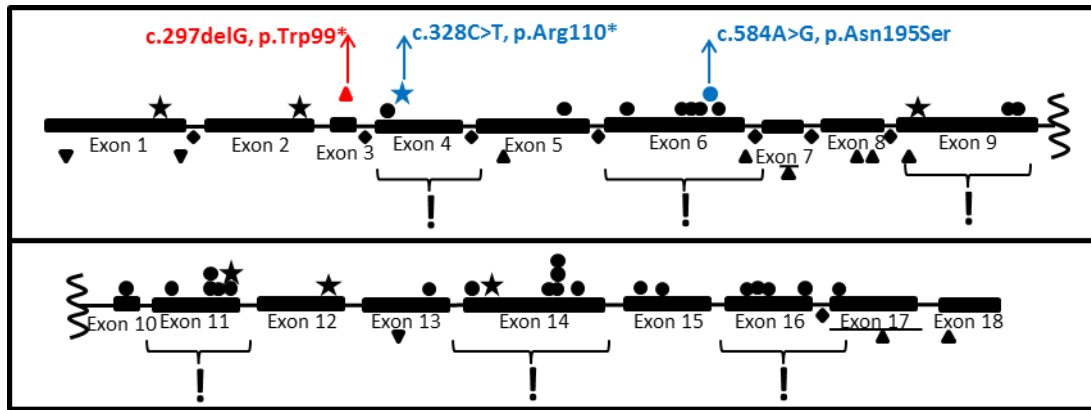
молекулни дефекти в гена *PNPO*, който кодира ензима пиридоксин 5'-фосфат оксидаза [Mills *et al.*, 2005]. Той катализира превръщането на пиридоксин фосфат и пиридоксамин фосфат в активен пиридоксал фосфат (Фигура 7 от раздел „Литературен обзор“).

Първоначално *PNPO* дефицитът е бил наблюдаван като фармакорезистентна епилептична енцефалопатия при деца, повлияваща се само от приложение на пиридоксал фосфат. На базата на този факт заболяването е прието за клинично различно от пиридоксин зависимата епилепсия [Mills *et al.*, 2005, Hoffmann *et al.*, 2007, Bagci *et al.*, 2008]. В последствие обаче са докладвани множество случаи на *PNPO* дефицит, показващи много добър отговор към пиридоксин [Pearl *et al.*, 2013, Mills *et al.*, 2014, Plecko *et al.*, 2014]. Това предполага всички *ALDH7A1*-негативни пациенти с клинична диагноза ПЗЕ да бъдат изследвани за дефекти и в *PNPO* гена.

Съответно в хода на настоящата разработка беше проведено молекулярно-генетично изследване на *PNPO* гена и при четирите *ALDH7A1*-негативни семейства (семейства 1, 3, 4 и 6). За съжаление при нито един пациент не бяха открити *PNPO* мутации, предполагайки необходимостта от преразглеждане на диагнозата им.

#### 4.1.3. Дискусия

Поради малкия брой докладвани случаи на ПЗЕ до момента пълната клинична картина на заболяването все още не е напълно изяснена [Burd *et al.*, 2000]. Заболяването най-вероятно не е добре разпознаваемо и съответно докладваната честота е изкуствено занижена, предполагайки наличие на неразпознати и съответно недиагностицирани ПЗЕ пациенти [Shorvon *et al.*, 2011]. По литературни данни честотата на заболяването варира в широки граници: от около 1:780 000 [Burd *et al.*, 2000] до 1:20 000 [Ebinger *et al.*, 1999]. От откриването на *ALDH7A1* гена през 2006 г. до сега са докладвани по-малко от 100 мутации (91 според HGMD Professional 2013.4 и 65 според HGMD Public; <http://www.hgmd.org/>). Предишни проучвания предполагат, че по отношение на европейската популация има наличие на „горещи региони“ в *ALDH7A1* гена. В тях се включват екзони 4, 6, 9, 11 и 14, като ~60% от докладваните мутации са локализирани именно в тях [Mills *et al.*, 2010; Stockler *et al.*, 2011] (Фигура 22).



**Фигура 22. Графично представяне на *ALDH7A1* гена и докладваните в него мутации.** Използвани са следните символи: звезда – nonsense мутация, кръг – missense мутация, триъгълник – делеция, обърнат триъгълник – дупликация, удивителен знак – „горещ регион“, правоъгълник – екзон, линия – интрон. Новооткритата мутация c.297delG, p.Trp99\* е отбелязана с червен цвят, а другите две открити при нашите пациенти мутации – със синьо.

### „Горещ регион“

Мутациите, които откриваме при нашите пациенти и същевременно са вече докладвани и от други автори – c.328C>T, p.Arg110\* и c.584A>G, p.Asn195Ser, са разположени съответно в четвърти и шести екзон, т.е. те попадат в „горещия регион“ за европейската популация. Новооткритата c.297delG, p.Trp99\* мутация обаче е разположена в екзон 3 на *ALDH7A1* гена, попадайки извън честия регион, в който бихме очаквали да открием замените при български пациенти.

Повечето открити до момента мутации в *ALDH7A1* гена по същността си са еднонуклеотидни замени, и по конкретно missense мутации – т.е. една аминокиселина се заменя с друга аминокиселина, различаваща се по физико-химичните си характеристики, но без все пак това да измества рамката на четене на целия ген. Броят на докладваните nonsense мутации, т.е. такива, водещи до формиране на преждевременен стоп-кодон, е значително по-малък, а делециите се срещат още по-рядко (Фигура 21). Настоящото проучване допринася за обогатяване на спектъра докладвани *ALDH7A1* замени с една нова неоткривана до момента мутация, при това обогатяване с мутация от тип делеции – най-рядко срещаният тип дефекти в дадения ген.

От гледна точка на приложната част на настоящата разработка е необходимо да се акцентира върху подхода за изследване на пациентите с клинична диагноза ПЗЕ.

Въпреки че всички изследвани от нашия екип пациенти са от европейски произход (по-конкретно български), не е достатъчно да бъдат анализирани само „горещите региони“ на *ALDH7A1* гена. Те биха могли да служат само като първа стъпка в изследванията, но в никакъв случай не са достатъчни за отхвърляне на диагнозата. Необходимо е секвениране на целия ген, с всичките му кодиращи части, за да се стигне до еднозначно потвърждаване или изключване на клиничната диагноза ПЗЕ. В противен случай диагнозата може да остане непотвърдена на молекулно ниво. Постоянно увеличаващият се брой докладвани *ALDH7A1* мутации и генетично верифицирани случаи ще допринесе за определяне на реалната честота на тоза заболяване.

В случаите, в които въпреки цялостното прочитане на нуклеотидната последователност на *ALDH7A1* гена, не се откриват патологични изменения, логична втора стъпка в изследванията би могло да бъде секвениране на *PNPO* гена, поради значително припокриваща се изява на пиридоксин зависимата и пиридоксал 5'-фосфат зависимата епилепсия. Ако дори и на този етап не бъде изяснена причината за симптоматиката на пациентите, както при семейства 1, 3, 4 и 6, може да се върви по посока на преразглеждане на диагнозата, което е от съществено значение за правилната терапия на пациентите.

### Генотип-фенотипна корелация

Предсказване на ефекта на missense мутациите е много сложна задача, тъй като той може да бъде много различен в зависимост от функцията на засегнатата аминокиселина, позицията ѝ, както и приликите и разликите между изходната и новополучената аминокиселина по отношение на физико-химичните им свойства: размер, разположение, заряд, реактивоспособност, изоелектрична точка и др. При замяна с близка по свойства аминокиселина е възможно функцията на белтъка да бъде запазена в голяма степен. За разлика от missense мутациите обаче nonsense мутациите и тези, водещи до изместване на рамката на четене, обикновено имат патогенен ефект [Scharer *et al.*, 2010]. При пациентите от семейство 2 и двете открити мутации водят до преждевременно формиране на стоп-кодон, белтъчната синтеза спира много рано: на позиция 99 или 110 съответно. Така получените полипептидни вериги дори не включват аминокиселините, изграждащи активния център на ензима (195 – 330 аминокиселина).

Това най-вероятно води до пълна загуба на функцията на *ALDH7A1* гена при нашите пациенти. Според Schragger и сътр., 2010 пациентите с пиридоксин зависима епилепсия могат да бъдат разделени на групи в зависимост от отговора им към пиридоксинова терапия и наличието или отсъствието на умствено изоставане. Спектърът на клиничните симптоми корелира с генотипа на пациента. В случая на близнаците от семейство 2 може да бъде очакван съответно по-тежък патологичен фенотип – с умствено изоставане и необходимост от включване на допълнителни антиепилептични медикаменти към терапията с витамин В6. Обнадеждаващи резултати дава наскоро описаната тройна терапия: пиридоксин в комбинация с бедна на лизин диета и l-аргинин. Тя показва пониска невротоксичност (дължаща се иначе на нарушения лизинов метаболизъм) и по този начин се намалява неврологичната симптоматика [Coughlin *et al.*, 2015].

При пациента от семейство 5 се очаква клиничните прояви да бъдат по-леки, с нормално умствено развитие, при условие, че се прилага непрекъснатата пиридоксинова терапия. Тези познания по отношение на генотип-фенотипните корелации дават възможност да се определи правилната терапия за всеки един пациент, както и подходящото генетично консултиране на родителите.

#### **4.1.4. Заключение**

Настоящото проучване представлява първата стъпка по посока на молекулярно-генетично охарактеризиране на някои форми витамин-зависими епилептични енцефалопатии при деца в България, а именно пиридоксин зависима епилепсия и пиридоксал 5-фосфат зависима епилепсия. Откритите мутации в *ALDH7A1* гена позволяват потвърждаване на генетично ниво на диагнозата пиридоксин зависима епилепсия при трима от пациентите ( $3/8 = 37.5\%$ ). При останалите пет пациента секвенирането и на двата гена (*ALDH7A1* и *PNPO*) не доведе до откриване на генетичен дефект, който би могъл да обясни клиничната картина, и по този начин подсказвайки най-вероятната необходимост от преразглеждане на клиничната диагноза.

## **4.2. Миотония конгенита тип Бекер**

### **4.2.1. Изследвана група пациенти**

В настоящия дисертационен труд са включени 9 семейства с клинична диагноза миотония конгенита тип Бекер, представени от 11 симптоматични пациента (сред тях 2 сестри, една братовчедка), една асимптоматична сестра, един неродствен партньор, един фетус (изследван пренатално) и родителите на всички пациенти (общо 32 изследвани лица). В таблица 20 са представени всички изследвани пациенти и техни родственици, както и някои клинични и молекулярно-генетични данни. Семейства 1, 2, 4, 6, 7 и 8 са представени от по едно засегнато дете и двама здрави родители. Семейство 9 за съжаление е представено само от пациент с фенотипна изява, родителите за момента не са налични. Семейства 3 и 5 са обект на особен интерес за дадената разработка поради значително по-големия брой засегнати индивиди. Родителите на всички пациенти бяха изследвани с цел уточняване на носителския им статус. Настоящата разработка включва първото молекулярно генетично изследване на пациенти с клинична диагноза миотония конгенита тип Бекер за България.

Таблица 20. Клинични и молекулярно-генетични данни на всички пациенти с диагноза миотония конгенита тип Бекер, обект на настоящата дисертация.

№	семейство	изследвани лица	брой изследвани родители	пол	възраст по време на изследване	първи симптоми (години)	произход	място на раждане	мутация в CLCN1 гена (1)	тип мутация	унаследена от	мутация в CLCN1 гена (2)	тип мутация	унаследена от
1		едно дете	2	женски	11	11	български	Болярци, обл. Пловдив	с. 1471+1G>A	splice-site	майка	с. 2680C>T, p.(Arg894*)	nonsense	баща
2		едно дете	2	мъжки	26	11	български	няма данни	с. 1471+1G>A	splice-site	баща	с. 2680C>T, p.(Arg894*)	nonsense	майка
3		две сестри	2	женски	5	5	български турци	Брезница, обл. Гоце Делчев	с. 817G>A, p.Val1273Met	missense	майка	с. 817G>A, p.Val1273Met	missense	баща
		женски		3	3									
		фетус	-	пренатално	-	-	-	не знае	с. 817G>A, p.Val1273Met	missense	не знае	норма	-	-
4		едно дете	2	женски	28	2	български турци	Брезница, обл. Гоце Делчев	с. 817G>A, p.Val1273Met	missense	майка	с. 817G>A, p.Val1273Met	missense	баща
5		брат и сестра	2	мъжки	25	4	български	Лик, обл. Мездра	с.1571A>G, p.Tyr524Cys	missense, <b>новооткрита</b>	майка	с.1571A>G, p.Tyr524Cys	missense, <b>новооткрита</b>	баща
				женски	28	няма симптоми								
6		съпруг на сестрата	0	мъжки	36	няма симптоми	български	Варна	с.2284+5C>T	splice-site	-	с.501C>G, p.Phe167Leu	missense	-
7		едно дете	2	мъжки	5	2	български турци	Велики Преслав	норма	-	-	норма	-	-
8		брат и сестра	2	мъжки	11	1	български турци	Брезница, обл. Гоце Делчев	с.1436_1449delTACC CTGGGAGGC, p.Pro480Hisfs Ter24	делеция, frameshift	баща	с. 817G>A, p.Val1273Met	missense	майка
				женски	4	няма симптоми								
9		едно дете	0	мъжки	няма данни	няма данни	италиански	Рим	с.1444G>A, p.Gly482Arg	missense	-	с.(2490+1_2490-1)_(3054+?)	делеция	-

## 4.2.2. Клинични данни и молекулярно-генетични резултати

### 4.2.2.1. Семейства 1 и 2

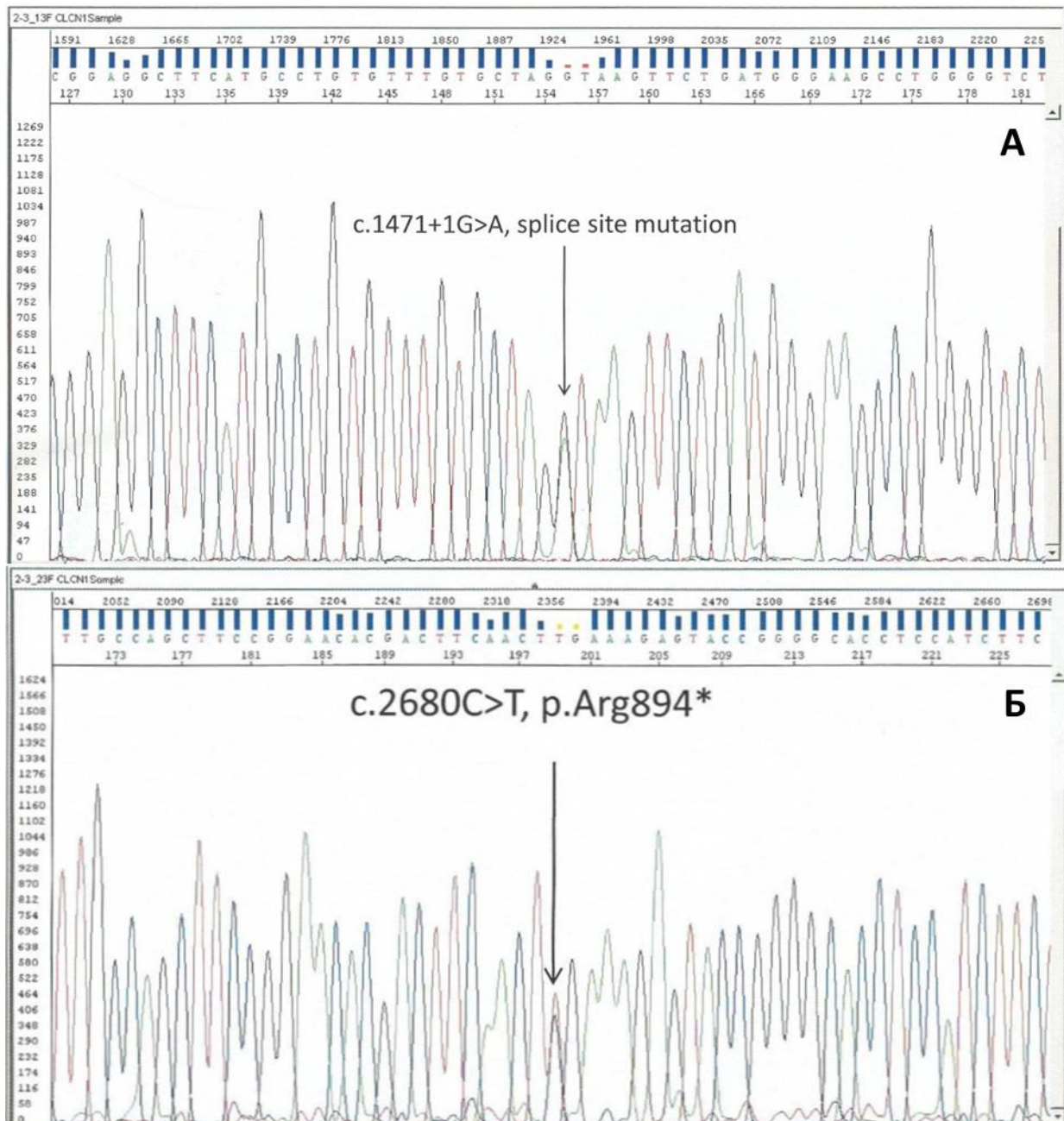
#### Клинична картина

При семейство 1 пациентът е 11 годишно момиче, проявило първите си симптоми под формата на мускулна скованост след продължителен период на покой, но без влошаване при ниски температури на околната среда. При изкачване на стълби най-отчетливо е наблюдавана скованост на *quadriceps femoris*. Налице е лека перкусионна миотония на тенара. След волево съкращение на мускулите на ръката е невъзможно отпускането им. Резултатите от ЕМГ показват наличие на миотонични залпове, триплети и фибрилации. Не се наблюдават отклонения по отношение на белодробния и сърдечния статус.

Семейство 2 е представено от 26 годишен пациент от мъжки пол с основно оплакване мускулна слабост, засягаща както долните, така и горните крайници. Първите му симптоми се появяват на 11 годишна възраст. Скованост на мускулите пациентът е наблюдавал основно след интензивно физическо натоварване.

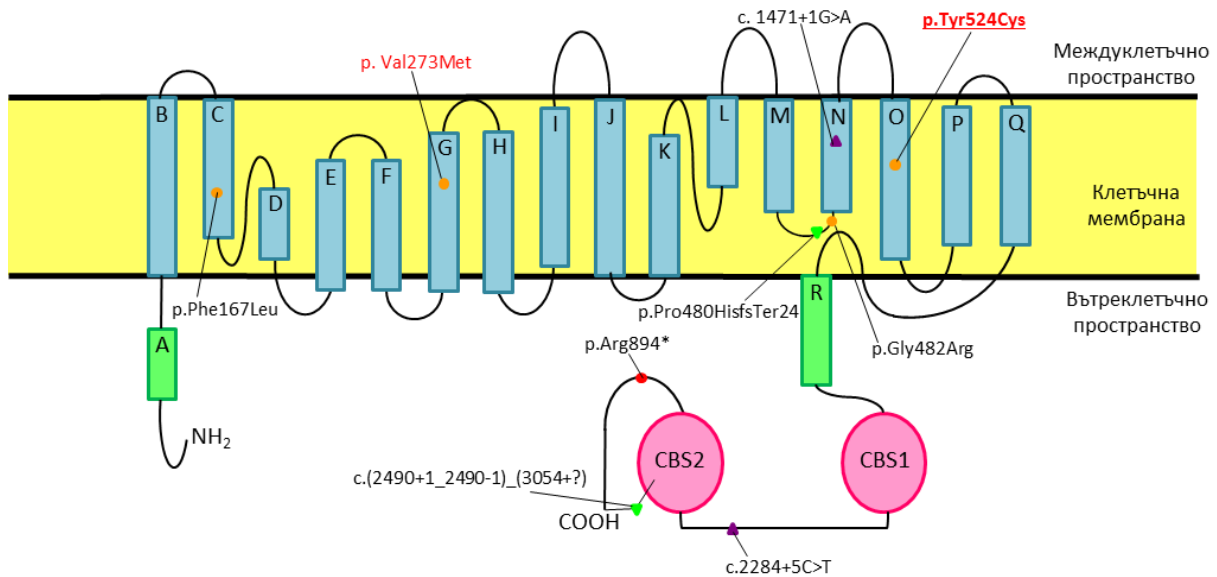
#### Молекулярно-генетичен анализ

Чрез секвениране по метода на Sanger на всички кодиращи екзони и екзон-интронните граници на *CLCN1* гена при пациентите от семейства 1 и 2 беше установено, че и при двамата заболяването се дължи на едни и същи мутации: splice-site мутация c.1471+1G>A и nonsense мутация c.2680C>T, p.Arg894\* в хетерозиготно състояние (Фигура 23).



**Фигура 23.** Секвенционен профил на *CLCN1* гена при пациентите от семейства 1 и 2. Представени са участък от 13 интрон, включващ splice-site мутацията c.1471+1G>A (панел А), и участък от 23 екзон, в който попада nonsense мутацията c.2680C>T, p.Arg894\* (панел Б). И двете замени са в хетерозиготно състояние.

На фигура 24 е представена вероятната структура на CIC-1 белтъка [Dutzler *et al.*, 2002; Estevez *et al.*, 2004; Brugnoli *et al.*, 2013]. Отбелязано е, кой участък на белтъка засяга всяка от откритите мутации.

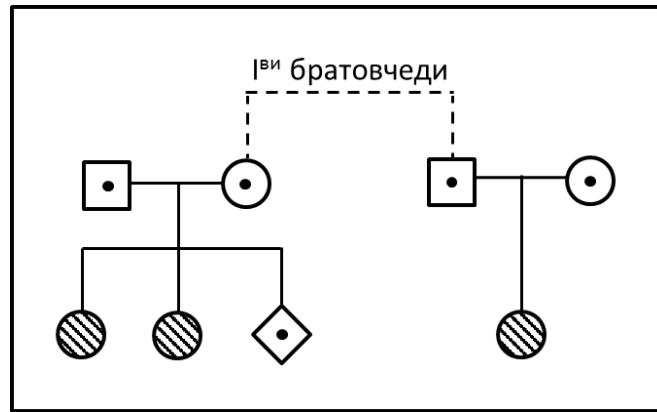


**Фигура 24. Структура на CIC-1 протеина.** Сините правоъгълници представляват трансмембранните  $\alpha$ -спирали на хлорния канал. Отбелязани са всички мутации, открити при пациенти в хода на дадената разработка. Използвани са следните символи: оранжев кръг – missense мутация, червен кръг – nonsense мутация, лилав тръгълник – splice-site мутация, зелен обърнат триъгълник - делеция. Новооткритата мутация е подчертана. С червено са изписани мутациите, които представляват специален интерес от популационна гледна точка.

#### 4.2.2.2. Семейство 3

##### Клинична картина

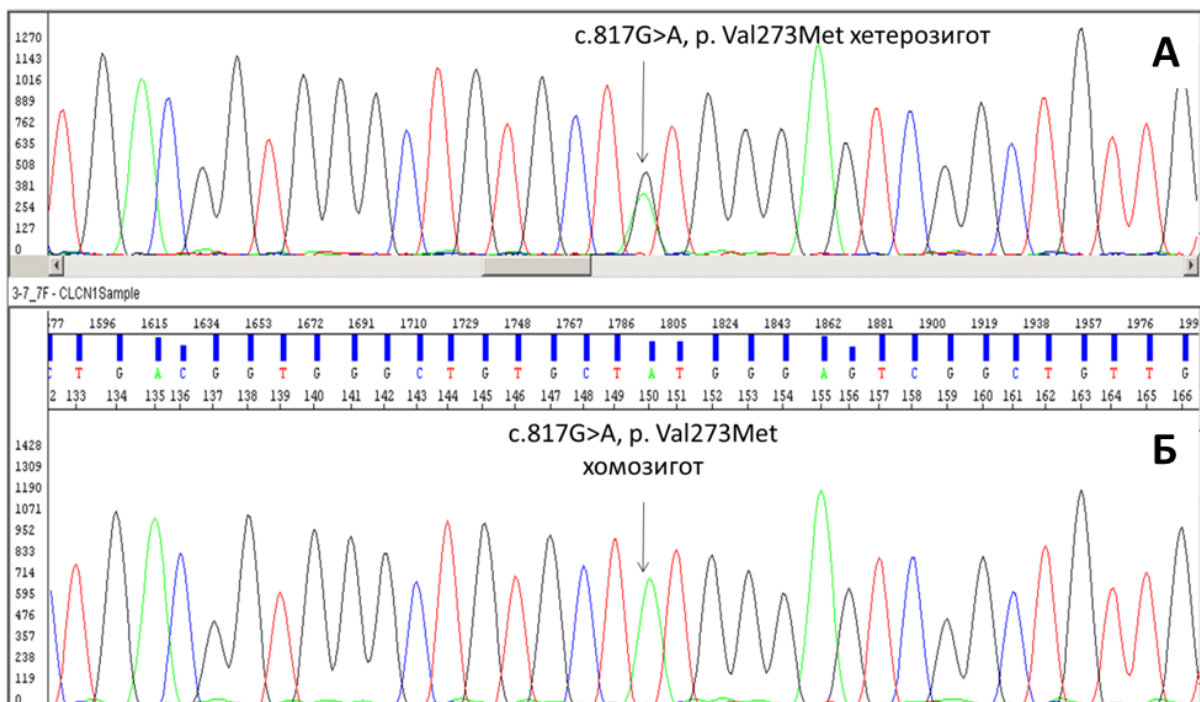
Специално внимание трябва да бъде обърнато на семейство 3: то е представено от две сестри с класическа клинична изява на миотония конгенита тип Бекер – съответно на възраст 5 и 3 години. Затрудено прохождение е първият забелязан симптом при двете момичета. И при двете е налице перкусионна миотония на тенара, миотонични залпове се наблюдават при ЕМГ. Семейството населява с. Брезница, област Гоце Делчев и е от българо-турски произход. Няколко години след първата среща на екипа ни с това семейство, тяхна втора братовчедка беше също насочена за молекулярно-генетичен анализ, поради наличие на същите оплаквания (Фигура 25). По време на извършване на изследванията тя е на 4 годишна възраст. След установяване на молекулярно-генетичната причина за заболяването в това семейство, беше възможно да бъде извършена и пренатална диагностика при майката на двете сестри.



**Фигура 25. Родствени връзки между пациентите от семейство 3.** Използвани са следните символи: Квадрат - индивид от мъжки пол, кръг – индивид от женски пол, ромб– неясен пол (фетус), празен символ – здрав индивид, раиран – засегнат индивид, с точка – носител на *CLCN1* мутация в хетерозиготно състояние.

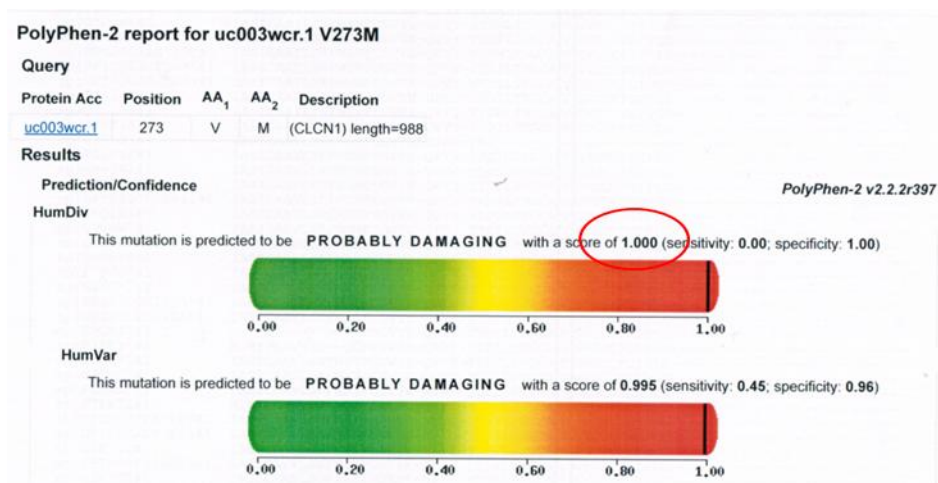
### Молекулярно-генетичен анализ

Секвениране на *CLCN1* гена при двете сестри доведе до идентифициране на една и съща замяна и при двете: missense мутация c.817G>A, p.Val273Met (в екзон 7 на *CLCN1* гена), при това в хомозиготно състояние (Фигура 26). При родителите молекулярно-генетичните изследвания, както беше очаквано, показаха същата мутация в хетерозиготно състояние. Двамата отричат да имат родствена връзка.



**Фигура 26. Секвенционен профил на *CLCN1* гена при семейство 3.** Представени са хетерозиготен (панел А) и хомозиготен носител (панел Б) на missense мутацията c.817G>A, p.Val273Met (в екзон 7 на *CLCN1* гена).

По времето, когато нашият екип откри тази замяна, тя все още не беше публикувана в световната литература, което наложи необходимостта от оценка на патогенността на този вариант. На базата на *in silico* предиктор PolyPhen-2 [<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>] замяната беше оценена като вероятно патогенна с индекс 1.000 според HumDiv и с индекс 0.995 според HumVar (Фигура 27). В последствие този вариант беше докладван от Brugnoni и сътр., 2013 като вероятно патогенен. Авторите откриват тази мутация при едно семейство от италиански произход. Замяната засяга високо консервативен аминокиселинен остатък в трансмембранна  $\alpha$ -спирала [Brugnoni *et al.*, 2013] - Фигура 24.



**Фигура 27.** Оценка на патогенността на p.Val273Met замяната с помощта на специализиран софтуер (PolyPhen-2). Софтуерът определя еднозначно замяната като вероятно патогенна с индекс 1.000 според HumDiv и с индекс 0.995 според HumVar.

При проведения молекулярно-генетичен анализ на втората братовчедка на двете сестри идентифицирахме отново същата missense мутация с.817G>A, p.Val273Met в екзон 7 на *CLCN1* гена, отново в хомозиготно състояние. Родителите са безсимптомни носители на мутацията в хетерозиготно състояние.

Познавайки носителския си статус, родителите на двете засегнати сестри решиха да изследват пренатално третото си дете. Съответно нашият екип имаше възможността да проведе това изследване. При фетуса не беше проведено цялостно секвениране на *CLCN1* гена, а само прицелно изследване (отново чрез секвениране по Sanger, но само

на екзон 7) на фамилната мутация. Резултатите показаха, че третото дете на семейството е здрав носител на семейния дефект с.817G>A, р.Val273Met – в хетерозиготно състояние.

#### 4.2.2.3. Семейство 4

##### Клинична картина

Пациентът от семейство 4 е 28 годишна жена, единствено дете на неродствени здрави родители. Насочена е за генетичен анализ на *CLCN1* гена с клинична диагноза миотония конгенита тип Бекер. За съжаление не са налични по-подробни клинични и неврологични данни.

##### Молекулярно-генетичен анализ

Клиничната диагноза на пациента от това семейство беше потвърдена чрез секвениране на *CLCN1* гена. Открита беше вече познатата от семейства 1 и 2 splice-site мутация с.1471+1G>A, но този път в хомозиготно състояние. Честата среща на тази замяна предполага това да е най-честата мутация, причиняваща заболяването миотония конгенита тип Бекер за българската популация.

#### 4.2.2.4. Семейство 5

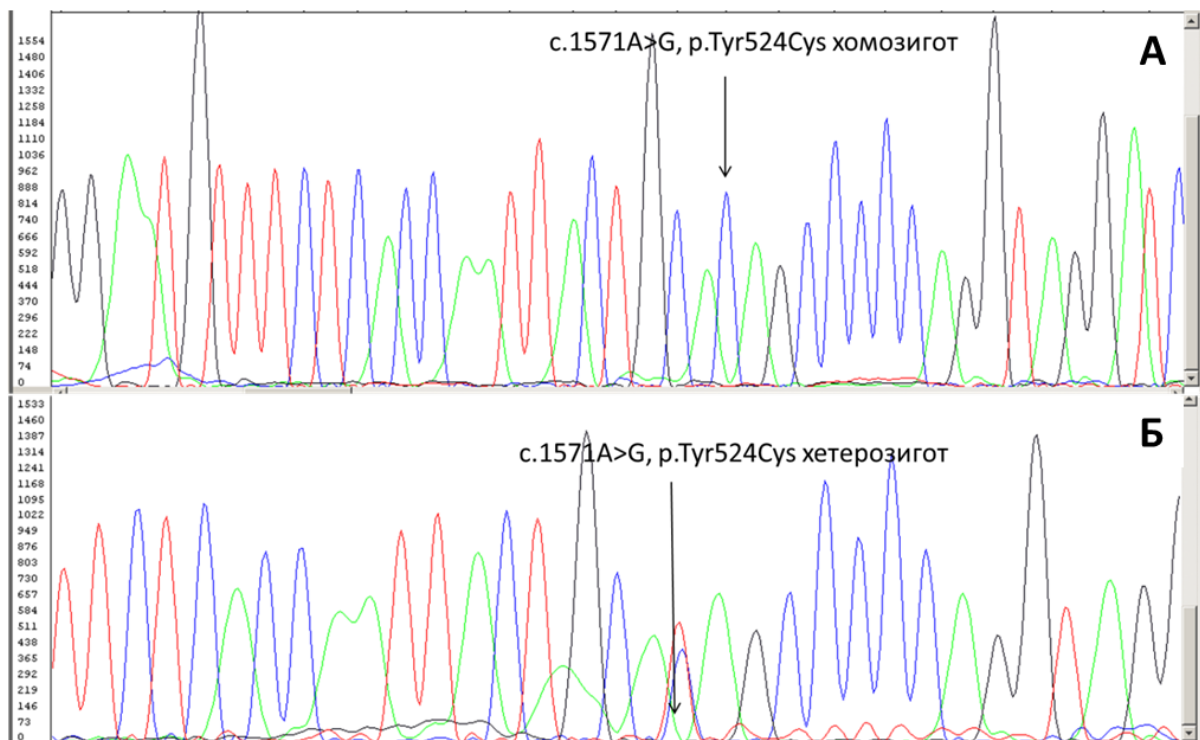
##### Клинична картина

Семейство 5 първоначално беше представено само от един пациент – 25 годишен, от мъжки пол, с начало на заболяването на 4 годишна възраст. Първите симптоми са включвали трудности при изкачване на стъбли, мускулна скованост, класическа изява на „ефект на загряване“, хипертрофия на мускулите на горните и долните крайници, перкусионна миотония на тенара, но със запазени мускулен тонус и сила. ЕМГ на мускули на горни и долни крайници показва миотонични залпове. Няма данни за отклонения в белодробния и сърдечния статус. Пациентът е от български

произход, по-конкретно от северозападна България – с. Лик, обл. Мездра. В последствие допълнително изследвахме асимптоматичната сестра на пациента и нейния партньор.

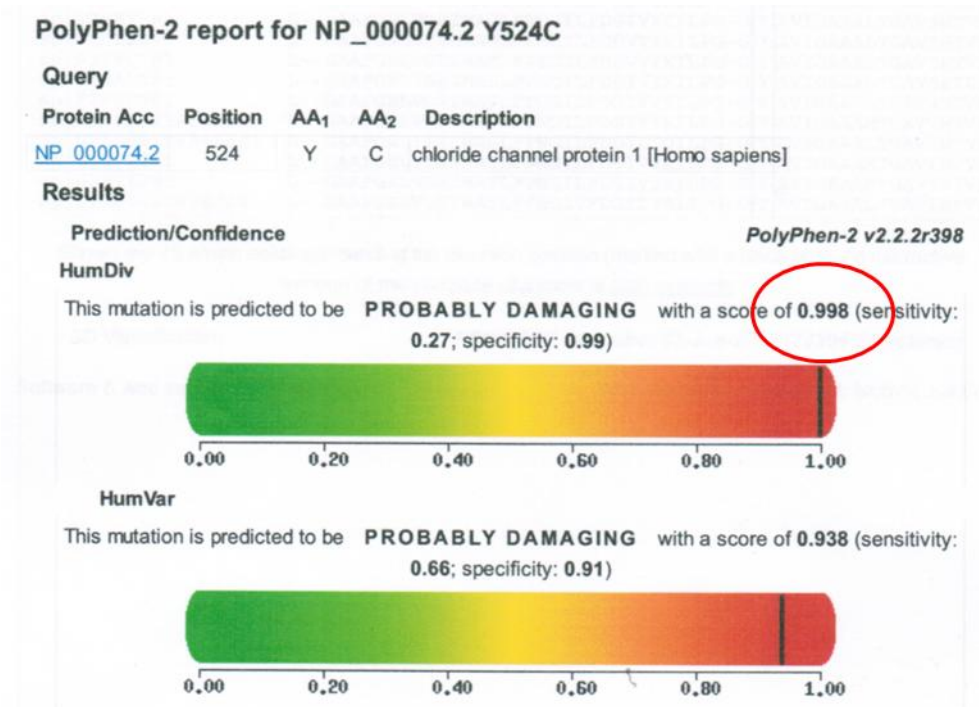
### Молекулярно-генетичен анализ

Молекулярно-генетичният анализ при пациента показва наличие на нова непубликувана досега missense замяна в екзон 14 на *CLCN1* гена: c.1571A>G, p.Tyr524Cys (Фигура 28).



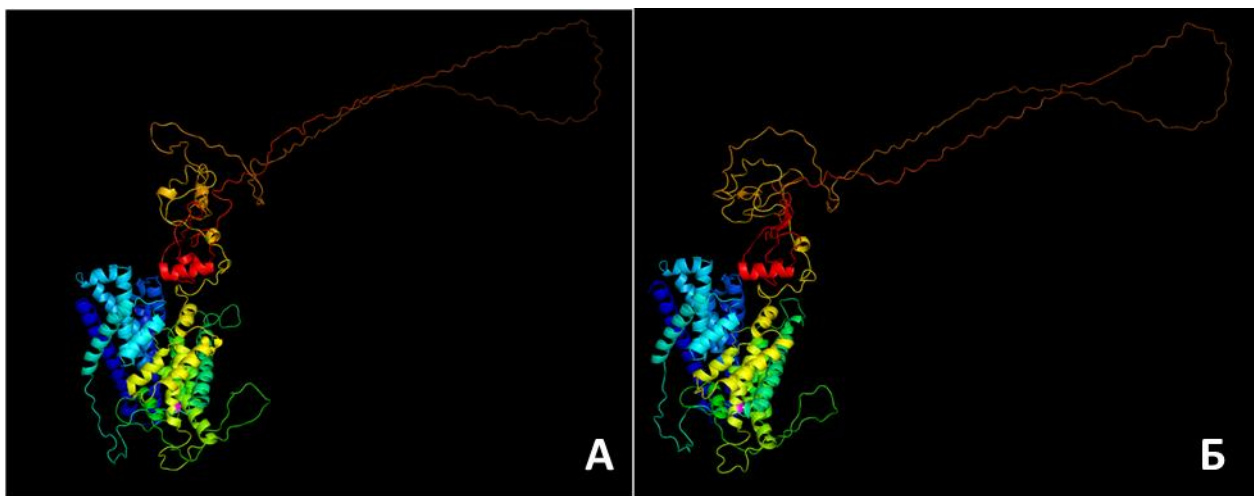
**Фигура 28.** Секвенционен профил на *CLCN1* гена при семейство 3. Представени са хомозиготен (панел А) и хетерозиготен носител (панел Б) на missense замяната c.1571A>G, p.Tyr524Cys (в екзон 14 на *CLCN1* гена).

Патогенността на този вариант беше оценен софтуерно (*in silico* предиктор PolyPhen-2) като вероятно патогенна с индекс 0.998 според HumDiv и 0.938 според HumVar (Фигура 29).



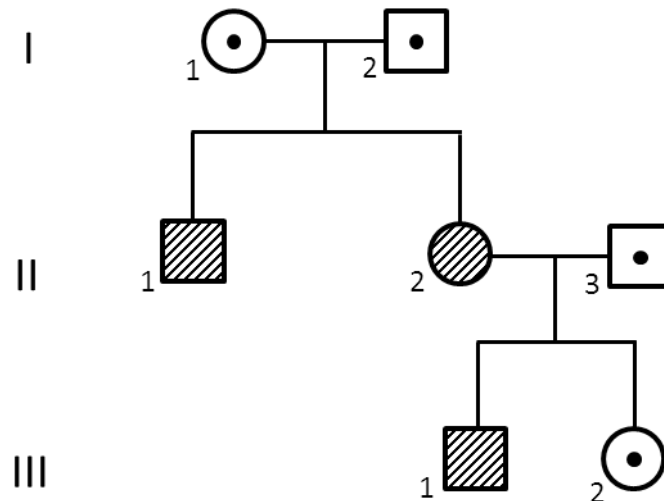
**Фигура 29.** Оценка на патогенността на р.Tyr524Cys замяната с помощта на специализиран софтуер (PolyPhen-2). Софтуерът определя еднозначно замяната като вероятно патогенна с индекс 0.998 според HumDiv и 0.938 според HumVar.

Мутацията най-вероятно засяга една от трансмембранните  $\alpha$ -спирали на хлорния канал – по-конкретно петнадесетата (спирала O, Фигури 24 и 30). Замяната на ароматната аминокиселина тирозин с полярната цистеин най-вероятно нарушава хидрофобните взаимодействия във вътрешността на плазмената мембрана.



**Фигура 30.** Триизмерен модел на ClC-1 протеина при наличие на новата р.Tyr524Cys мутация в сравнение с нормалната протеинова структура [<https://swissmodel.expasy.org/>; <https://www.rymol.org/>]. Нуклеотидът на позиция 524 е отбелязан в лилав цвят и на двата панела. А. Нормален белтък. Б. Белтък с р.Tyr524Cys мутация.

По данни на пациента в семейството му има и други родственици със същите оплаквания, както в хоризонтална, така и във вертикална посока. На фигура 31 е представено родословното дърво на семейство 5 (по информация от пациента, не е налична медицинска документация).



**Фигура 31. Родословно дърво на семейство 5.** Използвани са следните символи: Квадрат - индивид от мъжки пол, кръг – индивид от женски пол, раиран символ – засегнат индивид, символ с точка – носител на *CLCN1* мутация в хетерозиготно състояние.

Унаследяването прилича на автосомно доминантно, тъй като във всяко поколение присъстват засегнати индивиди. За съжаление нито един родственик не беше наличен за извършване на молекулярно-генетични изследвания (някои от родствениците са починали, други не желаят да участват в даденото проучване). След потвърждаване на клиничната диагноза при брат й, единствено асимптоматичната сестра на пациента даде съгласието си за извършване на анализ на *CLCN1* гена. Тя беше изследвана само за фамилната мутация с.1571A>G, p.Tyr524Cys – при нея идентифицирахме тази замяна в хетерозиготно състояние. Носителският й статус беше причина за цялостно секвениране на *CLCN1* гена при клинично здравия й партньор, с цел осигуряване на коректно генетично консултиране във връзка с бъдещото й семейно планиране. Най-неочаквано при съпруга й бяха открити 2 замени: един splice-site с.2284+5C>T и един missense с.501C>G, p.Phe167Leu вариант. И двете замени са публикувани вече в световната литература, но с доста противоречиви данни. Някои автори ги приемат за патогенни [Sun *et al.*, 2001; Lucchiari *et al.*, 2013]. Missense замяната

дори е докладвана при пациенти, носители едновременно на 3 замени в *CLCN1* гена, но винаги в определена конфигурация: с.501C>G, р.Phe167Leu на едно и също копие с друга missense мутация - р.Arg105Cys, а третата мутация на другия алел [Brugnoni *et al.*, 2013]. с.501C>G, р.Phe167Leu засяга третата  $\alpha$ -спирала на CIC-1 белтъка (Фигура 24), предизвиквайки лека промяна във вероятността за отваряне на канала и по този начин най-вероятно довеждайки до промяна в нормалната му функция [Zhang *et al.*, 2000]. Splice-site вариантът с.2284+5C>T се намира в интрон 18 и засяга C-терминалния домен на хлорния канал (Фигура 24). Предполага се, че този вариант представлява полиморфизъм – локализацията му на +5 позиция го прави малко вероятен кандидат за splice-site мутация. Освен това тази замяна е докладвана в някои популации с твърде висока за мутация честота [<http://www.lovd.nl>; Chen, 2011]. За съжаление родителите на пробанда отказаха да участват в настоящото проучване, възпрепятствайки установяване на броя засегнати алелни копия, т.е. дали двете замени са в cis- (на едното копие на гена) или в trans- конфигурация (на две различни копия) при пробанда.

#### 4.2.2.5. Семейства 6 и 7

##### Клинична картина

В семейство 6 засегнатият индивид е 4 годишно момче с мускулна скованост, която се облекчава след многократни съкращения на мускулите, данни за миотонични залпове от ЕМГ, перкусионна миотония, прогресия на болката в мускулите и сковаността във времето, генерализирана хипертрофия на мускулите на крайниците и тялото, без наличие на мускулна слабост.

Семейство 7 е насочено за молекулярно-генетичен анализ на базата на клиничната картина на дете от мъжки пол, изявило първите си симптоми на 2 годишна възраст. Оплакванията се състоят в болезнени крампи, нарушена деконтракция, придружени от атлетично телосложение. Семейството е от български произход – от гр. Бургас. В семейството има още едно дете с невромускулна симптоматика – по-малък брат (на 2 години по време на извършване на молекулярно-генетичния анализ на брат му). Наблюдава се значителна мускулна хипертрофия. Клиничната картина при него

обаче остава доста неясна и несъответстваща на характерната за миотония конгенита тип Бекер.

### Молекулярно-генетичен анализ

За съжаление както при семейство 6, така и при семейство 7 секвениране на *CLCN1* гена не доведе до откриване на патологични изменения, които биха могли да обяснят клиничната картина. От семейство 7 беше изследван само по-големият брат, тъй като фенотипната изява на по-малкия не предполагаше голяма вероятност за установяване на мутации в този ген.

#### 4.2.2.6. Семейство 8

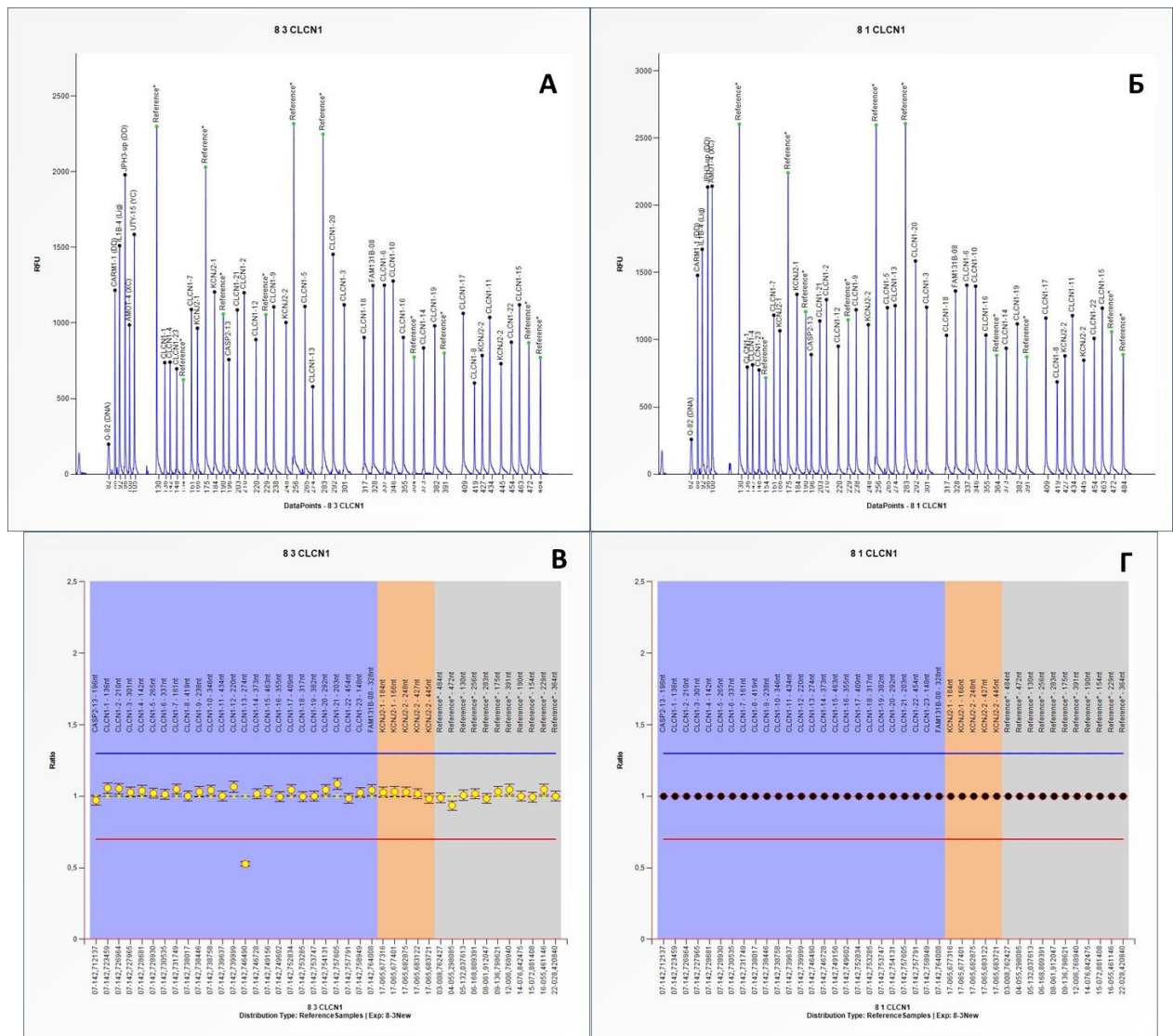
##### Клинична картина

Семейство 8 представляваше също интересен случай за екипа ни. Насочени са за генетичен анализ поради фенотипна изява, кореспондираща с диагноза миотония конгенита, на едното от двете деца в семейството. Пациентът е от мъжки пол, като първите оплаквания започват след прохождение – лесна уморяемост, тромава походка, трудно раздвижване след състояние на покой, болки в ингвиналната област след изправяне от седнало положение, без влошаване от студ и физически упражнения. При иглена ЕМГ на *m. tibialis anterior* са регистрирани високочестотни залпове от 40-150 Hz и продължителност от няколко секунди, с характеристика на миотонични феномени. При майката и бащата не са установени клинични и ЕМГ данни за миотония конгенита.

Пациентът има сестра със сериозни фенотипни прояви, които обаче не отговарят на диагноза миотония конгенита. Тя е с анамнеза за тежко изоставане в психомоторното развитие, с аутистични елементи в поведението и епилептични прояви (хемиклонични епилептични статуси при фебрилитет и впоследствие многократни краткотрайни пристъпи с клоничен характер).

## Молекулярно-генетичен анализ

При пациента от това семейство беше открита мутация в 13 екзон на *CLCN1* гена – с.1436\_1449delTACCCTGCGGAGGC, p.Pro480HisfsTer24. Хетерозиготното носителство на този патологичен вариант най-напред беше установено чрез MLPA анализ (Фигура 32), след което за потвърждаване и точно определяне на границите на делецията беше извършено и секвениране по Sanger (Фигура 33).

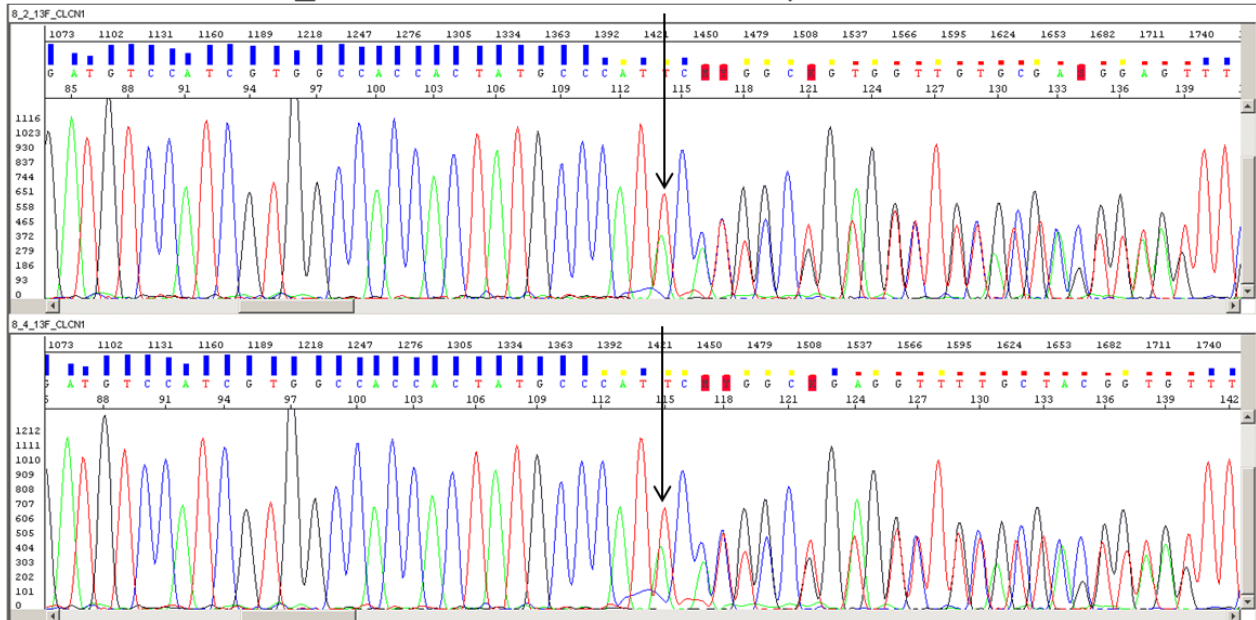


**Фигура 32. MLPA профил при детето от семейство 8.** В сравнение със здрава контрола при пациента се наблюдава делеция на 13 екзон от *CLCN1* гена. А и Б. Електрофоретичен профил при пациента и контролата съответно. В и Г. Обработени данни със специализиран софтуер отново при пациента и контролата [Coffalyser.Net - <https://coffalyser.wordpress.com/>].

Мутацията представлява делеция на 14 нуклеотида, водеща до изместване на рамката на четене и преждевременно прекратяване на белтъчния синтез. Публикувана

е в световната литература и е втората по честота при пациенти с рецесивна форма миотония конгенита от чешки произход [Skálová *et al.*, 2013]. Освен това беше изследвана и сестрата на пациента, която също се оказва носител на делецията в екзон 13 в хетерозиготно състояние.

### с.1436\_1449delTACCCTGCGGAGGC, p.Pro480HisfsTer24



**Фигура 33. Секвенционен профил на *CLCN1* гена при семейство 8. Представен е участък от 13 екзон в района на с.1436\_1449delTACCCTGCGGAGGC, p.Pro480HisfsTer24 мутацията.**

Тъй като мутацията p.Pro480HisfsTer24 е докладвана при пациенти с рецесивна форма миотония конгенита, беше необходимо да бъде идентифициран и втори дефект в *CLCN1* гена при пациента. Семейството произлиза от област Гоце Делчев и по-конкретно от вече познатото от семейство 2 с. Брезница. Това предположи като първа стъпка на молекулярно генетичните изследвания, проведени от нашия екип, да бъде извършен секвенционен анализ на екзон 7 и по-конкретно да се провери носителския статус на пациента от това семейство по отношение на мутацията, причиняваща заболяването при семейство 2, а именно - с. 817G>A, p.Val273Met. Резултатите потвърдиха наличието на missense замяната и при този пациент, навеждайки ни на мисълта за евентуална родствена връзка между семейства 2 и 8. Членовете на тези семейства отричат наличието на такава. Установен беше и носителския статус на двамата асимптоматични родители – делецията p.Pro480HisfsTer24 е унаследена от бащата, а с. 817G>A, p.Val273Met от майката.

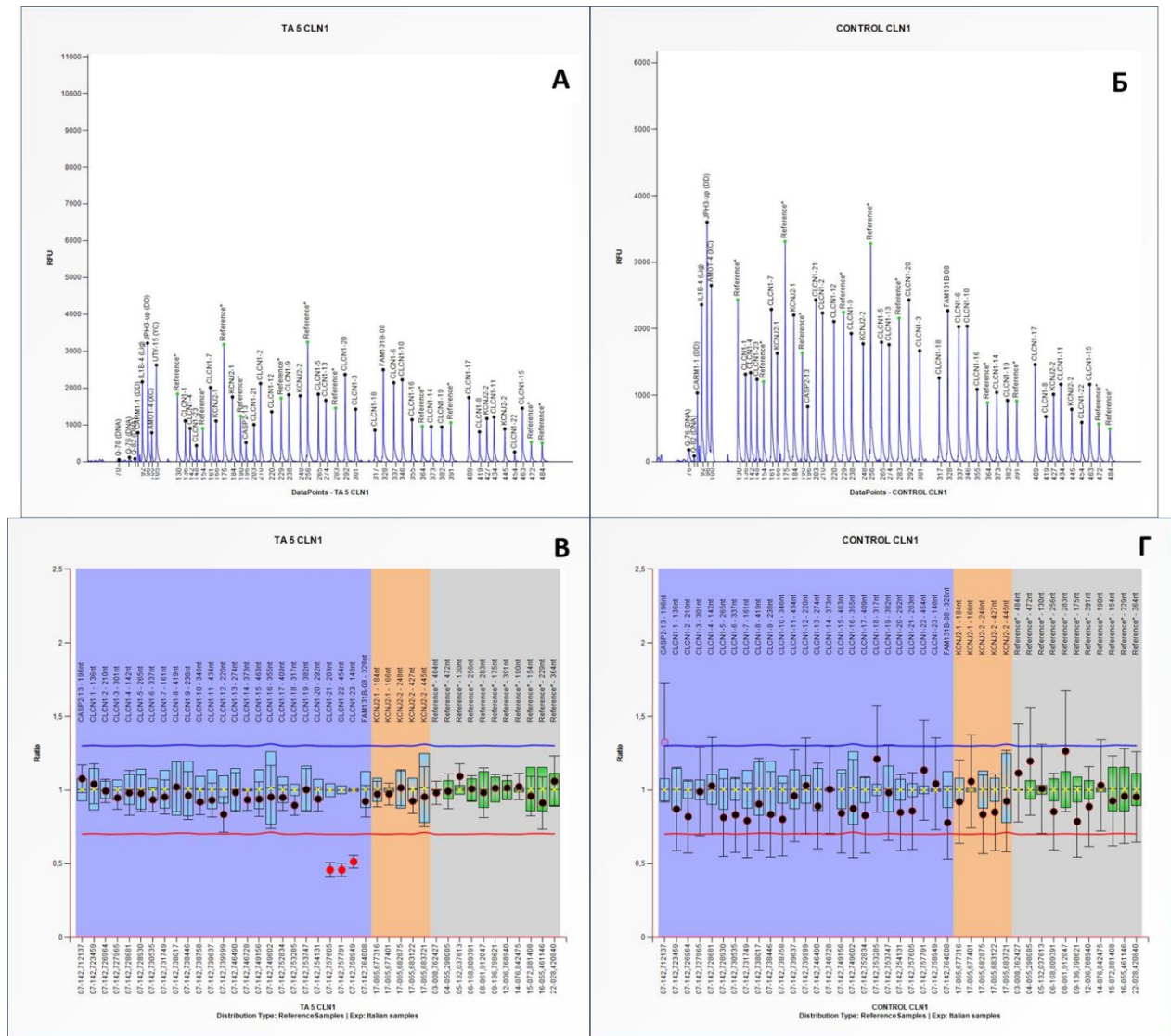
#### 4.2.2.7. Семейство 9

##### Клинична картина

Семейство 9 е единственото семейство, включено в дадения труд, което е от италиански произход. Представено е само от засегнато дете от мъжки пол с изява на типична симптоматика за миотония конгенита още в ранна детска възраст: мускулна скованост с облекчаване след раздвижване, хипертрофия на мускулите на крайниците, налични са ЕМГ данни за миотония. Очаква се в най-скоро време да бъде предоставен материал и от родителите за извършване на генетичен анализ, като и двамата са фенотипно здрави. Това семейство е предоставено на нашия екип от сътрудници в Италия.

##### Молекулярно-генетичен анализ

Предварително в лаборатория в Рим, Италия чрез секвениране на *CLCN1* гена е била открита само една замяна при детето – с.1444G>A, p.Gly482Arg. Тази точкова мутация е наблюдавана многократно при пациенти с диагноза миотония конгенита тип Бекер от най-различен произход. Използваният метод (секвениране по Sanger) обаче има определени технологични ограничения - позволява детекция на малки изменения в даден ген, т.е. точкови замени, малки делеции и дупликации (от няколко базови двойки - до няколко десетки базови двойки), но не и големи дефекти. Липсата на втора мутация при секвениране предполага преминаване към втора стъпка от молекулярно-генетичния анализ. При пациента беше извършен MLPA-анализ, с помощта на който могат да бъдат установени и големи преустройства, засягащи цели екзони или дори целия ген (Фигура 34). Установихме носителство на делеция, обхващаща 3 екзона (21, 22 и 23) от *CLCN1* гена: с.(2490+1\_2490-1)\_(3054+?). Наличие на две патогенни замени в *CLCN1* гена потвърждава на генетично ниво диагноза автозомно рецесивна миотония конгенита тип Бекер. За момента не може да бъде установено, коя мутация от кой родител е унаследена. Определянето на носителския им статус е обект на бъдещи изследвания на екипа, след набавяне на проби от двамата родители.



**Фигура 34.** MLPA профил при детето от семейство 9. В сравнение със здрава контрола при пациента се наблюдава делеция на 21, 22 и 23 екзон от *CLN1* гена. А и Б. Електрофоретичен профил при пациента и здрава контрола съответно. В и Г. Обработени данни със специализиран софтуер отново при пациента и контролата[Coffalyser.Net - <https://coffalyser.wordpress.com/>].

#### 4.2.2.8. Молекулярно-генетичен анализ на *SCN4A* гена

При две от семействата, включени в дадения труд, не бяха открити патологични изменения в гена *CLN1*. Като втора стъпка при тях нашият екип извърши секвениране и на още един ген - *SCN4A*. Както е споменато в литературния обзор, дефекти в него са докладвани при пациенти с миотония конгенита тип Томпсън. Доминантното унаследяване на това заболяване обаче е причината генетичният анализ на *SCN4A* гена да не е обект на дадената дисертация. Все пак с цел изясняване на диагнозата при тези две семейства, можем да споменем, че резултатите отново бяха отрицателни. Не бяха

открити замени и в *SCN4A* гена, които биха могли да обяснят фенотипната изява при тези пациенти, предполагайки необходимостта от преразглеждане на клиничната диагноза.

При семейство 5 откритият *CLCN1* дефект не е публикуван до момента в световната литература. С цел потвърждаване, че този нов вариант наистина е мутацията, отговорна за изява на заболяването, беше необходимо да бъде изключена възможността да са налични мутации в други гени, водещи до развитие на миотония конгенита. Съответно при пациента от това семейство също секвенирахме гена *SCN4A*. Доминантният модел на унаследяване на *SCN4A* би съответствал на родословието. Все пак не открихме патологични изменения в кодиращите части на целия *SCN4A* ген, което потвърждава, че наистина новата р.Тур524Сус замяна причинява клиничната картина при пациента.

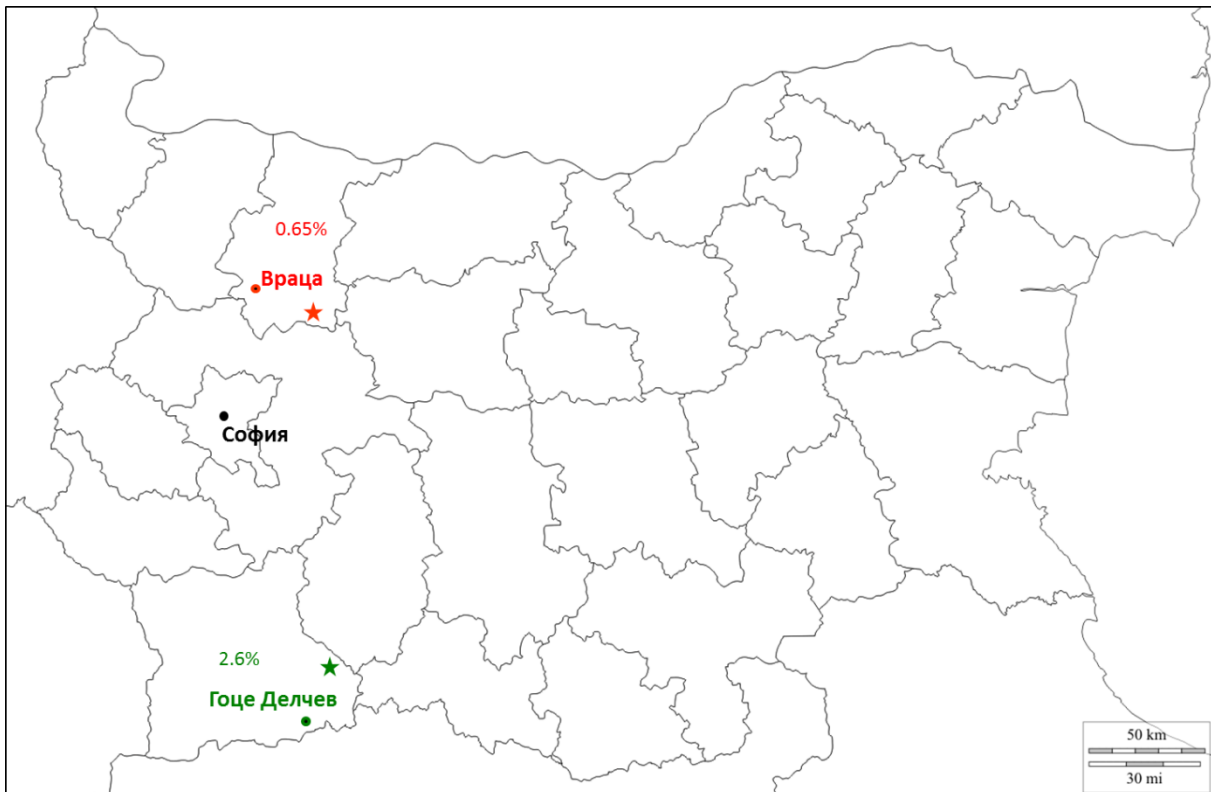
#### 4.2.3. Заключение

В рамките на настоящия труд е извършено молекулярно генетично охарактеризиране на пациенти с диагноза миотония конгенита тип Бекер. За България това е първото по рода си проучване за това заболяване. При седем от деветте изследвани семейства клинично поставената диагноза беше потвърдена чрез секвениране или MLPA-анализ на *CLCN1* гена (7/9 = 78%). Идентифициране на мутацията, причиняваща фенотипната изява, позволява проследяване на дефекта в семейството, дори и пренатално, както беше извършено при семейство 3. Splice-site замяната с.1471+1G>A се очертава като най-честият дефект в *CLCN1* гена за българската популация. При две от семействата заболяването се дължи на мутация в хомозиготно състояние. При две от семействата за съжаление дори и след молекулярно-генетичен анализ на гена *SCN4A* не бяха идентифицирани замени, които биха могли да обяснят наличната клинична картина. При тях се предполага необходимост от преразглеждане на така поставената диагноза.

#### 4.3. Скрининг на два предполагаеми ендемични региона за миотония конгенита тип Бекер

От всички изследвани семейства за миотония конгенита тип Бекер по-специално внимание трябва да бъде обърнато на семейства 3 и 5. Те са представени от значително по-голям брой засегнати индивиди, които освен това са носители на мутации в хомозиготно състояние. Тези особености са в основата на хипотезата за потенциално съществуване на два ендемични региона за това заболяване в България (Фигура 35):

1. Северозападна България – област Мездра (засегнато семейство от с. Лик)
2. Югозападна България – област Гоце Делчев (засегнато семейство от с. Брезница).



**Фигура 35. Предполагаеми ендемични региони в България за миотония конгенита тип Бекер.** Двете села, от които произхождат семейства 3 и 5, са отбелязани на картата със звездички.

За проверка на формулираната хипотеза в хода на работа беше извършен скрининг на здрави новородени деца от всеки от двата потенциални ендемични региона: 116 от регион Гоце Делчев и 154 от регион Мездра. За регион Гоце Делчев от

интерес е мутацията с.817G>A, p.Val273Met (в екзон 7 на *CLCN1* гена), тъй като тя беше открита при представителите на семейството от с. Брезница. Съответно всички лица от тази област бяха тествани само за тази мутация: p.Val273Met. С цел определяне на носителския статус на лицата от регион Мездра беше необходимо да бъде секвениран екзон 14 на *CLCN1* гена, тъй като в него се намира мутацията с.1571A>G, p.Tyr524Cys, която съответно беше открита при семейството от с. Лик. В хода на проучването по отношение на потенциалните ендемични региони бяха изследвани също така и здрави контроли от цяла България: 107 за p.Tyr524Cys и 107 за p.Val273Met.

#### 4.3.1. Скрининг на регион Мездра

Присъствието на засегнати индивиди както във вертикално, така и в хоризонтално направление в родословието на семейство 5 (по данни на пациента) наподобява доминантен модел на унаследяване на заболяването. Резултатите от молекулярно-генетичните тестове обаче показваха рецесивно унаследяваща се патология – пациентът е носител на мутации и в двете си копия на *CLCN1* гена, при това двете мутации са еднакви (хомозиготен носител на с.1571A>G, p.Tyr524Cys). Възможно обяснение за това псевдодоминантно унаследяване биха могли да бъдат, или близкородствени бракове, или висока носителска честота за p.Tyr524Cys в тази субпопулация от населението. Семейство 5 е от български произход. За местните традиции и култура не са характерни бракове между близкородствени индивиди, което предполага като по-вероятно обяснение за хомозиготността на засегнатите лица висока носителска честота в дадения регион по отношение на мутацията p.Tyr524Cys. На базата на тази обосновка е извършен мутационен скрининг в този регион на България – 154 новородени са тествани за дадената замяна. За извършване на скрининга са използвани филтърни бланки, набавяни за целите на неонаталния скрининг. След амплификация директното секвениране по Sanger на екзон 14 от *CLCN1* гена доведе до откриване на един хетерозиготен носител на p.Tyr524Cys мутацията, което представлява значителна носителска честота в тази субпопулация на България – около 0.65% (1/154) (Фигура 36).



**Фигура 36.** Резултати от мутационния скрининг в регион Мездра по отношение на мутация p.Tyr524Cys. Установена е значителна носителска честота – 0.65%.

#### 4.3.2. Скрининг на регион Гоце Делчев

Вторият интересен от популационна гледна точка регион се оказва в югоизточна България – по-конкретно област Гоце Делчев. Семейство 3 произхожда от с. Брезница, намиращо се в тази част на България. В това семейство от българо-турски произход бяха диагностицирани 3 хомозиготни засегнати и 5 хетерозиготни фенотипно здрави индивиди по отношение на мутацията c.817G>A, p.Val273Met. Родителите отхвърлят възможността за родствена връзка между тях, но при тази субпопулация традиционно често се извършват ендогамни бракове. За изясняване на обстоятелствата на възникване на толкова голям брой носители в едно семейство извършихме мутационен скрининг при 116 здрави новородени лица от този регион, всички от българо-турски произход (самоопределящи се като такива). Изследването отново беше проведено върху материал от филтърни бланки. За наше най-голямо учудване молекулярно-генетичните тестове показаха още по-висока носителска честота и от тази за p.Tyr524Cys. Открихме 3 хетерозиготни носители на c.817G>A, p.Val273Met мутацията, което отговаря на носителска честота около 2.59% (3/116) – Фигура 37. Първоначалната хипотеза на нашия екип предполагаше, че близкородствени бракове са причината за големия брой засегнати членове на семейство 3. В хода на настоящото изследване обаче беше установена неочаквано висока носителска честота сред конкретната субпопулация от

региона на Гоце Делчев, на базата на което изходното предположение най-вероятно следва да бъде отхвърлено. Наличието на ендогамни бракове може би просто допълнително увеличава и високия брой засегнати лица в този регион.



**Фигура 37. Резултати от мутационния скрининг в регион Гоце Делчев по отношение на мутация p.Val273Met.** Установена е много висока носителска честота – 2.59%.

В световен мащаб тази мутация е докладвана само веднъж – при един италиански пациент. Това поставя въпроса, дали по отношение на тази генетична замяна може да се говори за ефект на прародителя, т.е. дали както италианският пациент, така и индивидите от областта на Гоце Делчев биха могли да бъдат с общ произход и съответно отваря врата към потенциални бъдещи проучвания (хаплотипен анализ).

#### 4.3.3. Заключение

В хода на настоящото проучване беше поставена хипотеза за два потенциални ендемични региона в България по отношение миотония конгенита тип Бекер. По конкретно предположихме висока носителска честота на мутация p.Tyr524Cys в северозападна България (регион Мездра) и на мутация p.Val273Met в югозападна България – регион Гоце Делчев. Хипотезата беше формулирана с цел обяснение на високия брой хомозиготни индивиди в семейства 2 и 5. Проведеният впоследствие скрининг за p.Tyr524Cys и p.Val273Met мутациите наистина показва неочаквано висока честота на хетерозиготно носителство в двете по-горе споменати области. Това познание

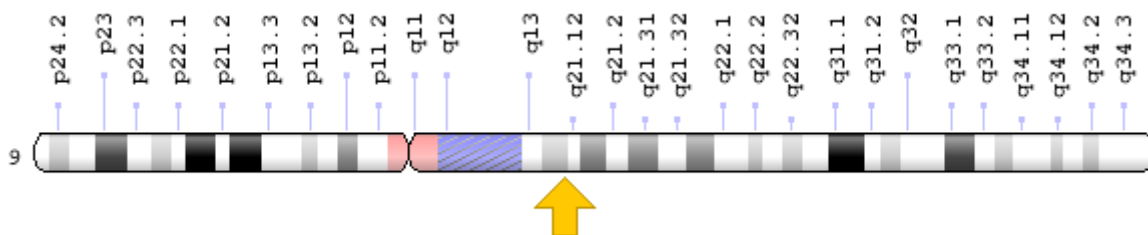
е от изключително голямо значение за практиката. Познаване на генетичните особености на дадена субпопулация прави възможно провеждане на адекватна генетична консултация в хода на семейно планиране на населяващото я население. От теоретична гледна точка настоящото изследване обогатява познанията за генетичния фонд на българската популация и естествено формиращите се в нея подгрупи.

#### 4.4. Две автозомно рецесивни невромускулни заболявания в едно семейство

Както вече споменахме в литературния обзор поради скрития характер на автозомно рецесивните заболявания носителите им могат дълго време да останат неразпознати. По този начин дори е възможно да се комбинират повече на брой редки заболявания в едно семейство. Такъв интересен случай е фамилия от български произход, в която има засегнати индивиди от две различни рецесивни невромускулни заболявания – Атаксия на Фридрайх (Friedreich ataxia, FRDA) и мускулна дистрофия пояско-крайник тип 2А (Калпаинопатия, Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2A, LGMD2A).

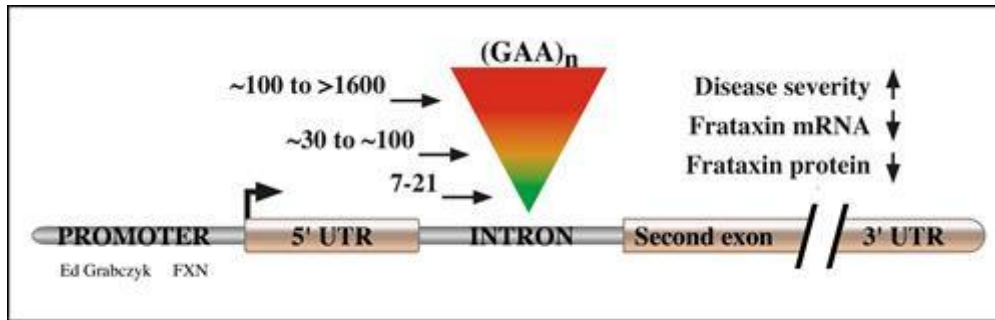
##### 4.4.1. Атаксия на Фридрайх

Атаксия на Фридрайх (MIM 229300) е автозомно рецесивна форма на атаксия, която се характеризира основно с дизартрия, мускулна слабост и спастичност на долните крайници. Представлява прогресивно увреждане на нервната система, водещо до нарушения в походката и говора. Началото на заболяването настъпва обикновено преди края на пубертета [Friedreich, 1863]. Причинява се от мутации в *FXN* гена (MIM 606829), локализиран на 9q21.11 (Фигура 38).



**Фигура 38.** Локализация на *FXN* гена върху 9-та хромозома (9q21.11) [<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/FXN>].

Обичайно заболяването се асоциира с нестабилен GAA тринуклеотиден повтор в интрон 1 на гена (Фигура 39). Хомозиготна GAA експанзия се открива при 98% от случаите на FRDA. В световен мащаб едва 2% от пациентите с Атаксия на Фридрайх са носители на точкова мутация, винаги в хетерозиготно състояние с GAA експанзия на другия алел [Campuzano *et al.*, 1996].



Фигура 39. Структура на *FXN* гена и *GAA* експанзията в интрон 1 – нормални и патологични варианти [www.medschool.lsuhs.edu].

#### 4.4.2. Мускулна дистрофия пояс-крайник тип 2A (Калпаинопатия)

Мускулна дистрофия пояс-крайник тип 2A (MIM 253600) е друго автозомно рецесивно невромускулно заболяване, изявяващо се с прогресивна проксимална (пояс-крайник) мускулна слабост. Началото на заболяването може да варира значително при различните семейства и дори при различните членове на едно семейство. Калпаинопатията се дължи на мутации в *CAPN3* гена (MIM 114240), локализиран на 15q15.1 [Beckmann *et al.*, 1991]. Разположението му е представено на Фигура 40.



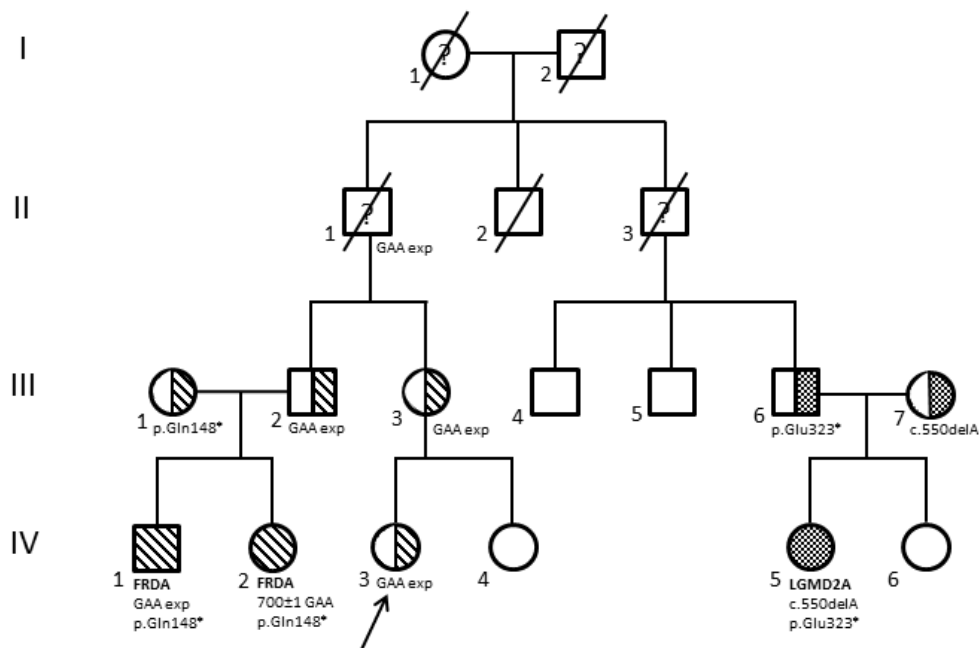
Фигура 40. Локализация на *CAPN3* гена върху 15-та хромозома (15q15.1) [https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CAPN3].

#### 4.4.3. Родословие на таргетното семейство и клинична картина

В контекста на автозомно рецесивните невромускулни заболявания специално внимание заслужава семейство с две деца с клинична диагноза Атаксия на Фридрайх – момче на 16 години по време на извършване на молекулярно-генетичния тест, все още подвижен, но със сериозни затруднения при ходене, и момиче на 18 години, вече в инвалидна количка. И при двете деца се наблюдава типичната клинична картина за Атаксия на Фридрайх, с начало на заболяването преди пубертета. Първите симптоми,

които съобщават двамата пациенти са нарушен баланс при ходене и завален говор. Прогресията на заболяването при пациентите е довела до изява и на други усложнения: дизартрия и мускулна слабост на бедрените екстензори и абдуктори, последвана от дистална слабост на мускулите на крайниците и отслабване, все по-ясно изразена скованост на долните крайници.

Семейството предизвика специалния интерес на нашия екип, тъй като в същото родословие се наблюдава още едно автозомно рецесивно невромускулно заболяване – мускулна дистрофия пояс-крайник тип 2А. Фигура 41 илюстрира родословното дърво и засегнатите от двете заболявания индивиди. FRDA засегнатите индивиди (IV-1 и IV-2) и LGMD2A пациентът (IV-5) са втори братовчеди. Пациентът IV-5 е на 15 годишна възраст по време на извършване на молекулярно-генетичния анализ, от женски пол, с типична клинична картина за LGMD2A: проксимална слабост, слабост на горен крайник и раменен пояс, тежки контрактури и гръбначни изкривявания.



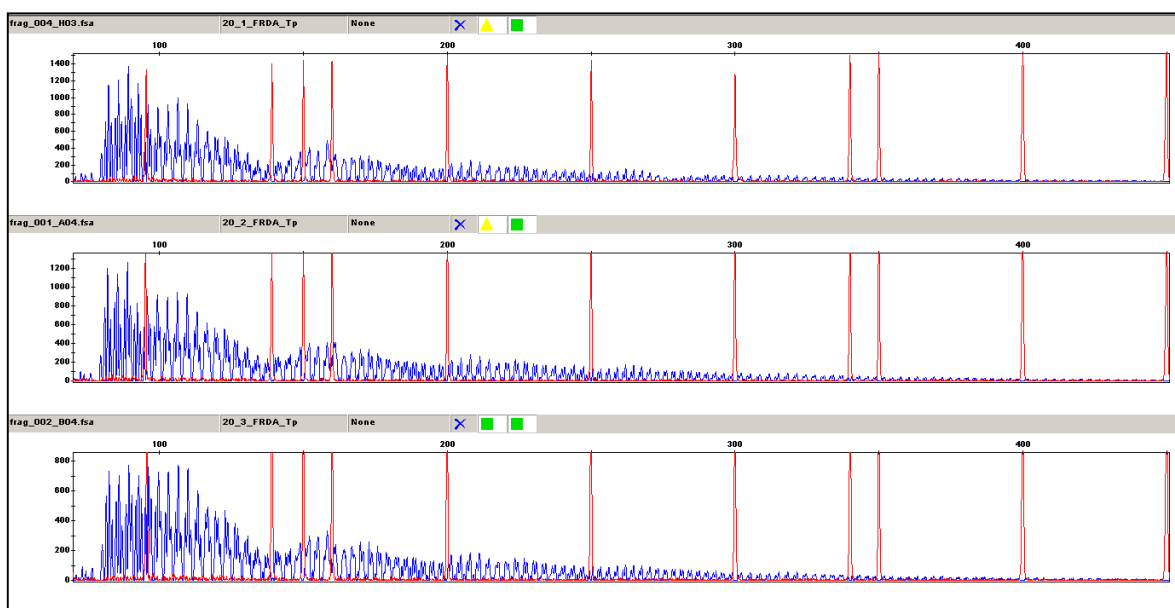
**Фигура 41. Родословно дърво на семейството с две автозомно рецесивни невромускулни заболявания.** Използвани са следните символи: Квадрат - индивид от мъжки пол, кръг – индивид от женски пол, празен символ – здрав индивид, раиран – FRDA засегнат индивид, на половина раиран – носител на FRDA, точкуван символ – LGMD2A засегнат индивид, на половина точкуван – LGMD2A носител; индивидите с неясен генотип са представени с въпросителен знак. Пробандът е отбелязан със стрелка.

Първоначалната среща на нашия екип с това семейство беше осъществена чрез здрав родственик на представените пациенти – IV-3, на 31 годишна възраст, от женски

пол, в контекста на генетично консултиране по повод семейно планиране. Тя е първа братовчедка на FRDA засегнатите членове (IV-1, IV-2) и втора братовчедка на LGMD2A засегнатия член (IV-5) на семейството. Индивидите, засегнати от двете заболявания, са част от разширено родословие, но произхождат от две отделни нуклеарни семейства.

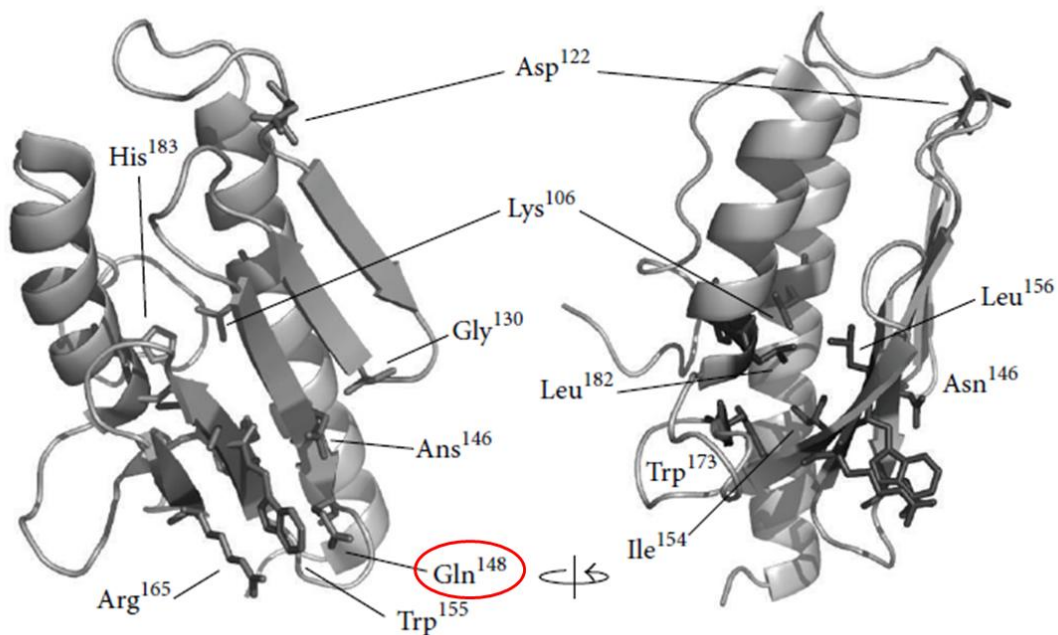
#### 4.4.4. Молекулярно-генетичен анализ

Общо от това родословие на генетичен анализ бяха подложени 6 души, съответно за различни гени в зависимост от клиничната диагноза и преките засегнати родственици. Молекулярно-генетичният анализ при FRDA пациентите (IV-1, IV-2) показва, че и двамата са носители на GAA експанзията в интрон 1, която обичайно се свързва с тази клинична диагноза. Пациентите обаче са носители на експанзията в хетерозиготно състояние, а вторият дефект в *FXN* гена при тях представлява точкова замяна – nonsense мутация с.442C>T, p.Gln148\*. При сестрата посредством метода Southern blot (в колаборация с чуждестранна лаборатория) е установена експанзия с размер  $700 \pm 1$  GAA повтора. Молекулярно-генетичният анализ на брата беше извършен изцяло от нашия екип. Използваният метод TP-PCR позволи потвърждаване на наличие на експандирал алел при него (>66 GAA повтора), макар и да не дава възможност за определяне на точния размер на експанзията (Фигура 42).



Фигура 42. Електрофореграма на TP-PCR, показваща наличие на GAA експанзия в интрон 1 на *FXN* гена.

При едва 2 % от FRDA пациентите заболяването се дължи на носителство на хетерозиготна GAA експанзия в *FXN* гена в комбинация с точкова мутация в същия ген [Camruzano, 1996]. Това семейство е първият докладван случай на български пациент с атаксия на Фридрайх с *FXN* точкова мутация. За значимостта на случая допринася и фактът, че откритата при дадените пациенти nonsense мутация с.442C>T, p.Gln148\* не е публикувана до момента в световната литература. Приехме тази замяна за патогенна, тъй като тя води до преждевременно формиране на стоп кодон. Така получените по-къси белтъчни фрагменти обикновено се разпознават от клетката като нефункционални и се разграждат по път, наречен nonsense-mediated decay. Дори и да не бъде разграден, полученият при наличие на p.Gln148\* фрагмент е много съществено скъсен и не би могъл да осъществява обичайните функции на фратаксина. На позиция 148 е докладвана дори missense замяна с патогенен ефект - p.Gln148Arg [Gomes *et al.*, 2013].

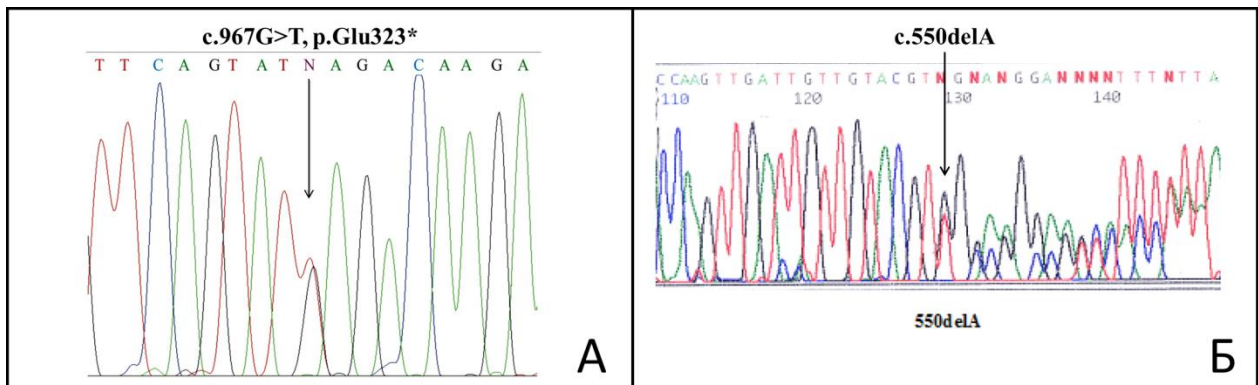


**Фигура 43. Структура на фратаксин** [Gomes *et al.*, 2013]. Отбелязана е позицията, на която се формира преждевременен стоп-кодон при с.442C>T, p.Gln148\*.

Глутаминът на 148 позиция е повърхностно ориентиран и попада в петия  $\beta$ -лист от структурата на белтъка. Патогенният ефект на вече докладваната missense замяна най-вероятно се дължи на нарушена стабилизация на цялостната белтъчна молекула [Gomes *et al.*, 2013]. Фактът, че дори замяна на една аминокиселина с друга води до фенотипна

изява на атаксия на Фридрайх, още веднъж потвърждава вероятно патогенния ефект на p.Gln148\* (Фигура 43).

При пациентката с мускулна дистрофия пояс-крайник тип 2А беше проведено секвениране на екзони 4 и 7 на *CAPN3* гена, тъй като в тях са разположени 50% от мутациите при български пациенти [Todorova *et al.*, 2007]. Резултатите от така извършеното изследване показаха хетерозиготно носителство на две тежки инактивиращи мутации: c.550delA, p.Thr184Argfs в екзон 4, унаследена от майката на пациентката (III-7) и c.967G>T, p.Glu323\* в екзон 7 на *CAPN3* гена, унаследена от бащата (III-6). Секвенционните профили са показани на Фигура 44. Тези две мутации са най-честите *CAPN3* дефекти за българската популация [Todorova *et al.*, 2007].



**Фигура 44.** Секвенционен профил на част от *CAPN3* гена в областта на А. c.967G>T, p.Glu323\*; Б. c.550delA, p.Thr184Argfs) мутацията.

Родственичката (IV-3), благодарение на която бяха извършени всички изследвания в семейството, беше скринирана за фамилните мутации, както в *FXN*, така и в *CAPN3* гена. Чрез TP-PCR установихме, че тя е носител на хетерозиготна GAA експанзия в *FXN* гена, но не и на точковата замяна и съответно е клинично здрава. По отношение на *LGMD2A* се оказа, че не е носител на нито една от семейните мутации в *CAPN3* гена. От нейния *FXN* генотип, както и от този на пациенти IV-1, IV-2 (носители на GAA експанзията) може да се направи заключението, че както майката на родственичката (IV-3), така и бащата на FRDA пациентите са носители на GAA експанзията. Извършването на генетични изследвания при тях не беше възможно, поради нежеланието им да вземат участие в настоящото проучване. Екипът ни изследва *LGMD2A* пациентката за GAA експанзията и тя се оказа негативна по отношение на този дефект, което възпрепятства определяне на носителския статус на II-1 и II-3. Не беше

възможно да се стигне до извод дали II-1 и II-3 са носители на GAA експанзия в *FXN* гена заедно със семейната p.Glu323\* мутация в *CAPN3* гена и дали тези два генетични дефекта са произлезли от една родителска двойка (I-1 и I-2). За съжаление не е възможно по-нататъшно проследяване на патологичните варианти в това семейство.

#### 4.4.5. Заключение

В световен мащаб са докладвани много малко случаи на повече от едно рядко наследствено заболяване в едно родословие. За българската популация е публикуван случай на семейство с три генетични заболявания - Чуплива X хромозома (FraX, MIM 300624), Мускулна дистрофия на Дюшен (DMD, MIM 310200) и X-свързана ихтиоза (XLI, MIM 308100) [Todorova *et al.*, 2013]. Всички те обаче се причиняват от дефекти, засягащи локуси на X-хромозомата [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]. Семейството, обект на настоящия труд е първият български случай на семейство с две различни неврологични заболявания, причинени от мутации в гени, разположени на различни хромозоми и сегрегиращи независимо в родословието. И двете неврологични заболявания спадат към групата на редките болести с честота от около 1:29 000 [Hurst *et al.*, 2013] за FRDA и 1:100 000 за калпаинопатията [<http://www.medscape.com/>], за България има докладвани едва 24 случая на калпаинопатия [Тончева и сътр., 2014]. В дадения случай двете патологични състояния се дължат на хетерозиготно носителство на различни дефекти, а не на хомозиготни мутации, често унаследяващи се от засегнатите индивиди в резултат на близкородствени бракове или поради висока честота на дадената мутация в популацията. Наличието на 4 различни мутации, водещи до преждевременно прекратяване на протеиновата синтеза, в едно единствено семейство илюстрира високата хетерогенност на българската популация. Събирането на тези 4 дефекта в едно семейство е възможно именно поради скрития характер на автозомно рецесивните заболявания. Както виждаме и в конкретния случай, те могат да останат неизявени много поколения наред, до момент, в който се съберат две мутации в един и същ ген у един вече фенотипно засегнат индивид.

#### 4.5. ОБОБЩЕНИЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящият дисертационен труд е посветен на неврогенетиката, раздел от биологичната наука с много ясно практическо значение. Разработката включва охарактеризиране на молекулярно генетично ниво на по едно наследствено заболяване от две големи групи неврологични заболявания: пиридоксин зависима епилепсия от групата на епилептичните енцефалопатии и миотония конгенита тип Бекер като представител на невромускулните заболявания. Настоящото проучване има пилотна роля по отношение на въвеждане на молекулярно генетична диагностика за тези две заболявания в България. Нашият екип приложи модерни, но същевременно и утвърдени за диагностична цел методи с цел идентификация на патогенните варианти в наследствената информация, причиняващи клиничната картина на засегнатите индивиди. По този начин при 2 от семействата, изследвани за мутации в гена *ALDH7A1*, беше потвърдена на генетично ниво клиничната диагноза ПЗЕ. При останалите пациенти като втора стъпка изследвахме *PNPO* гена, асоцииран с друго фенотипно близко заболяване – пиридоксал 5'-фосфат зависима епилепсия, но не бяха открити патологични изменения. Следователно при тези пациенти най-вероятно е удачно да бъде преразгледана диагнозата. Беше идентифицирана нова непубликувана до момента мутация в *ALDH7A1* гена, при това от най-рядко докладваните за този ген тип – делеция, водеща до изместване на рамката на четене и вероятно водеща до сериозни нарушения във функцията на белтъка.

При извършване на молекулярно генетичен анализ на *CLCN1* гена чрез секвениране по Sanger и MLPA анализ при 7 от изследваните семейства беше установена генетичната причина за развитие на заболяването. Две от семействата се оказаха от специален интерес за екипа ни, тъй като бяха представени от повече на брой засегнати индивиди, при това носители на *CLCN1* мутации в хомозиготно състояние. На базата на това беше проведен скрининг на два потенциални ендемични региона в България – съответно регионите, от които произлизат двете семейства. Новородени от област Мездра бяха изследвани за носителство на с.1571A>G, р.Tyr524Cys – непубликувана до момента мутация в световен мащаб. Носителският статус на лица от регион Гоце Делчев

беше определен по отношение на с.817G>A, р.Val273Met. И при двете групи беше отчетена неочаквано висока носителска честота, съответно 0.65% за с.1571A>G, р.Tyr524Cys (Мездра) и 2.59% за с.817G>A, р.Val273Met (Гоце Делчев). Охарактеризирането на субпопулации на територията на България носи изключително важна информация от чисто научна гледна точка за обогатяване на познанията за генофонда на българската популация, но има и висока практическа стойност във връзка с генетично консултиране.

Както вече многократно беше споменато и двете заболявания спадат към т. нар. редки болести, т.е. това са заболявания с честота под 1:2000 души. Интересът към тях обаче се поражда от факта, че взети заедно всички редки заболявания всъщност са много сериозен здравен проблем за човечеството. Търсене на общите щрихи в невероятна разнородната група на редките болести ни навежда към унаследяването им – както пиридоксин зависимата епилепсия, така и миотония конгенита тип Бекер са автозомно рецесивни заболявания, т.е. проявяват се едва при събиране на два дефекта в един и същ ген. Това обуславя свойството на автозомно рецесивните наследствени заболявания дълго време да остават „скрити“. По този начин дори може в рамките на едно единствено семейство да се съберат две различни редки невромускулни заболявания, както например в разгледаното семейство с членове, засегнати от атаксия на Фридрайх и калпаинопатия. Именно скритият им характер поражда основния интерес към тези наследствени болести и ни насочва към традиционния смисъл на генетиката – идентификация на наследствения фактор, причиняващ заболяването, и превенция за бъдещите поколения.

## 5. ИЗВОДИ

5.1. Прилагане на въведения молекулярно генетичен подход за идентификация на патологични замени в *ALDH7A1* гена е подходящо при пациенти с поставена клинична диагноза пиридоксин зависима епилепсия, тъй като доведе до изясняване на значителен дял (37.5%) от пациентите в тази група.

5.2. Българската популация се характеризира с множество уникални генетични характеристики, за което свидетелства новооткритата мутация в *ALDH7A1* гена, при това от най-рядко докладваните в световен мащаб за този ген тип мутации, а именно делеция.

5.4. Прилагане на въведения молекулярно генетичен подход за идентификация на патологични замени в *CLCN1* гена е подходящо при пациенти с поставена клинична диагноза миотония конгенита тип Бекер, тъй като доведе до изясняване на значителен дял (78%) от пациентите в тази група. Тези данни предполагат и много прецизно подбрана пациентска група.

5.5. Вероятно като цяло за българската популация най-честият дефект в *CLCN1* гена е splice-site замяната с.1471+1G>A, която в хода на настоящата разработка беше открита при три от изследваните семейства с диагноза миотония конгенита тип Бекер.

5.6. Българската популация се характеризира с множество ендемични генетични характеристики, за което свидетелства откритата непубликувана в световен мащаб мутация дори в добре проучен ген като *CLCN1* - с.1571A>G, р.Tyr524Cys.

5.7. В България се оформят два ендемични региона за миотония конгенита тип Бекер със значителна носителска честота съответно за с.1571A>G, р.Tyr524Cys в региона на Мездра (0.65%) и за с.817G>A, р.Val273Met в региона на Гоце Делчев (2.59%).

5.8. Поради скрития характер на автозомно рецесивните заболявания е възможно в едно семейство да се съберат дори две различни редки невромускулни заболявания, както в случая атаксия на Фридрайх и Калпаинопатия. Четирите различни дефекта, причиняващи тези две заболявания, илюстрира високата хетерогенност на българската популация.

## 6. БИБЛИОГРАФИЯ

### 6.1. Чуждоезична литература

1. Agadi S, Quach M, Haneef Z. (2013) Vitamin-responsive epileptic encephalopathies in children. *Epilepsy research and treatment*. 2013: 510529.
2. Bagci S, Zschocke J, Hoffmann G *et al.* (2008) Pyridoxal phosphate-dependent neonatal epileptic encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 93:F151–2.
3. Basu A, Nishanth P, Ifaturoti O. (2010) Pregnancy in Women with Myotonia Congenita. *Obstetric Anesthesia Digest*. 30 (2): 135.
4. Baxter P, Aicardi J. (1999) Neonatal seizures after pyridoxine use. *Lancet* 354:2082–2083.
5. Baxter P. (2001) Pyridoxine-dependent and pyridoxine-responsive seizures. *Dev Med Child Neurol*. 43:416–20.
6. Becker P, Knussmann R, Kühn E. (1977) Myotonia congenita and syndromes associated with myotonia: clinical-genetic studies of the nondystrophic myotonias. Thieme.
7. Becker P. (1966) Zur Genetik der Myotonien. In Kuhn, Erich. *Progressive Muskeldystrophie Myotonie · Myasthenie*. 247–55.
8. Beckmann J, Richard I, Hillaire D *et al.* (1991) A gene for limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 15 by linkage analysis. *C R Acad Sci III*. 312(4):141-8.
9. Bennett C, Chen Y, Hahn S, Glass I, Gospe S. (2009) Prevalence of ALDH7A1 mutations in 18 North American pyridoxine-dependent seizure (PDS) patients. *Epilepsia*. 50:1167–75.
10. Benzer, S. (1967) Behavioral mutants of *Drosophila* isolated by countercurrent distribution. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **58**, 1112–1119.
11. Birnberger K, Rüdell R, Struppler A. (1975). Clinical and electrophysiological observations in patients with myotonic muscle disease and the therapeutic effect of N-propyl-ajmalin. *Journal of Neurology*. 210 (2): 99–110.
12. Bok L, Halbertsma F, Houterman S *et al.* (2012) Long-term outcome in pyridoxine dependent epilepsy. *Dev Med Child Neurol*. 54:849–54.
13. Bok L, Maurits N, Willemsen M *et al.* (2010) The EEG response to pyridoxine-IV neither identifies nor excludes pyridoxine-dependent epilepsy. *Epilepsia*. 51:2406–11.
14. Bretag A, Dawe S, Kerr D, Moskwa A. (1980) Myotonia As a Side Effect of Diuretic Action. *British Journal of Pharmacology*. 71 (2): 467–71.
15. Brugnoli R, Kapetis D, Imbrici P *et al.* (2013) A large cohort of myotonia congenita probands: novel mutations and a high-frequency mutation region in exons 4 and 5 of the CLCN1 gene. *J Hum Genet*. 58:581–7.
16. Burd L, Stenehjem A, Franceschini LA, Kerbeshian J. (2000) A 15-year follow-up of a boy with pyridoxine (vitamin B6)-dependent seizures with autism, breath holding, and severe mental retardation. *J Child Neurol* 15(11):763–765.
17. Campuzano V, Montermini L, Moltò M *et al.* (1996) Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*. 271:1423–1427.
18. Chen Sun. (2011) Clinical and genetic investigations of patients with myotonia congenita in Northern Norway. A dissertation for the degree of Philosophiae Doctor.
19. Colding-Jørgensen E. (2005) Phenotypic variability in myotonia congenita. *Muscle Nerve*. 32:19–34.

20. Coughlin C, van Karnebeek C, Al-Hertani W *et al.* (2015) Triple therapy with pyridoxine, arginine supplementation and dietary lysine restriction in pyridoxine-dependent epilepsy: neurodevelopmental outcome. *Mol Genet Metab.*
21. Duffield M, Rychkov G, Bretag A, Roberts M. (2003) Involvement of helices at the dimer interface in CLC-1 common gating. *J Gen Physiol.* 121(2):149-61.
22. Dunø M, Colding-Jørgensen E, Grønnet M, Jespersen T, Vissing J, Schwartz M. (2004) Difference in allelic expression of the CLCN1 gene and the possible influence on the myotonia congenita phenotype. *Eur J Hum Genet.* 12:738–43
23. Dutzler R, Campbell E, Cadene M, Chait B, MacKinnon R. (2002) X-ray structure of a CLC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 415, 287–294.
24. Dutzler R. (2004) The structural basis of CLC chloride channel function. *TRENDS in Neurosciences.* 27(6):315-20.
25. Ebinger M, Schütze C, König S. (1999) Demographics and diagnosis of pyridoxine-dependent seizures. *J Pediatr.* 134:795–6.
26. Estevez R, Pusch M, Ferrer-Costa C, Orozco M, Jentsch T. (2004) Functional and structural conservation of CBS domains from CLC chloride channels. *J. Physiol.* 557, 363–378.
27. Faghihi M, Mottagui-Tabar S, Wahlestedt C. (2004) Genetics of neurological disorders. *Expert Review of Molecular Diagnostics,* 4(3):317–332.
28. Fialho D, Schorge S, Pucovska U *et al.* (2007) Chloride channel myotonia: exon 8 hot-spot for dominant-negative interactions. *Brain.* 130(Pt 12):3265-74.
29. Friedman S, Ishak G, Poliachik S *et al.* (2014) Callosal alterations in pyridoxine-dependent epilepsy. *Dev Med Child Neurol.* 56(11):1106-10.
30. Friedreich N. (1863) Ueber degenerative Atrophie der spinalen Hinterstränge. *Arch Pathol Anat Phys Klin Med.* 26(3–4):391–419.
31. Gallagher R, Van Hove J, Scharer G *et al.* (2009) Folinic acid-responsive seizures are identical to pyridoxine-dependent epilepsy. *Ann Neurol.* 65:550–6.
32. Ghatge M, Contestabile R, di Salvo M *et al.* (2012) Pyridoxal 5'-Phosphate Is a Slow Tight Binding Inhibitor of *E. coli* Pyridoxal Kinase. *PLoS ONE* 7(7).
33. Gomes C. M., Santos R. (2013) Neurodegeneration in Friedreich's Ataxia: From Defective Frataxin to Oxidative Stress. *Oxid. Med. Cell Longev.* 487534
34. Gospe S Jr, Hecht S. (1998) Longitudinal MRI findings in pyridoxine-dependent seizures. *Neurology.* 51:74–8.
35. Greenstein P, Bird T. (1994) Neurogenetics. Triumphs and challenges. *West J. Med.* 161 (3): 242–245.
36. Gutmann L, Phillips L. (1991) Myotonia congenita. *Semin Neurol.* 11: 244-248.
37. Harris W. (2008) Seymour Benzer 1921–2007 The Man Who Took Us from Genes to Behaviour. *PLoS Biol* 6(2): e41.
38. Heatwole C, Moxley R 3rd (2007) The nondystrophic myotonias. *Neurotherapeutics* 4:238-251.
39. Hofer S, Frahm J. (2006) Topography of the human corpus callosum revisited—comprehensive fiber tractography using diffusion tensor magnetic resonance imaging. *Neuroimage.* 32: 989–994.
40. Hoffmann G, Schmitt B, Windfuhr M *et al.* (2007) Pyridoxal 5'-phosphate may be curative in early-onset epileptic encephalopathy. *J Inherit Metab Dis.* 30:96–9.
41. Hunt A Jr, Stokes J Jr, McCrory W, Stroud H. (1954) Pyridoxine dependency: report of a case of intractable convulsions in an infant controlled by pyridoxine. *Pediatrics* 13:140–145.
42. Hurst J, Firth H, Hall J. (2013) *Oxford Desk Reference Clinical Genetics.*

43. Information Sheet: Dried Blood. Guidelines for the Shipment of Dried Blood Spot Specimens. (1995) Centers for Disease Control and Prevention: Office of Health and Safety: Biosafety Branch.
44. Jentsch TJ (2008) CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 43: 3–36
45. Kanno J, Kure S, Narisawa A *et al.* (2007) Allelic and non-allelic heterogeneities in pyridoxine dependent seizures revealed by ALDH7A1 mutational analysis. *Mol Genet Metab*.91:384–9.
46. Koty P, Pegoraro E, Hobson G *et al.* (1996) Myotonia and the muscle chloride channel: dominant mutations show variable penetrance and founder effect. *Neurology*. 47:963–8.
47. Kubisch C, Schmidt-Rose T, Fontaine B, Bretag A, Jentsch T. (1998) CIC-1 chloride channel mutations in myotonia congenita: variable penetrance of mutations shifting the voltage dependence. *Hum. Mol. Genet.* 7, 1753–1760.
48. Lacomis D, Gonzales J, Giuliani M. (1999) Fluctuating clinical myotonia and weakness from Thomsen's disease occurring only during pregnancies. *Clin Neurol Neurosurg*. 101:133–6.
49. Lehmann-Horn F, Rüdel R. (1996) Molecular pathophysiology of voltage-gated ion channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 128:195–268.
50. Lehmann-Horn R. (1985) Membrane changes in cells from myotonia patients. *Physiol Rev*65:310–356.
51. Liu XL, Huang XJ, Shen JY *et al.* (2015) Myotonia congenita: novel mutations in CLCN1 gene. *Channels (Austin)*. 9(5):292-8
52. Lorenz C, Meyer-Kleine C, Steinmeyer K, Koch M, and Jentsch TJ. (1994) Genomic organization of the human muscle chloride channel CLC-1 and analysis of novel mutations leading to Becker-type myotonia. *Hum Mol Genet*. 3(6):941-6.
53. Lossin C, George A Jr. (2008) Myotonia congenita. *Advances in genetics* 63:25-55.
54. Lucchiari S, Ulzi G, Magri F *et al.* (2013) Clinical evaluation and cellular electrophysiology of a recessive CLCN1 patient. *J Physiol Pharmacol*. 64(5):669–78.
55. Mailänder V, Heine R, Deymeier F, Lehmann-Horn F. (1996) Novel muscle chloride channel mutations and their effects on heterozygous carriers. *Am J Hum Genet*. 58:317–24.
56. Mankodi A (2008). Myotonic disorders. *Neurology India*. 56(3), 298-304.
57. Mazón M, Barros F, Peña P *et al.* (2012) Screening for mutations in Spanish families with myotonia. Functional analysis of novel mutations in CLCN1 gene. 22(3):231–243.
58. McLachlan R, Brown W. (1995) Pyridoxine dependent epilepsy with iatrogenic sensory neuronopathy. *Can J Neurol Sci*. 22:50–1.
59. Mikati M, Trevathan E, Krishnamoorthy K, Lombroso C. (1991) Pyridoxine-dependent epilepsy: EEG investigations and long-term follow-up. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 78:215–21
60. Miller C, White M. (1984) Dimeric structure of single chloride channels from Torpedo electroplax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81:2772–2775.
61. Miller C. (1982) Open-state substructure of single chloride channels from Torpedoelectroplax. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 299:401–411.
62. Millet A, Salomons GS, Cneude F *et al.* (2011) Novel mutations in pyridoxine-dependent epilepsy. *Eur J Paediatr Neurol* 15(1):74–77.
63. Mills P, Camuzeaux S, Footitt E *et al.* (2014) Epilepsy due to PNPO mutations: genotype, environment and treatment affect presentation and outcome. *Brain*. 137:1350–60.
64. Mills P, Footitt E, Mills K *et al.* (2010) Genotypic and phenotypic spectrum of pyridoxine-dependent epilepsy (ALDH7A1 deficiency). *Brain*. 133:2148–59.
65. Mills P, Struys E, Jakobs C *et al.* (2006) Mutations in antiquitin in individuals with pyridoxine-dependent seizures. *Nat Med* 12(3):307–309.

66. Mills P, Surtees R, Champion M *et al.* (2005) Neonatal epileptic encephalopathy caused by mutations in the PNPO gene encoding pyridox(am)ine 5-prime-phosphate oxidase. *Hum. Molec. Genet.* 14: 1077-1086.
67. Naasan G, Yabroudi M, Rahi A, Mikati MA. (2009) Electroencephalographic changes in pyridoxine-dependant epilepsy: new observations. *Epileptic Disord.* 11:293–300.
68. Nabbout R, Soufflet C, Plouin P, Dulac O. (1999) Pyridoxine dependent epilepsy: a suggestive electroclinical pattern. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 81:F125–9.
69. Nielsen V, Friis M, Johnsen T. (1982) Electromyographic distinction between paramyotonia congenita and myotonia congenita: Effect of cold. *Neurology.* 32 (8): 827–32.
70. Oxford Medicine Online. (2014) Evaluation and Treatment of Myopathies (2 ed.) Edited by Emma Ciafaloni, Patrick F. Chinnery, and Robert C. Griggs.
71. Papponen H, Toppinen T, Baumann P *et al.* (1999) Founder mutations and the high prevalence of myotonia congenita in northern Finland. *Neurology.* 53 (2): 297–302.
72. Pearl P, Hyland K, Chiles J, McGavin C, Yu Y, Taylor D. (2013) Partial Pyridoxine Responsiveness in PNPO Deficiency. *JIMD Rep.* 9:139–42.
73. Peduto A, Baumgartner M, Verhoeven N *et al.* (2004) Hyperpipecolic acidemia: a diagnostic tool for peroxisomal disorders. *Mol Genet Metab.* 82: 224–30.
74. Pérez B, Gutiérrez-Solana L, Verdú A *et al.* (2013) Clinical, biochemical, and molecular studies in pyridoxine-dependent epilepsy. Antisense therapy as possible new therapeutic option. *Epilepsia.* 54:239–48.
75. Plassart-Schiess E, Gervais A, Eymard B *et al.* (1998) Novel muscle chloride channel (CLCN1) mutations in myotonia congenita with various modes of inheritance including incomplete dominance and penetrance. *Neurology.* 50:1176–9.
76. Plecko B, Hikel C, Korenke G *et al.* (2005) Pipecolic acid as a diagnostic marker of pyridoxine-dependent epilepsy. *Neuropediatrics.* 36: 200–5.
77. Plecko B, Paul K, Mills P *et al.* (2014) Pyridoxine responsiveness in novel mutations of the PNPO gene. *Neurology.* 82:1425–33.
78. Plecko B, Paul K, Paschke E *et al.* (2007) Biochemical and molecular characterization of 18 patients with pyridoxine-dependent epilepsy and mutations of the antiquitin (ALDH7A1) gene. *Hum Mutat.* 28:19–26.
79. Pusch M, Steinmeyer K, Koch M, Jentsch T. (1995) Mutations in dominant human myotonia congenita drastically alter the voltage dependence of the CIC-1 chloride channel. *Neuron.* 15(6):1455-63.
80. Pusch M. (2002) Myotonia caused by mutations in the muscle chloride channel gene CLCN1. *Hum Mutat.* 19(4):423-34.
81. Raman L, Yasodhara P, Ramaraju L. (1991) Calcium and magnesium in pregnancy. *Nutrition Research.* 11 (11): 1231–6.
82. Rankin P, Harrison S, Chong W, Boyd S, Aylett S. (2007) Pyridoxine-dependent seizures: a family phenotype that leads to severe cognitive deficits, regardless of treatment regime. *Dev Med Child Neurol.* 49:300–5.
83. Richard I, Roudaut C, Saenz A *et al.* (1999) Calpainopathy—a survey of mutations and polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 1524-1540.
84. Richard I, Roudaut C, Saenz A, Pogue R, Grimbergen J, Anderson L *et al.* (1999) Calpainopathy—a survey of mutations and polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 64: 1524–40.
85. Saviane C, Conti F, Pusch M. (1999) The muscle chloride channel CIC-1 has a double-barreled appearance that is differentially affected in dominant and recessive myotonia. *J Gen Physiol.* 113(3):457-68.

86. Scharer G, Brocker C, Vasiliou V, Creadon-Swindell G, Gallagher R, Spector E, Van Hove J. (2010) The genotypic and phenotypic spectrum of pyridoxine-dependent epilepsy due to mutations in ALDH7A1. *J Inher Metab Dis.* 33:571–81.
87. Schmitt B, Baumgartner M, Mills PB *et al.* (2010) Seizures and paroxysmal events: symptoms pointing to the diagnosis of pyridoxine-dependent epilepsy and pyridoxine phosphate oxidase deficiency. *Dev Med Child Neurol.* 52:e133–42.
88. Schouten J *et al.* (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification *Nucleic Acids Res* 30, e57.
89. Shorvon S, Andermann F, Guerrini R (2011) *The causes of epilepsy: common and uncommon causes in adults and children*, 1st edn. Cambridge University Press, Cambridge.
90. Skálová D, Zídková J, Voháňka S *et al.* (2013) CLCN1 Mutations in Czech Patients with Myotonia Congenita, In Silico Analysis of Novel and Known Mutations in the Human Dimeric Skeletal Muscle Chloride Channel. *PLoS ONE* 8(12): e82549.
91. Skov M, De Paoli F, Lausten J, Nielsen O, Pedersen T. (2015) Extracellular magnesium and calcium reduce myotonia in isolated CLC-1 chloride channel-inhibited human muscle. *Muscle & nerve.* 51 (1): 65–71.
92. Skov M, Riisager A, Fraser, James A, Nielsen O, Pedersen T. (2013) Extracellular magnesium and calcium reduce myotonia in CLC-1 inhibited rat muscle. *Neuromuscular Disorders.* 23 (6): 489–502.
93. Steinmeyer K, Ortland C, Jentsch T. (1991) Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. *Nature.* 354:301-304.
94. Stockler S, Plecko B, Gospe S *et al.* (2011) Pyridoxine dependent epilepsy and antiquitin deficiency: clinical and molecular characteristics and recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Mol Genet Metab.*104:48–60.
95. Sun C, Tranebjaerg L, Torbergesen T, Holmgren G, Van Ghelue M. (2001) Spectrum of CLCN1 mutations in patients with myotonia congenita in Northern Scandinavia. *Eur J Hum Genet.* 9(12):903–9.
96. Suominen T, Schoser B, Raheem O *et al.* (2008) High frequency of co-segregating CLCN1 mutations among myotonic dystrophy type 2 patients from Finland and Germany. *Journal of Neurology*, 255(11), 1731-1736.
97. Tandon P. (2000) The decade of the brain: a brief review. *Neurol India.* 48 (3): 199–207.
98. Tanzi R. (1991) Genetic linkage studies of human neurodegenerative disorders. *Curr Opin Neurobiol.* 1 (3): 455–461.
99. Tein I. (2015) Vitamin and cofactor responsive encephalopathies and seizures. *JICNA* 15:105.
100. Thomsen J. (1876) Tonische Krämpfe in willkürlich beweglichen Muskeln in Folge von ererbter psychischer Disposition. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten.* 6 (3): 702–18.
101. Tincheva S, Georgieva B, Todorov T *et al.* (2016) Myotonia congenita type Becker in Bulgaria: First genetically proven cases and mutation screening of two presumable endemic regions. *Neuromuscular Disorders* 26 (10): 675–680.
102. Tincheva S, Todorov T, Todorova A *et al.* (2015b) First cases of pyridoxine-dependent epilepsy in Bulgaria: novel mutation in the ALDH7A1 gene. *Neurol Sci.* 36:2209-2212.
103. Tincheva S, Todorova A, Todorov T, Mitev V. (2015a) Two autosomal recessive neuromuscular disorders – FRDA and LGMD2A, in a single Bulgarian pedigree. *Scripta Scientifica Medica*, 47(3):81-84.
104. Tlili A, Hamida Hentati N, Chaabane R, Gargouri A, Fakhfakh F. (2013) Pyridoxine-dependent epilepsy in Tunisia is caused by a founder missense mutation of the ALDH7A1 gene. *Gene.* 518:242–5.

105. Todorova A, Georgieva B, Tournev I *et al.* (2007) A large deletion and novel point mutations in the calpain 3 gene (CAPN3) in Bulgarian LGMD2A patients. *Neurogenetics* 8: 225-229.
106. Todorova A, Litvinenko I, Todorov T, Tincheva R, Avdjieva D, Tincheva S, Mitev V. (2013) A family with fragile X syndrome, Duchenne muscular dystrophy and ichthyosis transmitted by an asymptomatic carrier. *Clinical Genetics* 85:286–289.
107. Trip J, Drost G, Ginjaar H *et al.* (2009) Redefining the clinical phenotypes of non-dystrophic myotonic syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 80(6):647–52.
108. Trip J, Faber C, Ginjaar H, van Engelen B, Drost G. (2007) Warm-up phenomenon in myotonia associated with the V445M sodium channel mutation. *J Neurol* 254(2):257-258.
109. van Karnebeek C, Hartmann H, Jaggumantri S *et al.* (2012) Lysine restricted diet for pyridoxine-dependent epilepsy: first evidence and future trials. *Mol Genet Metab*. 107:335–44.
110. van Karnebeek C, Stockler-Ipsiroglu S, Jaggumantri S *et al.* (2014) Lysine-restricted diet as adjunct therapy for pyridoxine-dependent epilepsy: The PDE Consortium consensus recommendations. *JIMD Rep*. 15:1-11.
111. Varkey B, Varkey L. Muscle hypertrophy in myotonia congenita. (2003) *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 74(3):338.
112. Vosshall L. (2007) Into the mind of a fly. *Nature* 450, 193-197.
113. Wakeman B, Babu D, Tarleton J, MacDonald I. (2008) Extraocular muscle hypertrophy in myotonia congenita. *Journal of AAPOS*. 12 (3): 294–6.
114. Werle E *et al.* (1994) Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucleic Acids Res*. 22, 4354-4355.
115. Zhang J, Bendahhou S, Sanguinetti M, Ptacek L. (2000) Functional consequences of chloride channel gene (CLCN1) mutations causing myotonia congenita. *Neurology*. 54:937–42.
116. Zhang J, George AL Jr, Griggs RC *et al.* (1996) Mutations in the human skeletal muscle chloride channel gene (CLCN1) associated with dominant and recessive myotonia congenita. *Neurology*. 47:993–8/1996.
117. Warner J, Barron L, Goudie D, Kelly K, Dow D, Fitzpatrick D, Brock J. (1996) A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. *J Med Genet*. 33:1022–1026.

## 6.2. Българска литература

1. Тончева Д. (2014) Редки генетични болести, Том 1, София.

## 6.3. Електронни източници

1. ALDH gene superfamily. <http://www.aldh.org/website/>
2. ENSEMBL. <http://www.ensembl.org/index.html>
3. Coffalyser.Net. <https://coffalyser.wordpress.com/>
4. Genetics home reference. <https://ghr.nlm.nih.gov/>
5. Hellmann lab. <http://www.hellmann-lab.com/research.php>
6. Human Genome Variation Society. <http://www.hgvs.org/mutnomen/>
7. Leiden Open Variation Database. <http://www.lovd.nl>
8. Louisiana State University School of Medicine in New Orleans. <http://www.medschool.lsuhs.edu>
9. Medscape (2013) <http://emedicine.medscape.com/> Accessed 4 Aug 2014
10. MRC-Holland. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MLPA. [www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)

11. National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
12. National Organization for Rare Disorders (NORD). <https://rarediseases.org/rare-diseases/>
13. Orphanet. The portal for rare diseases and orphan drugs. <http://www.orpha.net/>
14. Oxford Medicine Online. <http://oxfordmedicine.com/view/10.1093/med/9780199873937.001.0001/med-9780199873937-chapter-9>
15. Spot On Sciences. <http://www.spotonsciences.com/dbstechnology/>
16. The Human Gene Mutation Database. <http://www.hgmd.org/>
17. University of California Santa Cruz. In-Silico PCR. <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>
18. Wikipedia – the free encyclopedia. <https://en.wikipedia.org>

## 7. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### 7.1. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Tincheva S**, Todorova A, Todorov T, Mitev V. (2015a) Two autosomal recessive neuromuscular disorders – FRDA and LGMD2A, in a single Bulgarian pedigree. *Scripta Scientifica Medica*, 47(3):81-84.
2. **Tincheva S**, Todorov T, Todorova A, Georgieva R, Stamatov D, Yordanova I, Kadiyska T, Georgieva B, Bojidarova M, Tacheva G, Litvinenko I, Mitev V. (2015b) First cases of pyridoxine-dependent epilepsy in Bulgaria: novel mutation in the ALDH7A1 gene. *Neurol Sci.* 36:2209-2212. Импакт фактор: 1.783
3. **Tincheva S**, Georgieva B, Todorov T, Savov A, Tsaneva S, Litvinenko I, Mitev V, Todorova A. (2016) Myotonia congenita type Becker in Bulgaria: First genetically proven cases and mutation screening of two presumable endemic regions. *Neuromuscular Disorders* 26 (10): 675–680. Импакт фактор: 3.107

**ОБЩ ИМПАКТ ФАКТОР: 4.890**

### 7.2. НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Tincheva S**, Todorova A, Todorov T, Litvinenko I, Gergelcheva V, Tournev I, Mitev V. (2014) Myotonia congenital type Becker in an endemic Bulgarian region. P10.21, ESHG Conference, May 31 – June 3, 2013, Milan, Italy.
2. **Тинчева С**, Тодоров Т, Стаматов Д, Кадийска Т, Литвиненко И, Мурадян Н, Митев В, Тодорова А. (2014) Рецесивни неврологични и невромускулни заболявания – обзор за изминалата година. 18 - 20 октомври, 2014, Парк Хотел „Москва“, София, България (устна презентация).
3. **Tincheva S**, Todorov T, Todorova A, Yordanova I, Kadiyska T, Litvinenko I, Mitev V. (2015) Pyridoxine-dependent epilepsy in Bulgarian dizygotic twins: a novel

---

mutation in the ALDH7A1 gene. PS09.107, ESHG Conference, June 6 - 9, 2015. Glasgow, Scotland, United Kingdom.

4. **Tincheva S**, Yordanova I, Todorov T, Todorova A, Stamatov D, Georgieva B, Kadiyska T, Litvinenko I, Mitev V. (2015). First steps in molecular diagnostics of cofactor epileptic encephalopathies in Bulgaria. 11th Balkan Congress of Human Genetics, September 17-20, 2015, Belgrade, Serbia, p.82-83.
5. **Tincheva S**, Georgieva B, Todorova A, Todorov T, Litvinenko I, Mitev V. (2016) Mutation screening of two presumable Myotonia congenita type Becker endemic regions in Bulgaria. P10.27, ESHG Conference, May 21 – May 24, 2016, Barcelona, Spain.

### 7.3. ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТАТИ

1. **Tincheva S**, Todorov T, Todorova A *et al.* (2015b) First cases of pyridoxinedependent epilepsy in Bulgaria: novel mutation in the ALDH7A1 gene. *Neurol Sci.* 36:2209-2212. Импакт фактор: 1.783  
(ЦИТИРАНИЯ 2)

## **8. ПРИНОСИ**

- 8.1. С настоящия труд беше поставено началото на молекулярно генетичната диагностика и беше постигнато генетично охарактеризиране на две неврологични заболявания с автозомно рецесивно унаследяване в България – пиридоксин зависима епилепсия и миотония конгенита тип Бекер.
- 8.2. Резултатите от извършения селективен скрининг показват висока честота на носителство на конкретни мутации по отношение на миотония конгенита тип Бекер в таргетни географски региони на страната, което е от съществено значение за здравните институции в България.