

**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**

## **АВТОРЕФЕРАТ**

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

**Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и  
информатика  
Професионално направление: 4.3. Биологически науки  
Докторска програма: Молекулярна биология**

**НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:  
Акад. 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. Изследванията, обект на настоящата дисертация, са одобрени от КЕНИМУС.

Дисертационният труд е представен на заседание на катедрен съвет на Катедра „Медицинска Химия и Биохимия“, Медицински Университет - София, на 13.03.2017 г. и насрочен за защита към 03.07.2017 г.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 03.07.2017 г. в Катедра Медицинска Химия и Биохимия, Медицински Университет София, ул. Здраве 2, гр. София, пред научно жури в състав:

1. проф. д-р Иван Олегович Литвиненко, дм (рецензент)
2. доц. д-р Венета Любомирова Георгиева – Абаджиева, дм (рецензент)
3. Акад. проф. д-р Ваньо Иванов Митев, дм, дбн
4. доц. Светослав Георгиев Димов, дб
5. доц. д-р Маргарита Георгиева Пешева, дб

Материалите по защитата са на разположение в Катедра „Медицинска Химия и Биохимия“, Медицински Университет - София и са публикувани на интернет страницата на МУ-София - Развитие на академичния състав - <http://career.mu-sofia.bg>.

## СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения .....	3
Резюме.....	4
Summary .....	5
Въведение .....	6
Цел и Задачи .....	8
Материали и методи .....	9
Резултати и обсъждане .....	10
Заключение .....	39
Изводи .....	41
Библиография .....	42
Публикации и научни прояви .....	44
Приноси .....	45

## 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

MLPA – Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification

GWAS – Genome-Wide Association Studies

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.

За първи път в България бяха генетично верифицирани случаи на пиридоксин зависима епилепсия и миотония конгенита тип Бекер. 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 (както при пиридоксин зависимата епилепсия). 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 – в регионите на 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.

Характерната особеност на автозомно рецесивните заболявания да остават дълго време скрити в асимптоматични индивиди 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 autosomal recessive 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].

We present the first Bulgarian cases of pyridoxine dependent epilepsy and myotonia congenita type Becker verified at the molecular genetic level. In two of the 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 (as in the case of PDE). On the other hand, identification of the disease causing mutations 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 – in the regions of Gotse Delchev and Mezdra. We determined significant carrier frequencies: 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 peculiarity of the autosomal recessive to remain hidden in asymptomatic individuals for many generations 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 - 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

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. Настоящият дисертационен труд е насочен към неврологичните заболявания с автозомно рецесивно унаследяване. Интересът към заболяванията с този тип предаване в поколението се поражда от възможността генетичните дефекти да останат дълго време скрити в асимптоматични индивиди. В тази връзка специален интерес представляват две редки заболявания: пиридоксин зависимата епилепсия (от групата на епилептичните енцефалопатии) и миотония конгенита тип Бекер (като представител на невромускулните заболявания). Пиридоксин зависимата епилепсия (ПЗЕ) 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. 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 [Vaxter, 1999]. 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 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 ClC-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 е от интерес за настоящата разработка поради автозомно рецесивното си унаследяване. Обикновено се изявява в по-късна детска възраст, но с по-тежка симптоматика в сравнение с Томсън формата [Thomsen, 1876; Becker *et al.*, 1977]. Среща с честота съответно от 0.6 на 100 000 в общата популация [<http://www.rarediseases.org>]. До момента повече от 160 мутации от всякакъв тип са докладвани по дължината на всичките 23 екзона на *CLCN1* гена [Lossin *et al.*, 2008; Brugnoni *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015].

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 (както при пиридоксин зависимата епилепсия). 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.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

### 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.

### ЗАДАЧИ

#### 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. 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.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ

В рамките на настоящия дисертационен труд бяха проведени молекулярно-генетични изследвания при общо 542 пробанда, разделени в следните групи:

1. **Пиридоксин зависима епилепсия:** 8 пациента от 6 семейства и родителите на всички пациенти (12 на брой) - общо 20 души.
2. **Миотония конгенита тип Бекер:** 11 пациента от 9 семейства и 21 техни родственици: 1 сестра, 1 съпруг, 1 фетус и 18 родители - 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:** 6 родственика.

Пациентите 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"

### БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ

За целите на молекулярно генетичните изследвания беше изолирана ДНК от левкоцити: от венозна или капилярна кръв и от филтърни бланки (предоставени на екипа ни от Националната Генетична Лаборатория).

### МЕТОДИ

1. Преданалитична обработка на материала
  - Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв по солеви метод и от венозна или капилярна кръв по фенол-хлороформен метод
  - Изолиране на ДНК от филтърни бланки чрез кит NucleoSpin Tissue, MACHEREY-NAGEL, Germany
2. Аналитична обработка на материала
  - Полимеразна верижна реакция (ПВР; Polymerase chain Reaction; PCR) на следните гени: *ALDH7A1*, *PNPO*, *CLCN1*, *FXN*, екзони 4 и 7 на *CAPN3*.
  - Електрофореза в агарозен гел
  - Директно секвениране по Sanger с флуоресцентно белязани дидезокси нуклеотиди
  - Мултиплексна лигазно зависима амплификация (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification, MLPA)
  - Short PCR и TP-PCR.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

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

### 1. ПИРИДОКСИН ЗАВИСИМА ЕПИЛЕПСИЯ

По отношение на кофактор зависимите епилепсии настоящата разработка има пилотна роля. Настоящият труд поставя началото на молекулярно-генетичната диагностика на кофактор зависимите епилепсии в България с въвеждане на методика за извършване на генетичен анализ при пациенти с клинична диагноза пиридоксин зависима епилепсия.

#### 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. В таблица 1 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.

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.

Откритите мутации в *ALDH7A1* гена позволяват потвърждаване на генетично ниво на диагнозата пиридоксин зависима епилепсия при трима от пациентите ( $3/8 = 37.5\%$ ).

#### Клинични данни и молекулярно-генетични резултати

- **Семейство 2:**

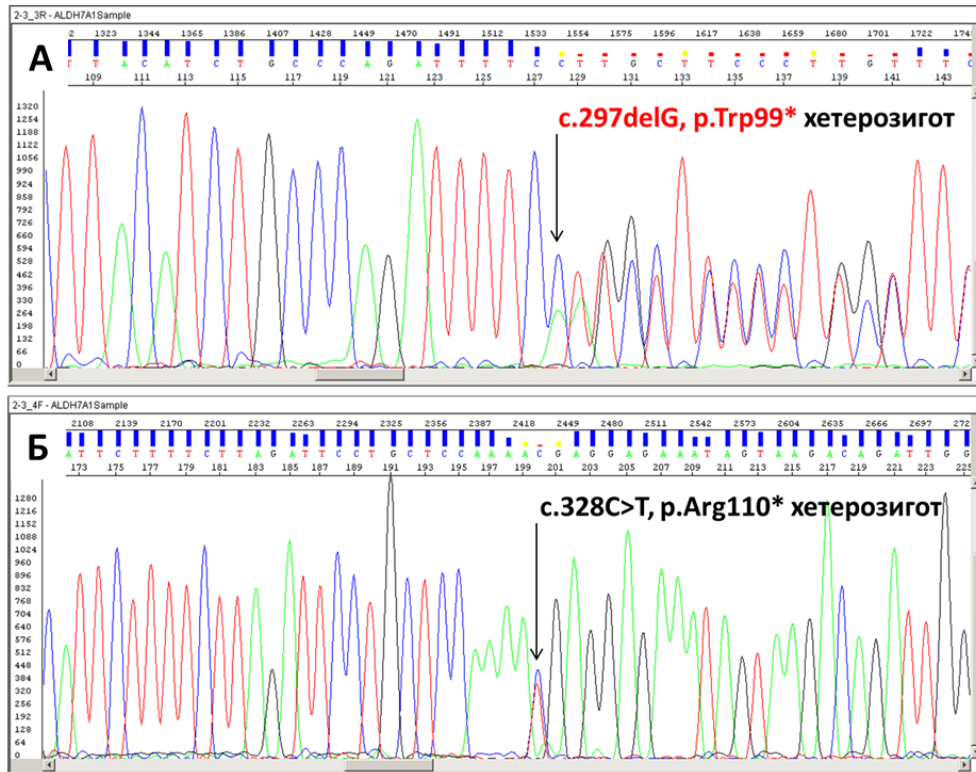
Семейство 2 е представено от двойка двуйчни близнаци от български произход. Два часа след раждането децата получават мултифокални клонични гърчове, неповлияващи се от антиепилептични медикаменти, овладяни незабавно след

прилагане на пиридоксин. Пациентите са изписани с комбинирана терапия от 25 mg витамин B6 дневно (приеман орално) и валпроат с цел превенция на рецидиви.

**Таблица 1. Клинични и молекулярно-генетични данни на пациенти с диагноза ПЗЕ, обект на настоящата дисертация.**

семејство	засегнати индивиди	пол	първи симптоми (след раждането)	възраст по време на изследване (месеци)	произход	<i>ALDH7A1</i> мутации	тип на мутацията	<i>PNPO</i> 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

Секвенирането на *ALDH7A1* гена при пациентите от семейство 2 показва, че и двамата близнаци са носители на едни и същи дефекти в хетерозиготно състояние: c.297delG, p.Trp99\* в трети екзон и c.328C>T, p.Arg110\* в четвърти екзон (Фигура 1). 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\*. 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.

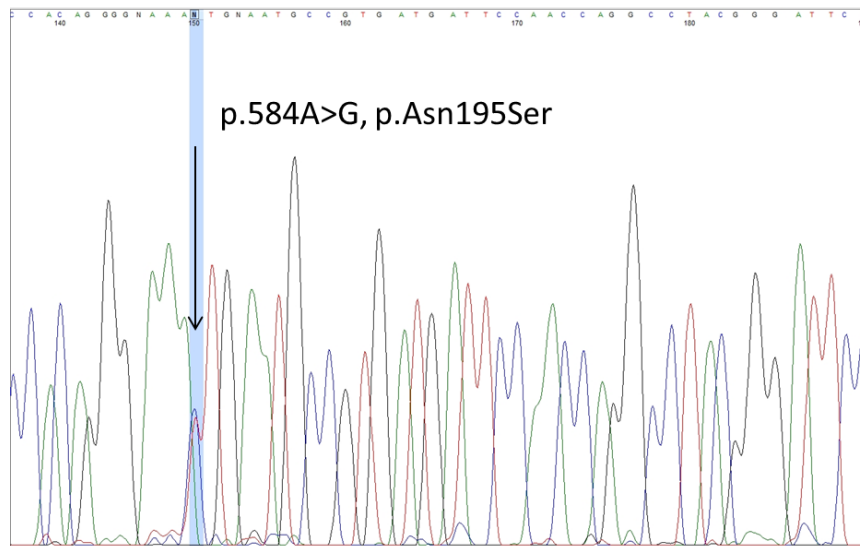


**Фигура 1. Секвенционен профил на *ALDH7A1* гена при пациентите от семейство 2.** Представени са участък от трети (панел А) и четвърти екзон (панел Б), където съответно попадат двете мутации c.297delG, p.Trp99\* и c.328C>T, p.Arg110\*.

### Семейство 5:

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 витамин В6 е довела до незабавно спиране на епилептичните прояви. Пациентът е изписан с поддържаща терапия - витамин В6 и валпроат. Рецидиви не са отчетени, без изоставане във физическото и психическо развитие.

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, 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 2). Майката на болното дете е носител на тази замяна в хетерозиготно състояние и съответно няма изявена клинична картина.



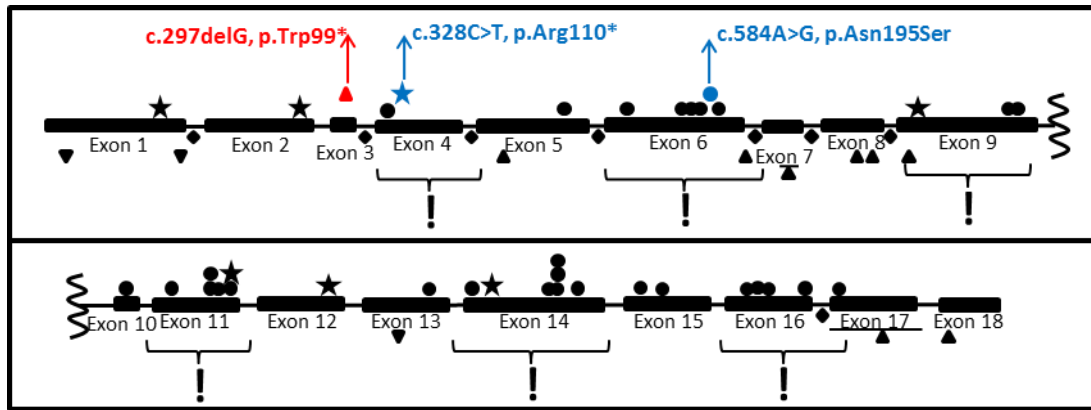
Фигура 2. Секвенционен профил на участък от шести екзон на *ALDH7A1* гена при пациента от семейство 5, обхващащ района на замяната с.584A>G, p.Asn195Ser.

- 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 автозомно рецесивно наследствено заболяване с подобна клинична картина - пиридоксал 5'-фосфат зависима епилепсия (ПФЗЕ). Дължи на молекулни дефекти в гена *PNPO*, който кодира ензима пиридоксин 5'-фосфат оксидаза [Mills *et al.*, 2005]. За съжаление при нито един пациент не бяха открити *PNPO* мутации, предполагайки необходимостта от преразглеждане на диагнозата им.

- 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 [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 [<http://www.hgmd.org/>]. Предишни проучвания предполагат, че по отношение на европейската популация има наличие на „горещи региони“ в *ALDH7A1* гена (екзони 4, 6, 9, 11 и 14). Имено в тях са локализирани ~60% от докладваните мутации [Mills *et al.*, 2010; Stockler *et al.*, 2011] (Фигура 3).



Фигура 3. Графично представяне на *ALDH7A1* гена и докладваните в него мутации.

- „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.

- **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 Schragar 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 [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.

## 2. МИОТОНИЯ КОНГЕНИТА ТИП БЕКЕР

Настоящата разработка включва първото молекулярно генетично изследване на пациенти с клинична диагноза миотония конгенита тип Бекер за България.

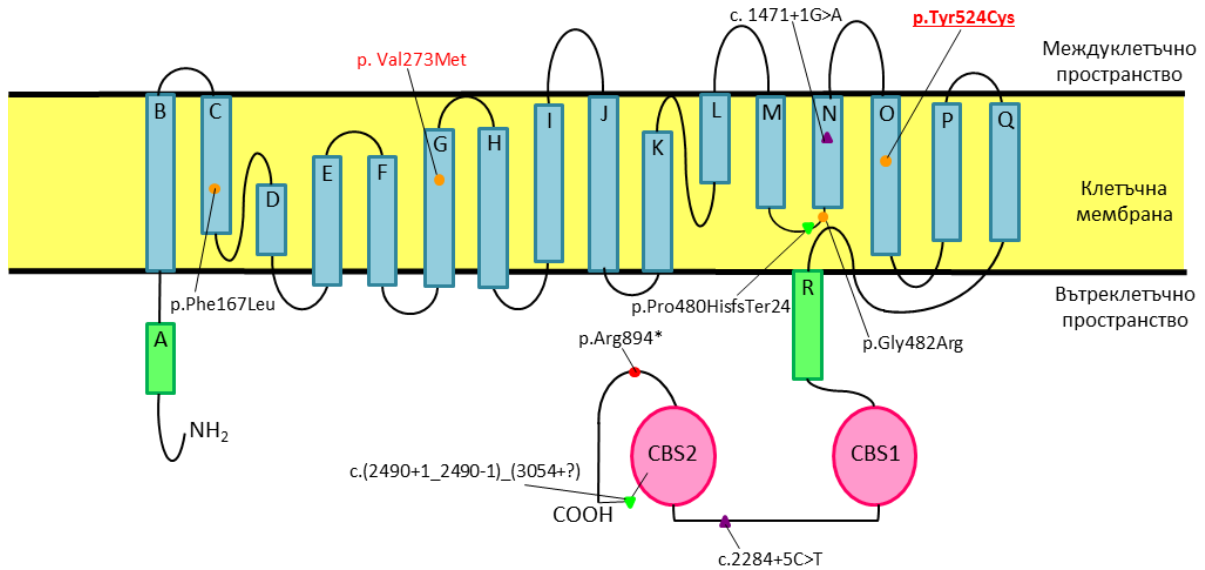
### Изследвана група пациенти

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 2 са представени всички изследвани пациенти и техни родственици, както и някои клинични и молекулярно-генетични данни. 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 (с изключение на семейство 9, от което родителите не са налични) . При седем от деветте изследвани семейства клинично поставената диагноза беше потвърдена чрез секвениране или MLPA-анализ на *CLCN1* гена (7/9 = 78%). Splice-site замаяната с.1471+1G>A се очертава като най-честият дефект в *CLCN1* гена за българската популация.

На фигура 4 е представена вероятната структура на CIC-1 белтъка [Dutzler *et al.*, 2002; Estevez *et al.*, 2004; Brugnoli *et al.*, 2013].

Таблица 2. 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
	едно дете	2	мъжки	26	11	български	няма данни	с. 1471+1G>A	splice-site	баща	с. 2680C>T, p.(Arg894*)	nonsense	майка
2	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	-	-	български турци	Брезница, обл. Гоце Делчев	с. 817G>A, p.Val1273Met	missense	не се знае	норма	-	-
3	втора братовчедка	2	женски	4	2	български турци	Брезница, обл. Гоце Делчев	с. 817G>A, p.Val1273Met	missense	майка	с. 817G>A, p.Val1273Met	missense	баща
	едно дете	2	женски	28	28	български	Пловдив	с. 1471+1G>A	splice-site	майка	с. 1471+1G>A	splice-site	баща
4	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								
5	съпруг на сестрата	0	мъжки	36	няма симптоми	български	Варна	с.2284+5C>T	splice-site	-	с.501C>G, p.Phe167Leu	missense	-
			женски	28	няма симптоми								
6	едно дете	2	мъжки	4	2	български турци	Велики Преслав	норма	-	-	норма	-	-
			мъжки	5	2								
7	едно дете	2	мъжки	5	2	български турци	Бургас	норма	-	-	норма	-	-
			мъжки	11	1								
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	-
			мъжки	няма данни	няма данни								



Фигура 4. Структура на CLCN1 протеина с всички открити мутации.

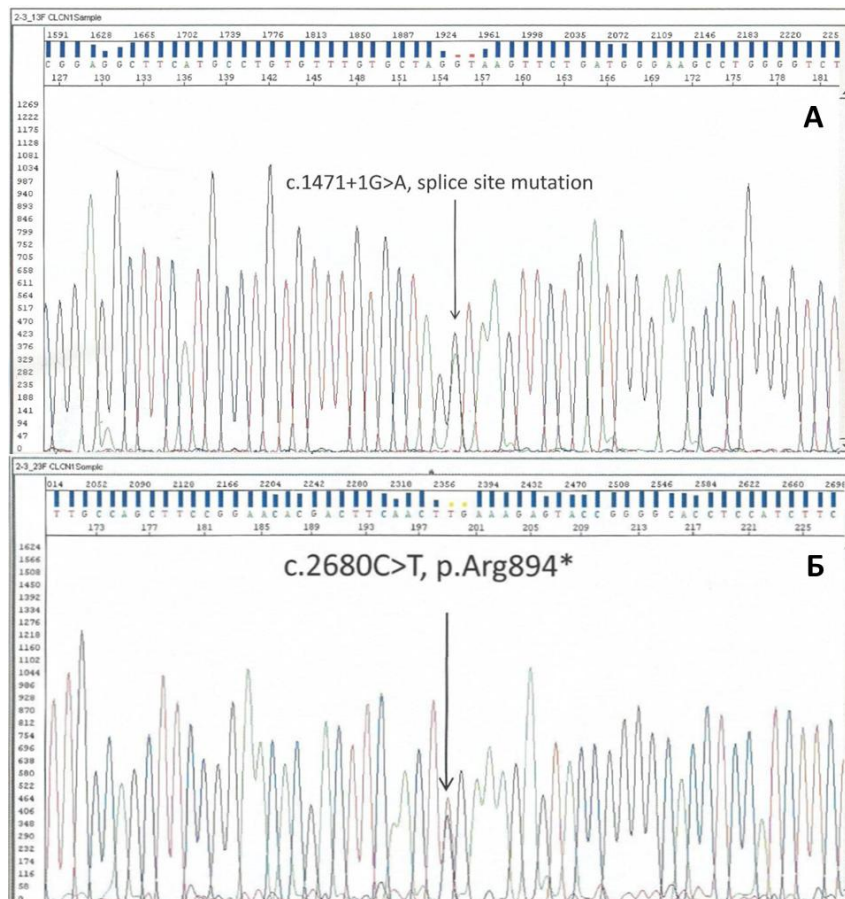
#### Клинични данни и молекулярно-генетични резултати

- Семейства 1 и 2

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*. След волево съкращение на мускулите на ръката е невъзможно отпускането им. Резултатите от ЕМГ показват наличие на миотонични залпове, триплети и фибрилации.

Семейство 2 е представено от 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.

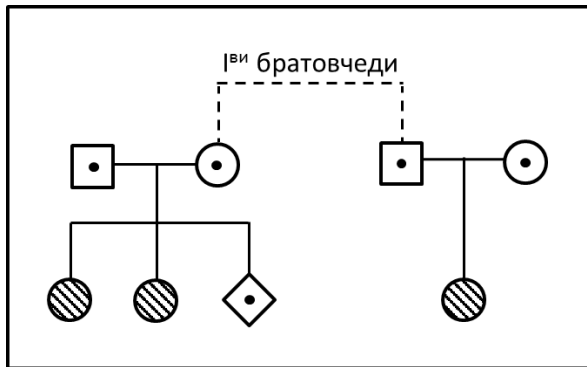
Чрез секвениране по метода на Sanger на всички кодиращи екзони и екзон-интронните граници на *CLCN1* гена при пациентите от семейства 1 и 2 беше установено, че и при двамата заболяването се дължи на едни и същи мутации: splice-site мутация c.1471+1G>A и nonsense мутация c.2680C>T, p.Arg894\* в хетерозиготно състояние (Фигура 5).



**Фигура 5.** 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).

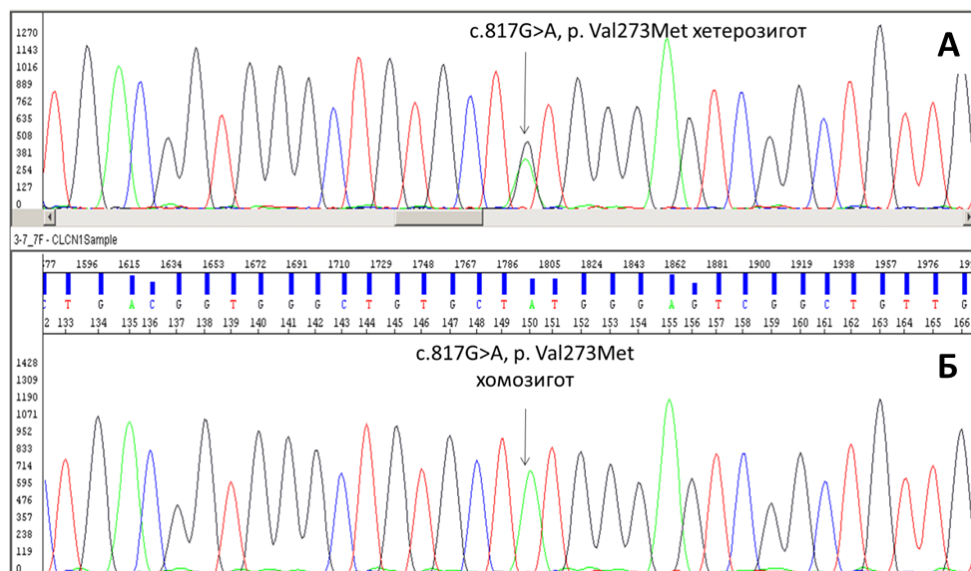
- **Семейство 3**

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. В последствие тяхна втора братовчедка на 4 годишна възраст беше също насочена за молекулярно-генетичен анализ, поради наличие на същите оплаквания (Фигура 6). 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 6. Родствени връзки между пациентите от семейство 3.

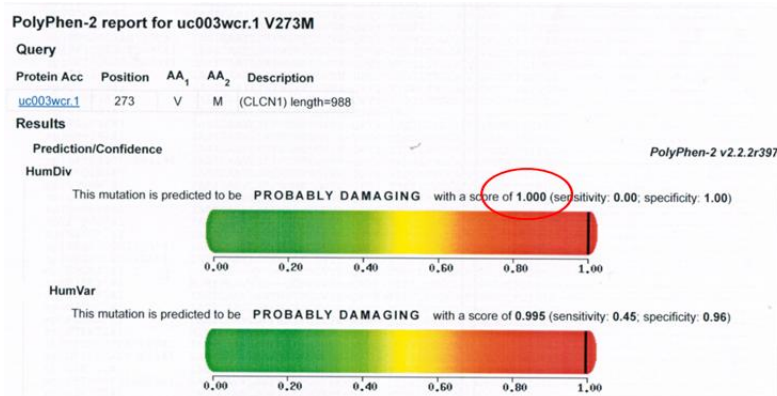
Секвениране на *CLCN1* гена при двете сестри доведе до идентифициране на една и съща замяна и при двете: missense мутация c.817G>A, p.Val273Met (в екзон 7 на *CLCN1* гена), при това в хомозиготно състояние (Фигура 7). При родителите молекулярно-генетичните изследвания, както беше очаквано, показаха същата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



Фигура 7. Секвенционен профил на *CLCN1* гена при семейство 3. Представени са хетерозиготен (А) и хомозиготен носител (Б) на мутацията c.817G>A, p.Val273Met (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 Vrugnoni и сътр., 2013 като вероятно патогенен при едно семейство от италиански произход. Замяната засяга високо

консервативен аминокиселинен остатък в трансмембранна  $\alpha$ -спирала [Brugnoni *et al.*, 2013] - Фигура 8.



**Фигура 8. Оценка на патогенността на p.Val273Met** замаяната с помощта на специализиран софтуер (PolyPhen-2).

При проведеня 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. При фетуса проведохме само прицелно изследване на фамилната мутация. Резултатите показаха, че е здрав носител на семейния дефект с.817G>A, p.Val273Met – в хетерозиготно състояние.

- **Семейство 4**

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.

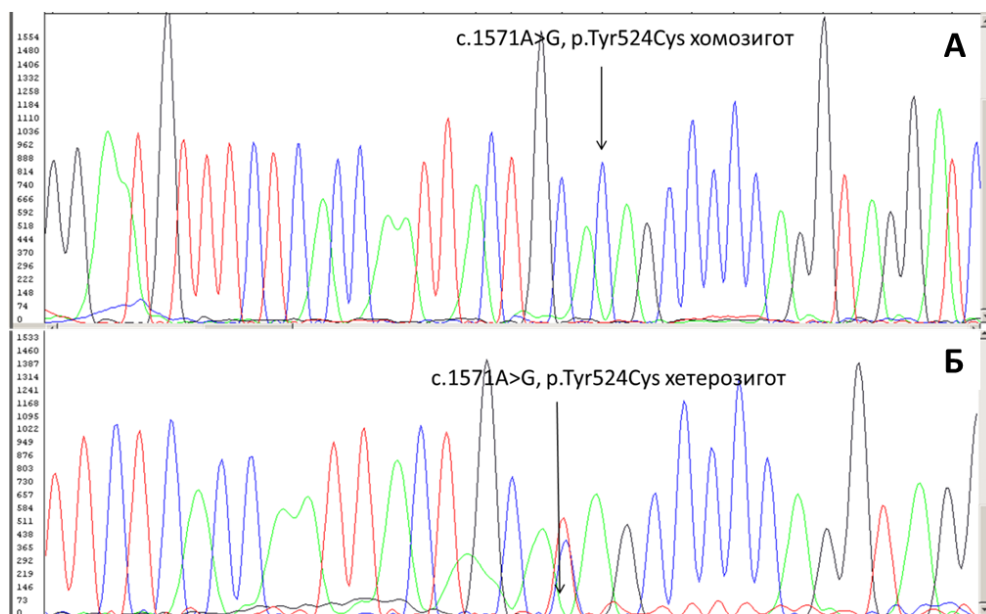
Клиничната диагноза на пациента от това семейство беше потвърдена чрез секвениране на *CLCN1* гена. Открита беше вече познатата от семейства 1 и 2 splice-site мутация с.1471+1G>A, но този път в хомозиготно състояние. Честата среща на тази замяна предполага това да е най-честата мутация, причиняваща заболяването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

- **Семейство 5**

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. Пациентът е от български произход, по-конкретно от с. Лик, обл. Мездра. В последствие допълнително изследвахме асимптоматичната сестра на пациента и нейния партньор.

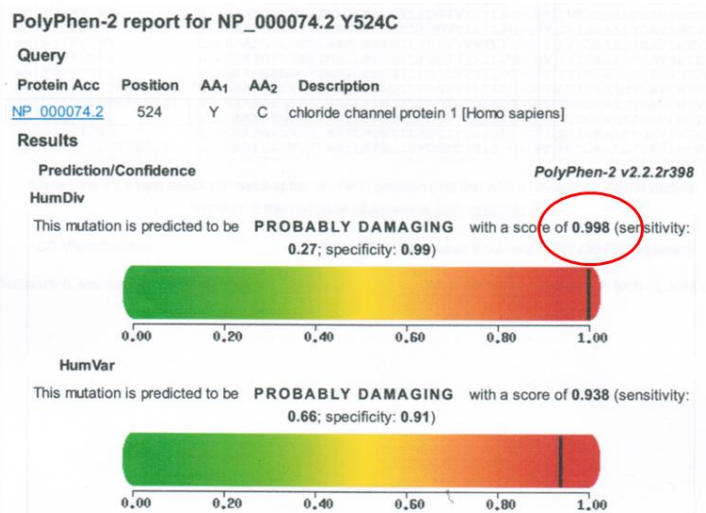
Молекулярно-генетичният анализ при пациента показва наличие на нова непубликувана досега missense замяна в екзон 14: с.1571A>G, р.Tyr524Cys (Фигура 9).



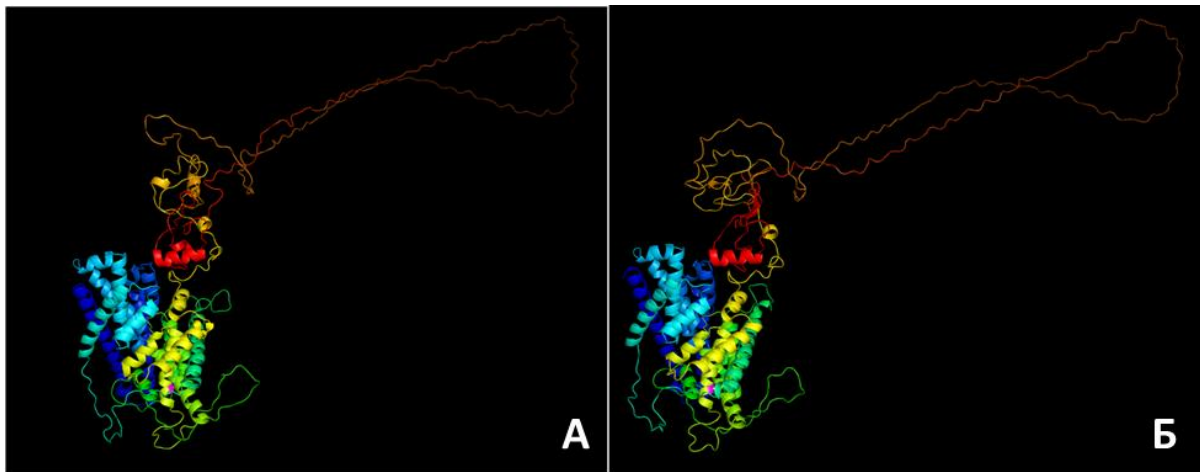
**Фигура 9.** Секвенционен профил на *CLCN1* гена при семейство 3. Представени са хомозиготен (панел А) и хетерозиготен носител (панел Б) на missense замяната с.1571A>G, р.Tyr524Cys (в екзон 14 на *CLCN1* гена).

Патогенността на този вариант беше оценен софтуерно (Poly-Phen-2) като вероятно патогенна с индекс 0.998 според HumDiv и 0.938 според HumVar (Фигура 10).

Мутацията най-вероятно засяга една от трансмембранните  $\alpha$ -спирали на хлорния канал – по-конкретно петнадесетата (спирала O, Фигури 4 и 11). Замяната на ароматната аминокиселина тирозин с полярната цистеин най-вероятно нарушава хидрофобните взаимодействия във вътрешността на плазмената мембрана.



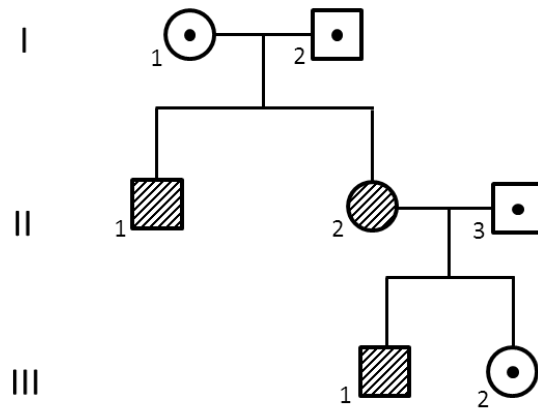
Фигура 10. Оценка на патогенността на р.Тур524Сус замяната с помощта на специализиран софтуер (PolyPhen-2).



Фигура 11. Триизмерен модел на ClC-1 протеина при наличие на новата р.Тур524Сус мутация в сравнение с нормалната протеинова структура [<https://swissmodel.expasy.org/>; <https://www.pymol.org/>]. Нуклеотидът на позиция 524 е отбелязан в лилав цвят и на двата панела. А. Нормален белтък. Б. Белтък с р.Тур524Сус 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 12 е представено родословното дърво на семейство 5 (по информация от пациента, не е налична медицинска документация). Унаследяването прилича на автозомно доминантно, тъй като във всяко поколение присъстват засегнати индивиди.



Фигура 12. Родословно дърво на семейство 5.

За съжаление нито един родственик не беше наличен за извършване на молекулярно-генетични изследвания. 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, р.Tyr524Cys – съответно се оказа носител в хетерозиготно състояние. Носителският ѝ статус беше причина за цялостно секвениране на *CLCN1* гена при клинично здравия ѝ партньор, с цел осигуряване на коректно генетично консултиране във връзка с бъдещото ѝ семейно планиране. Най-неочаквано при него бяха открити 2 замени: един splice-site с.2284+5C>T и един missense с.501C>G, р.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 замената 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 ClC-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 С-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.

- **Семейства 6 и 7**

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 от български произход, 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. В семейството има още едно дете с невромускулна симптоматика – по-малък брат със значителна мускулна хипертрофия. Клиничната картина при него обаче остава доста неясна и несъответстваща на характерната за миотония конгенита тип Бекер, поради което той не беше изследван за *CLCN1* мутации.

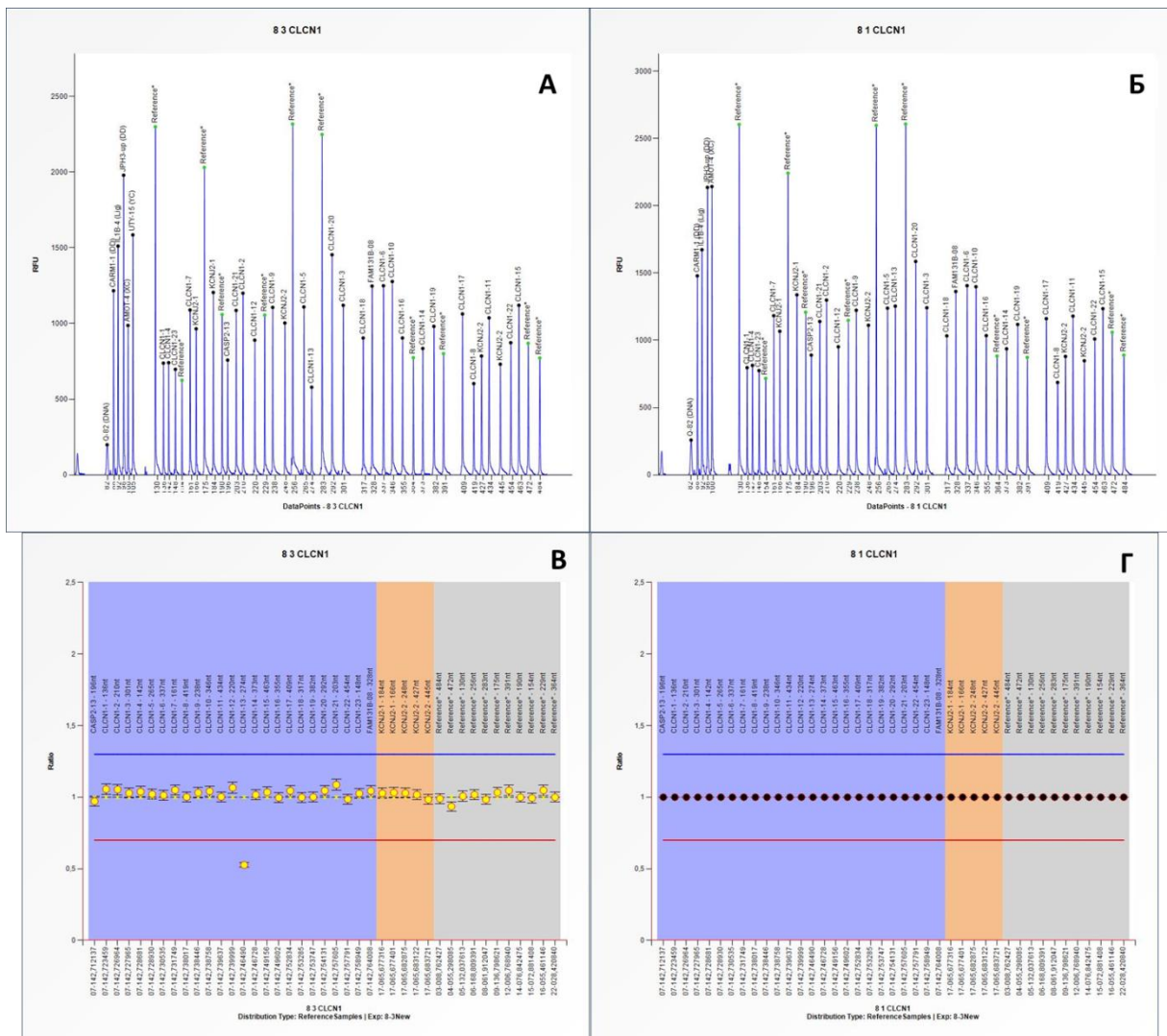
За съжаление както при семейство 6, така и при семейство 7 секвениране на *CLCN1* гена не доведе до откриване на патологични изменения, които биха могли да обяснят клиничната картина.

- **Семейство 8**

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. 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 и епилептични прояви.

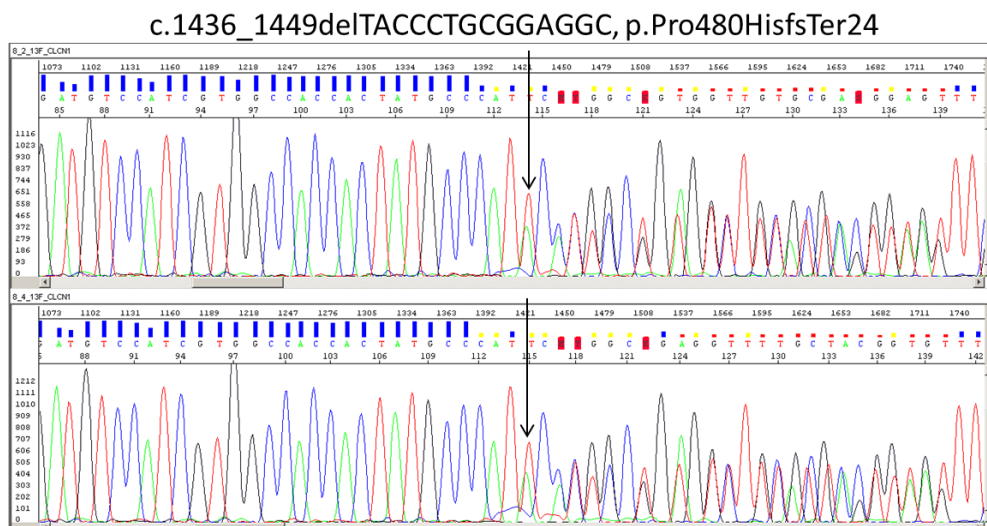
При пациента от това семейство беше открита мутация в 13 екзон на *CLCN1* гена – с.1436\_1449delTACCCTGCGGAGGC, p.Pro480HisfsTer24. Хетерозиготното носителство на този патологичен вариант най-напред беше установено чрез MLPA анализ (Фигура 13), след което за потвърждаване и точно определяне на границите на делецията беше извършено и секвениране по Sanger (Фигура 14).

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]. Сестрата на пациента се оказва носител на делецията в екзон 13 в хетерозиготно състояние.



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

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 да се провери носителският статус на пациента 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.



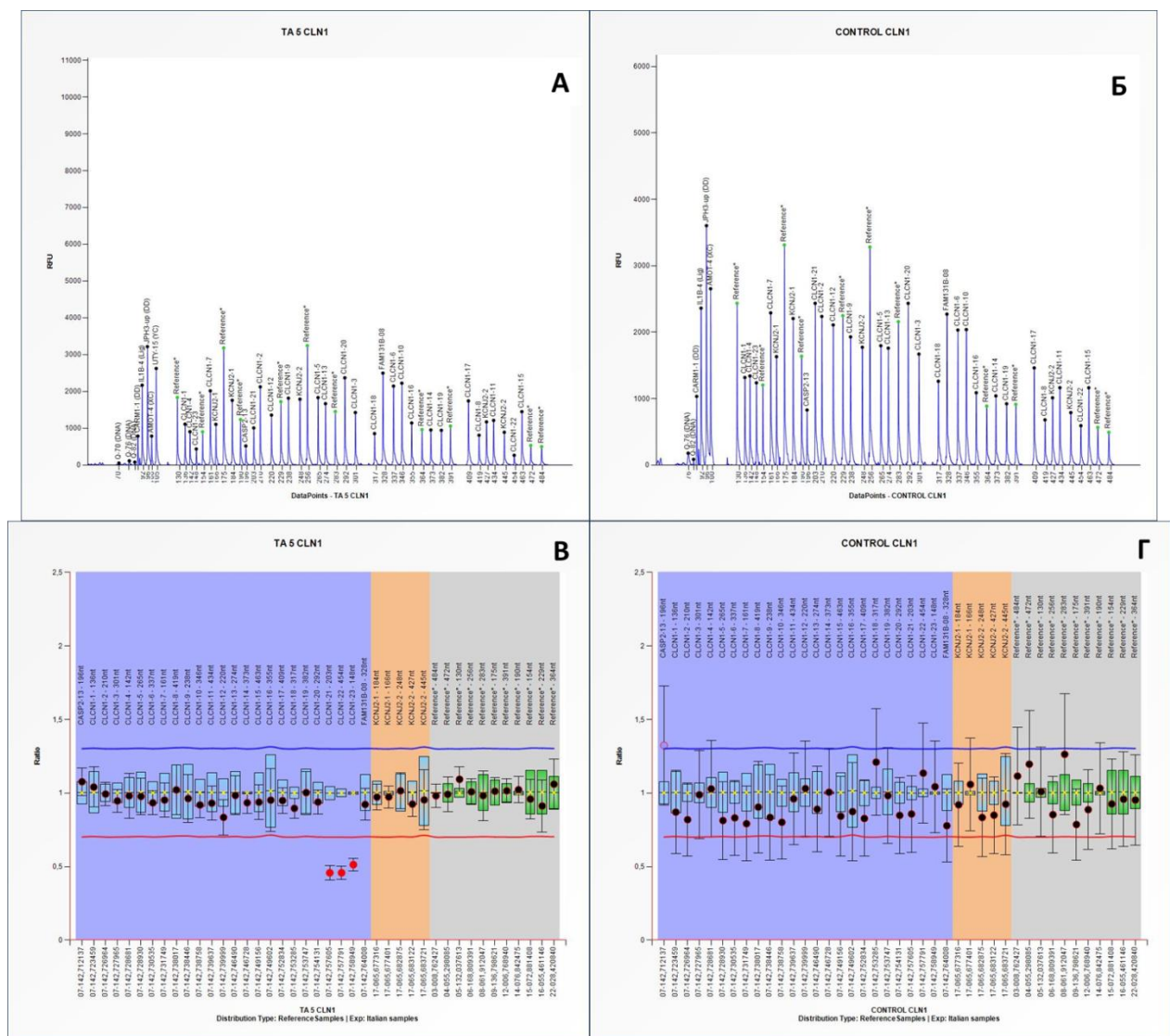
**Фигура 14. Секвенционен профил на *CLCN1* гена при семейство 8.** Представен е участък от 13 екзон в района на с.1436\_1449delTACCCTGCGGAGGC, p.Pro480HisfsTer24 мутацията.

- **Семейство 9**

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. И двамата са фенотипно здрави. Това семейство е предоставено на нашия екип от сътрудници в Италия.

Предварително в лаборатория в Рим, Италия чрез секвениране на *CLCN1* гена е била открита само една замяна при детето – с.1444G>A, р.Gly482Arg. Тази точкова мутация е наблюдавана многократно при пациенти с диагноза миотония конгенита тип Бекер от най-различен произход.

Липсата на втора мутация при секвениране предполага преминаване към втора стъпка от молекулярно-генетичния анализ - MLPA-анализ, с помощта на който могат да бъдат установени и големи преустройва, засягащи цели екзони или дори целия ген (Фигура 15). Установихме носителство на делеция, обхващаща 3 екзона (21, 22 и 23) от *CLCN1* гена: с.(2490+1\_2490-1)\_(3054+?)



**Фигура 15.** MLPA профил при детето от семейство 9. В сравнение със здрава контрола при пациента се наблюдава делеция на 21, 22 и 23 екзон от *CLCN1* гена. А и Б. Електрофоретичен профил В и Г. Обработени данни със специализиран софтуер при пациента и контролата съответно [Coffalyser.Net - <https://coffalyser.wordpress.com/>].

- **Молекулярно-генетичен анализ на *SCN4A* гена**

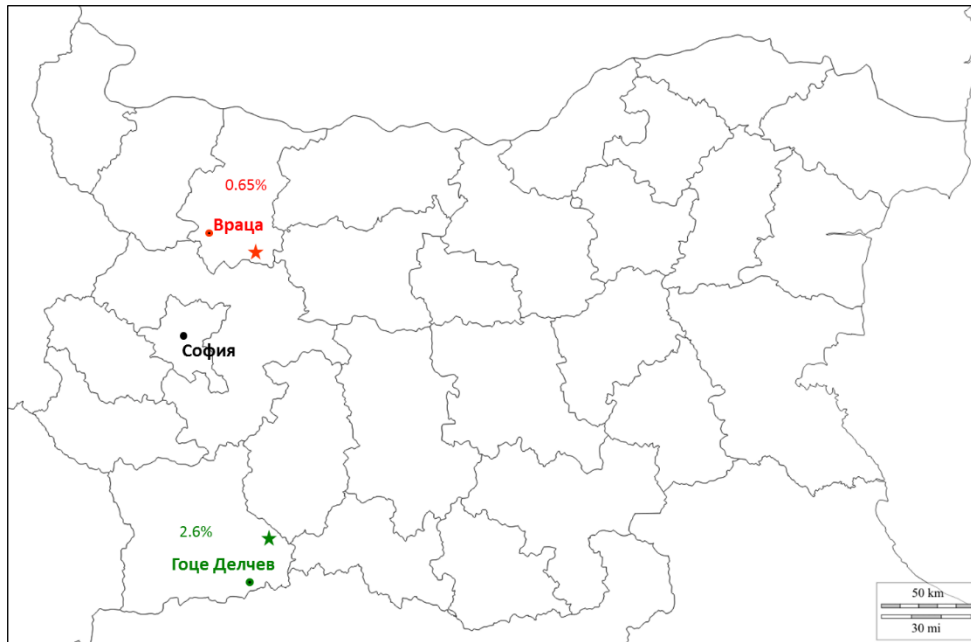
При двете семейства, при които не бяха открити патологични изменения в гена *CLCN1*, беше секвениран и генът *SCN4A*. Дефекти в него са докладвани при пациенти с миотония конгенита тип Томпсън. Доминантното унаследяване на това заболяване обаче е причината генетичният анализ на *SCN4A* гена да не е обект на дадената дисертация. Все пак с цел изясняване на диагнозата при тези две семейства, можем да споменем, че резултатите отново бяха отрицателни, предполагайки необходимостта от преразглеждане на клиничната диагноза.

При семейство 5 също секвенирахме гена *SCN4A* с цел потвърждаване, че откритият непубликуван до момента *CLCN1* вариант наистина е мутацията, отговорна за изява на заболяването. Доминантният модел на унаследяване на *SCN4A* би съответствал на родословието. Все пак не бяха открити патологични изменения в кодиращите части на целия *SCN4A* ген, което потвърждава, че наистина новата p.Tyr524Cys замяна причинява клиничната картина при пациента.

### **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, при това 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 16):

- Северозападна България – област Мездра
- Югозападна България – област Гоце Делчев.



**Фигура 16. Предполагаеми ендемични региони в България за миотония конгенита тип Бекер.**

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, р.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: р.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, р.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 р.Tyr524Cys и 107 за р.Val273Met.

- **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, р.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. Директно 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 17).



**Фигура 17.** Резултати от мутационния скрининг в регион Мездра по отношение на мутация p.Tyr524Cys. Установена е значителна носителска честота – 0.65%.

- **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). 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 с.817G>A, p.Val273Met мутацията, което отговаря на носителска честота около 2.59% (3/116) – Фигура 18. 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 18. 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. ДВЕ АВТОЗОМНО РЕЦЕСИВНИ НЕВРОМУСКУЛНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ В ЕДНО СЕМЕЙСТВО

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 пояс-крайник тип 2А (Калпаинопатия, Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2A, LGMD2A).

- **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. Причинява се от мутации в *FXN* гена (MIM 606829), локализиран на 9q21.11. 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].

- **Мускулна дистрофия пояс-крайник тип 2А (Калпаинопатия)**

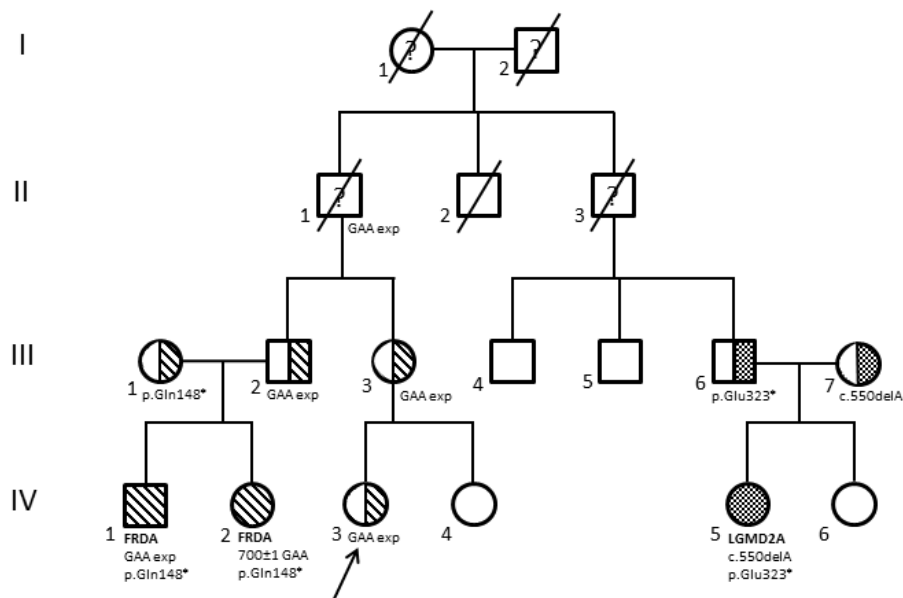
Мускулна дистрофия пояс-крайник тип 2А (MIM 253600) е автозомно рецесивно невромускулно заболяване, изявяващо се с прогресивна проксимална (пояс-крайник) мускулна слабост. Калпаинопатията се дължи на мутации в *CAPN3* гена (MIM 114240), локализиран на 15q15.1 [Beckmann *et al.*, 1991].

- **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.

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 19 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.

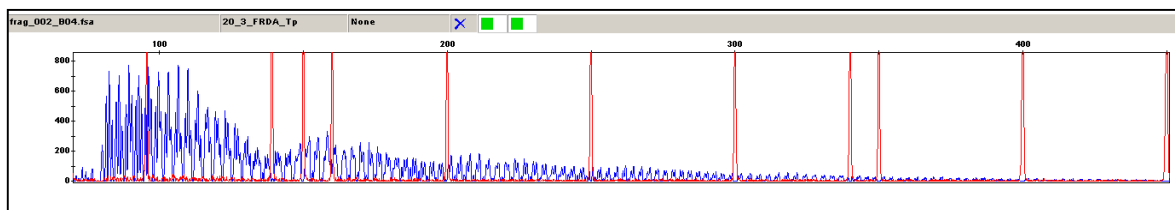


**Фигура 19. Родословно дърво на семейството с две автозомно рецесивни невромускулни заболявания.** Използвани са следните символи: раиран – FRDA засегнат индивид, на половина раиран – носител на FRDA, точкуван символ – LGMD2A засегнат индивид, на половина точкуван – LGMD2A носител; индивидите с неясен генотип са представени с въпросителен знак.

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.

- **Молекулярно-генетичен анализ**

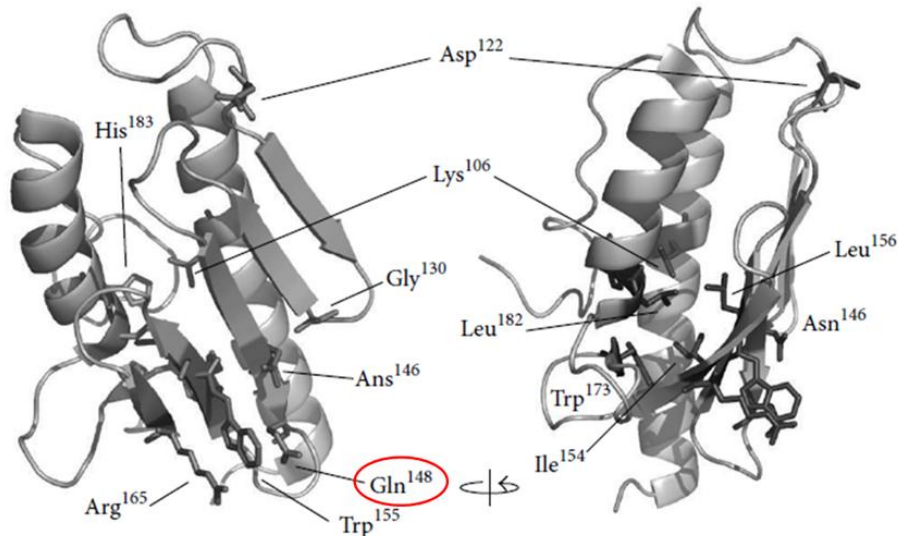
Общо от това родословие на генетичен анализ бяха подложени 6 души, съответно за различни гени в зависимост от клиничната диагноза и преките засегнати родственици. Молекулярно-генетичният анализ при FRDA пациентите (IV-1, IV-2) показва, че и двамата са носители на GAA експанзията в интрон 1, която обичайно 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 20).



**Фигура 20.** Електрофореграма на TP-PCR, показваща наличие на GAA експанзия в интрон 1 на *FXN* гена.

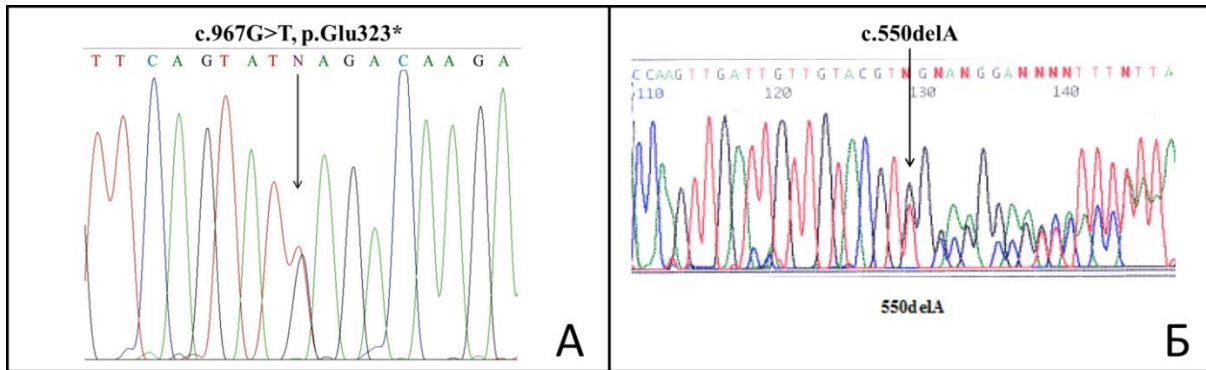
При едва 2 % от FRDA пациентите заболяването се дължи на носителство на хетерозиготна GAA експанзия в *FXN* гена в комбинация с точкова мутация в същия ген [Camruzano, 1996]. Това семейство е първият докладван случай на български пациент с атаксия на Фридрайх с *FXN* точкова мутация. За значимостта на 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]. 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).



**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\*.

При пациентката с мускулна дистрофия пояс-крайник тип 2A 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: с.550delA, p.Thr184Argfs в екзон 4, унаследена от майката на пациентката (III-7) и с.967G>T, p.Glu323\* в екзон 7 на *CAPN3* гена, унаследена от бащата (III-6). Секвенционните профили са показани на Фигура 22. Тези две мутации са най-честите *CAPN3* дефекти за българската популация [Todorova *et al.*, 2007].



**Фигура 22.** Секвенционен профил на част от *CAPN3* гена в областта на А. с.967G>T, p.Glu323\*; Б. с.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. 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 оказва, 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, които за съжаление не дадоха съгласието си за участие в настоящото проучване. Екипът ни изследва *LGMD2A* пациентката за GAA експанзията и тя се оказва 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).

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. Скрытият характер на автозомно рецесивните заболявания позволява те 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, както виждаме и в конкретния случай.

## ЗАКЛУЧЕНИЕ

Настоящият дисертационен труд 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, 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, 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. 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. Интересът към редките болести обаче се поражда от факта, че взети заедно всички редки заболявания всъщност са много сериозен здравен проблем за човечеството. Търсене на общите щрихи в невероятно 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 ни насочва към традиционния смисъл на генетиката – идентификация на наследствения фактор, причиняващ заболяването, и превенция за бъдещите поколения.

## ИЗВОДИ

- 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.

- 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.

- 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.

- 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.

- 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.

- 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%).

- 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.

## БИБЛИОГРАФИЯ

## Чуждоезична література

1. Becker P, Knussmann R, Kühn E. (1977) Myotonia congenita and syndromes associated with myotonia: clinical-genetic studies of the nondystrophic myotonias. Thieme.
2. Becker P. (1966) Zur Genetik der Myotonien. In Kuhn, Erich. Progressive Muskeldystrophie Myotonie · Myasthenie. 247–55.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.*
8. 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.
9. Ebinger M, Schütze C, König S. (1999) Demographics and diagnosis of pyridoxine-dependent seizures. *J Pediatr.* 134:795–6.
10. 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.
11. Gomes C. M., Santos R. (2013) Neurodegeneration in Friedreich's Ataxia: From Defective Frataxin to Oxidative Stress. *Oxid. Med. Cell Longev.* 487534
12. Hofer S, Frahm J. (2006) Topography of the human corpus callosum revisited—comprehensive fiber tractography using diffusion tensor magnetic resonance imaging. *Neuroimage.* 32: 989–94.
13. Hurst J, Firth H, Hall J. (2013) Oxford Desk Reference Clinical Genetics.
14. Lehmann-Horn F, Rüdell R. (1996) Molecular pathophysiology of voltage-gated ion channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 128:195–268.
15. Lehmann-Horn R. (1985) Membrane changes in cells from myotonia patients. *Physiol Rev*65:310–356.
16. Liu XL, Huang XJ, Shen JY *et al.* (2015) Myotonia congenita: novel mutations in CLCN1 gene. *Channels (Austin).* 9(5):292-8
17. 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.
18. Lossin C, George A Jr. (2008) Myotonia congenita. *Advances in genetics* 63:25-55.
19. 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.
20. Mills P, Footitt E, Mills K *et al.* (2010) Genotypic and phenotypic spectrum of pyridoxine-dependent epilepsy (ALDH7A1 deficiency). *Brain.* 133:2148–59.
21. Mills P, Struys E, Jakobs C *et al.* (2006) Mutations in antiquitin in individuals with pyridoxine-dependent seizures. *Nat Med* 12(3):307–309.

22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Sun C, Tranebjaerg L, Torbergsen 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.
28. Thomsen J. (1876) Tonische Krämpfe in willkürlich beweglichen Muskeln in Folge von ererbter psychischer Disposition. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten.* 6 (3): 702–18.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. Zhang J, Bendahhou S, Sanguinetti M, Ptacek L. (2000) Functional consequences of chloride channel gene (CLCN1) mutations causing myotonia congenita. *Neurology.* 54:937–42.

### Българска литература

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

### Електронни източници

1. Coffalyser.Net. <https://coffalyser.wordpress.com/>
2. Leiden Open Variation Database. <http://www.lovd.nl>
3. Louisiana State University School of Medicine in New Orleans. <http://www.medschool.lsuhs.edu>
4. MRC-Holland. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MLPA. [www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)
5. National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
6. National Organization for Rare Disorders (NORD). <https://rarediseases.org/rare-diseases/>
7. The Human Gene Mutation Database. <http://www.hgmd.org/>

## ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### • 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 *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
3. **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. Импакт фактор: 3.107

**ОБЩ ИМПАКТ ФАКТОР: 4.890**

### • 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.

### • 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.