

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

СЛАВЕНА ХРИСТОВА АТЕМИН

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

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

Проф. Албена Първанова Годорова – Георгиева, дбн

София, 2022

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

Цитирани са 98 литературни източника и 11 електронни източника.

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

Включените в дисертацията изследвания са извършени в:

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

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

СЪДЪРЖАНИЕ

| | |
|--|----|
| Използвани съкращения..... | 1 |
| Резюме | 3 |
| Summary..... | 5 |
| Въведение | 7 |
| 1. Литературен обзор..... | 8 |
| 1.1. Неврологични заболявания | 10 |
| 1.1.1. Неврологични заболявания с гърчова симптоматика..... | 10 |
| 1.1.1.1. <i>IRF2BPL</i> -свързани заболявания..... | 11 |
| 1.1.1.2. <i>NARS1</i> -свързани заболявания..... | 13 |
| 1.1.1.3. <i>TPP1</i> -свързани заболявания | 15 |
| 1.1.1.4. <i>ARG1</i> -свързани заболявания..... | 16 |
| 1.1.1.5. <i>FH</i> -свързани заболявания | 18 |
| 1.1.1.6. <i>PEX1</i> и <i>PEX6</i> -свързани заболявания | 20 |
| 1.1.2. Невромускулни заболявания | 22 |
| 1.1.2.1. <i>MYH7</i> -свързани заболявания | 22 |
| 1.1.2.2. <i>TWINK</i> -свързани заболявания..... | 24 |
| 1.1.2.3. <i>UNC80</i> -свързани заболявания | 25 |
| 1.1.2.4. <i>SCO2</i> -свързани заболявания..... | 27 |
| 1.2. Офталмологични заболявания | 30 |
| 1.2.1. <i>CRB1</i> -свързани заболявания..... | 31 |
| 1.2.2. <i>CEP290</i> -свързани заболявания..... | 32 |
| 1.2.3. <i>USH2A</i> -свързани заболявания | 35 |
| 1.2.4. Наследствена оптична невропатия на Leber | 36 |
| 2. Цел и задачи..... | 39 |
| 2.1. Цел | 39 |
| 2.2. Задачи | 39 |
| 3. Материали и методи..... | 40 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 3.1. | Материали | 40 |
| 3.1.1. | Клиничен материал | 40 |
| 3.1.2. | Биологичен материал | 41 |
| 3.2. | Методи..... | 42 |
| 3.2.1. | Преданалитична обработка на материала..... | 42 |
| 3.2.1.1. | Изолиране на високомолекулна ДНК от периферна кръв по солеви метод..... | 42 |
| 3.2.1.2. | Изолиране на високомолекулна ДНК от материал, получен след хорионбиопсия, амниоцентеза, както и от букална лигавица | 43 |
| 3.2.1.3. | Изолиране на високомолекулна ДНК от урина..... | 43 |
| 3.2.1.4. | Изолиране на ДНК от филтърни бланки с помощта на dried blood spot (DBS) DNA isolation kit от NORGEN..... | 43 |
| 3.2.1.5. | Директна спектрофотометрия | 43 |
| 3.2.2. | Аналитична обработка на материала | 44 |
| 3.2.2.1. | Секвениране от ново поколение (NGS)..... | 44 |
| 3.2.2.2. | Полимеразна верижна реакция (ПВР, polymerase chain reaction; PCR) | 46 |
| 3.2.2.3. | Електрофореза в агарозен гел | 49 |
| 3.2.2.4. | Директно секвениране по Sanger с флуоресцентно белязани дидезоксинуклеотиди | 50 |
| 3.2.3. | Литературни бази данни, както и <i>in silico</i> предиктори, използвани в хода на изработване на настоящия дисертационен труд..... | 52 |
| 4. | Резултати и обсъждане | 53 |
| 4.1. | Неврологични заболявания | 53 |
| 4.1.1. | Неврологични заболявания с гърчова симптоматика | 56 |
| 4.1.1.1. | <i>IRF2BPL</i> -свързани заболявания | 56 |
| 4.1.1.2. | <i>NARS1</i> -свързани заболявания..... | 60 |
| 4.1.1.3. | <i>TPP1</i> -свързани заболявания | 66 |
| 4.1.1.4. | <i>ARG1</i> -свързани заболявания..... | 70 |
| 4.1.1.5. | <i>FH</i> -свързани заболявания | 79 |
| 4.1.1.6. | <i>PEX1</i> и <i>PEX6</i> -свързани заболявания | 83 |
| 4.1.2. | Невромускулни заболявания | 92 |
| 4.1.2.1. | <i>MYH7</i> -свързани заболявания | 92 |
| 4.1.2.2. | <i>TWNK</i> -свързани заболявания..... | 100 |

| | |
|---|-----|
| 4.1.2.3. <i>UNC80</i> -свързани заболявания | 104 |
| 4.1.2.4. <i>SCO2</i> -свързани заболявания..... | 108 |
| 4.2. Офталмологични заболявания | 112 |
| 4.2.1. <i>CRB1</i> -свързани заболявания..... | 113 |
| 4.2.2. <i>CEP290</i> -свързани заболявания..... | 117 |
| 4.2.3. <i>USH2A</i> -свързани заболявания | 121 |
| 4.2.4. Наследствена оптична невропатия на Leber | 125 |
| 4.3. Обобщение на резултатите и заключение..... | 130 |
| 5. Изводи | 131 |
| 6. Приноси..... | 133 |
| 7. Публикации и научни прояви във връзка с дисертационния труд..... | 134 |
| 7.1. Публикации във връзка с дисертационния труд | 134 |
| 7.2. Научни прояви във връзка с дисертационния труд..... | 135 |
| 8. Библиография | 137 |
| 8.1. Чуждоезична литература | 137 |
| 8.2. Електронни източници..... | 144 |

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

NGS – next generation sequencing/секвениране от ново поколение

WES – whole exome sequencing/цялостно екзомно секвениране

WGS – whole genome sequencing/цялостно геномно секвениране

CES – clinical exome sequencing/клинично екзомно секвениране

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

РНК – рибонуклеинова киселина

тРНК – транспортна РНК

иРНК – информационна РНК

мтДНК – митохондриална ДНК

ПВР/PCR – полимеразна верижна реакция/polymerase chain reaction

bp – нуклеотидни двойки/base pairs

ЕДТА – етилен диамин тетраацетат/EDTA

DMSO – диметилсулфоксид

дНТФ – дезоксинуклеотидтрифосфати

ддНТФ – дидезоксинуклеотидтрифосфати

PBD - нарушения на пероксизомната биогенеза/peroxisome biogenesis disorders

ZSD - заболявания от спектъра на Zellweger/Zellweger spectrum disorders

МНС-β - бета миозиновата тежка верига/beta (β)-myosin heavy chain

LMM - лек меромиозин домен/light meromyosin domain

LCA - вродена амавроза на Leber

SLS - синдром на Senior-Loken

JS - синдром на Joubert

JS+RD - синдром на Joubert, асоцииран с ретинопатия

JS+RF - синдром на Joubert, асоцииран с бъбречна недостатъчност

CORS - cerebello-oculo-renal синдром

MKS - синдром на Meckel-Gruber

MKS-like - Meckel-Gruber подобен синдром

BBS - синдром на Bardet-Biedl

LHON - наследствената оптична невропатия на Leber

NMD - nonsense-mediated decay

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

AMP – Асоциация за молекулярни патологии/Association for Molecular Pathology

MIM – OMIM/ Online Mendelian Inheritance in Men

SDS - натриев додецил сулфат

АТФ/АТР - аденозинтрифосфат

РЕЗЮМЕ

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

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

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

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

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

На база на проведените молекулярно-генетични изследвания бяха открити редица непубликувани в световната литература генетични варианти, което показва високата хетерогенност на пациентите от български произход. Обособихме ендемичен ромски регион (региона на с.Осиковица) за заболяването аргиназен дефицит в България. Доказахме

честота от 1% на хетерозиготно носителство на варианта с.329+1G>A в *ARG1* гена при роми от региона на с.Осиковица.

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

SUMMARY

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

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

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

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

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

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

ВЪВЕДЕНИЕ

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

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

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

1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

С напредването на молекулярно-генетичната диагностика много методи се откриха като златен стандарт за поставянето на ясна и точна генетична диагноза. В зависимост от клиничната картина при таргетния пациент, избираме най-правилния молекулярно-генетичен подход с цел верифициране на заболяването на молекулно ниво. В настоящия дисертационен труд ще се спрем на два от методите, които позволяват детектирането на точкови замени и малки делеции/дупликации по дължината на изследваните гени.

Един от тези методи е класическото секвениране по Sanger, чрез който се определя нуклеотидната последователност на участък от ДНК, използвайки флуоресцентно белязани дидезоксинуклеотидтрифосфати. Класическото секвениране по Sanger е изключително удобен и бърз метод, когато имаме ясна генетична диагноза, която се дължи на патогенни варианти (точкови замени и малки делеции/дупликации) в единични гени. В такива случаи използването на този метод би позволило бързо и своевременно откриване на генетичната причина за поставената клинична диагноза.

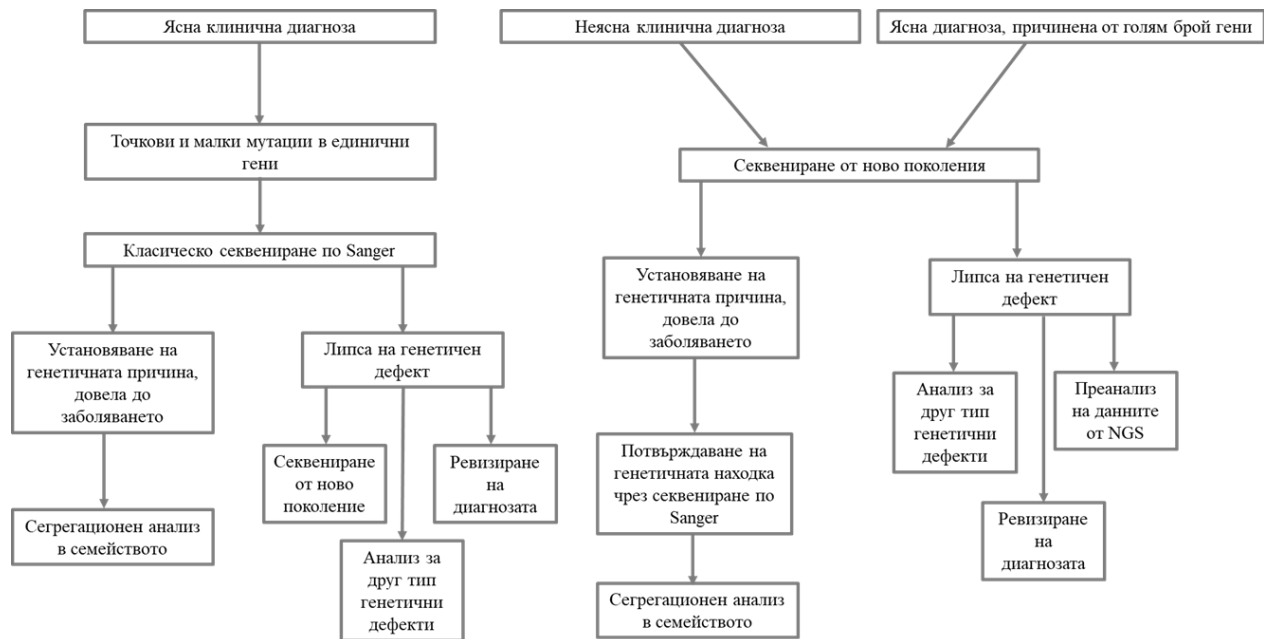
Когато нямаме ясна диагноза, или патогенни варианти в различни гени са отговорни за дадено клинично състояние, секвенирането по Sanger не е най-подходящият метод за генетично верифициране на диагнозата. Тогава на помощ идва секвенирането от ново поколение (Next Generation Sequencing – NGS), тъй като при него могат да се анализират едновременно няколко гена (панел от гени), вместо стандартния подход ген-по-ген, както е при класическото секвениране по Sanger.

Съществуват редица NGS платформи като общото между тях е, че се осъществява паралелно секвениране на милиони малки застъпващи се фрагменти от ДНК. След провеждане на секвенирането идва ред на биоинформатичния анализ, който позволява сглобяване на всички получени фрагменти и сравняването им спрямо човешкия референтен геном. В зависимост от броя гени, патогенни варианти в които са отговорни за конкретното заболяване, секвенирането от ново поколение може да се използва за анализ на целия геном (Whole genome sequencing - WGS), за анализ само на кодиращите последователности на генома (цялостно екзомно секвениране; Whole exome sequencing- WES), за анализ само на

клинично значими гени (клинично екзомно секвениране, Clinical exome sequencing – CES) или анализ на тергетно подбран панел от гени (Behjati and Tarpey, 2013).

Чрез секвениране от ново поколение може да се установи наличие на точкови замени, малки инсерции, делеции или дупликации по дължината на анализирани гени. Недостатък на метода е че има участъци от гените, които не са добре покрити и за да се изключи наличието на патогенни варианти в тези региони трябва да се проведе класическо секвениране по Sanger на непокритите участъци. Препоръчително е всяка една генетична находка, която е идентифицирана посредством NGS, да бъде верифицирана и с класическо секвениране по Sanger. В допълнение към тази стъпка е провеждане на сегрегационен анализ в семейството, който би внесъл яснота в механизма на унаследяване на тергетния генетичен вариант.

Базирайки се на казаното до тук може да обобщим стъпките, които трябва да бъдат предприети при подбиране на най-правилния метод за диагностика при таргетните пациенти (Фигура 1).



Фигура 1: Схематично представяне на молекулярно-генетичния подход при диагностиката на генетични заболявания.

Гореописаните молекулярно-генетични методи са изключително полезни за изясняване на генетичната причина, довела до изява на патологичните клинични състояния при таргетните пациенти. Основните групи заболявания, които ще разгледаме в настоящия дисертационен труд са: неврологични и офталмологични.

1.1. Неврологични заболявания

Това са група заболявания, които се характеризират със засягане на периферната и/или централната нервна система, в резултат на нарушено предаване на електрическите импулси. Част от клиничните симптоми на неврологичните заболявания могат да включват: намалена функция на двигателната система, засягане на когнитивните функции, изоставане в развитието, гърчове и др. Имайки предвид широкото разпространение на различните неврологични заболявания и тежкото засягане, с което могат да бъдат изявени, установяването на етиологията и патофизиологията им е от особена значимост за таргетните пациенти и засегнатите семейства. С напредването на молекулярната диагностика се появиха все повече доказателства за участието на различни генетични фактори, както и фактори на околната среда в патогенезата на неврологичните заболявания. При част от тях имаме ясна генетична етиология напр. болест на Wilson, болест на Huntington, синдром на чуплива X хромозома и др. При други неврологични заболявания различни фактори (генетични и фактори на околната среда) могат да допринасят за развитието на болестта. Такива са болест на Alzheimer, болест на Parkinson, прионовни болести и др. (Faghihi, M. A., Mottagui-Tabar, S., & Wahlestedt, 2004).

1.1.1. Неврологични заболявания с гърчова симптоматика

Епилепсията е хетерогенно неврологично заболяване, което се характеризира с повтарящи се гърчове с мозъчен произход. Това е едно от най-честите неврологични състояния в световен мащаб, като честотата му е оценена на 5-10 на 1000 човека и 50-120 на 100 000 човека годишно (Massimo Pandolfo, 2011). Счита се, че около 3-5% от населението са имали гърчове в даден етап от живота си, докато 0.5-1% от населението имат активна епилепсия (Abramović and Bagić, 2016). Около 60% от всички епилепсии са идиопатични или с неясен произход. Въпреки това има редица рискови фактори, които влияят върху проявата на гърчове. В това число влизат различни инфекции, мозъчни

малформации, мозъчни тумори и др. При някои вродени дефекти, като церебрална парализа и интелектуален дефицит, се наблюдава по-висок риск от проява на епилепсия.

Класификацията на епилепсиите спрямо генетичния принос към тяхната етиология е: моногенна епилепсия (причинена от мутация/мутации в единичен ген) и мултифакторна епилепсия (дължаща се на взаимодействие между няколко генетични варианта и фактори на околната среда) (Massimo Pandolfo, 2011). Честотата на моногенните епилепсии е много малък процент 1-2% спрямо мултифакторните, които са значително по-чести.

В тази връзка, откриването на нови гени, патогенни варианти в които се асоциират с епилепсия, биха обогатили световните бази данни и биха допринесли за изясняване на генетичната причина за проявата на това клинично състояние при редица пациенти.

При епилептичните синдроми може да се наблюдават всички типове на унаследяване (автосомно-доминантно, автосомно-рецесивно и X-свързано). Особен интерес представлява това, че при част от тях се наблюдава непълна пенетрантност, както и различна изява на заболяването при засегнатите индивиди от едно и също семейство. Това може да се дължи на участието на други генетични фактори, както и фактори на околната среда, като най-вероятното обяснение е т.нар. праг на епилепсията, който представлява баланса между възбуждащите и инхибиращите сигнали в мозъка (Oh and Bainbridge, 2012). Точният праг, при който може да се провокира епилептичен гърч е строго индивидуален при всеки човек. Трябва да се има предвид това, че високата концентрация на възбуждащи сигнали и/или ниска концентрация на инхибиторни сигнали увеличава чувствителността към гърчове.

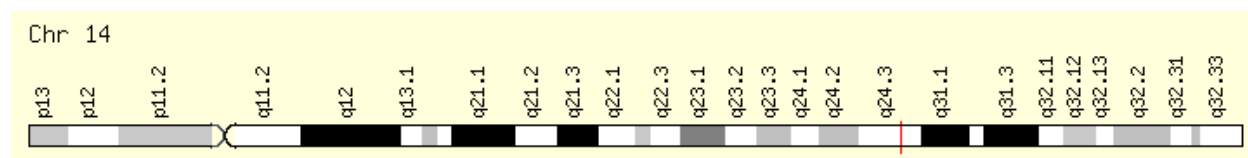
Повече от 900 гена са описани в асоциация с епилептични синдроми (Wang *et al.*, 2017). Патогенни варианти в тези гени могат да водят до проява само на епилепсия или до заболявания, при които епилепсията е основен и водещ симптом, но в допълнение биха могли да се изявят и други клинични характеристики.

Обект на настоящия дисертационен труд са заболявания с вариабилна неврологична симптоматика, но общото при всички е наличието на гърчова симптоматика.

1.1.1.1. *IRF2BPL*-свързани заболявания

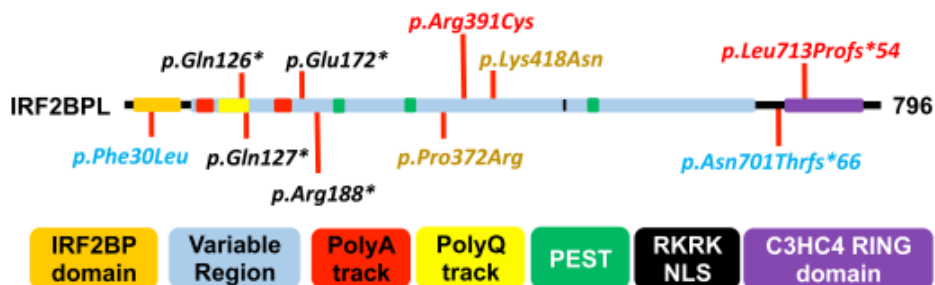
IRF2BPL-свързаните заболявания са с автосомно-доминантен модел на унаследяване, като клиничните им характеристики включват: нарушение в неврологичното развитие, регресия, аномални движения, нарушение в говора, както и наличие на гърчове (MIM#

618088). Освен тези клинични прояви, при пациентите с *IRF2BPL*-свързани заболявания, може да се наблюдават и аномалии в движението на очите, нистагъм, интелектуален дефицит, невъзможност за ходене, атаксия, спастичност и др. Патогенни варианти в гена *IRF2BPL* водят до описаните симптоми (MIM* 611720). Той е локализиран на дългото рамо на 14-та хромозома (14q24.3) (Фигура 2), като се експресира в редица органи включително централната нервна система (Marcogliese *et al.*, 2018).



Фигура 2: Локализация на гена *IRF2BPL* върху дългото рамо на 14-та хромозома (14q24.3) (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IRF2BPL>).

Белтъкът (*IRF2BPL*), кодиран от *IRF2BPL* гена е изграден от 796 аминокиселинни остатъка. Структурата му включва два високо консервативни домена в N и С краищата на белтъка, съответно IRF2BP zinc finger и C3HC4 RING finger. Във вариабилната част на белтъка има множество полиаланинови и PEST последователности, както и полиглутаминов тракт (Фигура 3).



Фигура 3: Схематично представяне на белтъчния продукт на гена *IRF2BPL*, заедно с част от описаните към момента патогенни варианти (Marcogliese *et al.*, 2018).

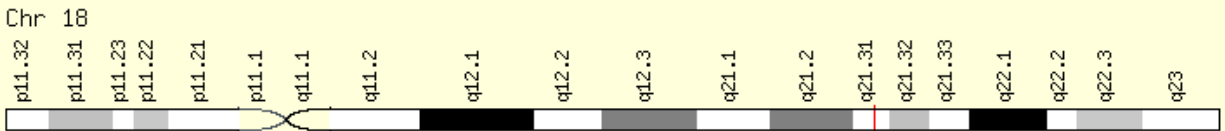
Особен интерес представлява доменът C3HC4 RING finger. Такъв тип домен е характерен за членовете на семейството на E3 лигазите. C3HC4 RING finger участва в

убиквитинирането на субстрати, които са таргетни за разграждане (Tran Mau-Them *et al.*, 2019). Дерегулацията на E3 убиквитин лигазите или натрупването на неразградени убиквитинирани белтъчни агрегати водят до невродегенеративни заболявания или епилептични енцефалопатии (Tran Mau-Them *et al.*, 2019). C3HC4 RING finger доменът е необходим и за авторегулацията на *IRF2BPL*, тъй като *IRF2BPL* потиска собствената си транскрипция. Делеция на RING finger домена води до премахване на транскрипционната репресия в невронни и други клетки, което води до нерегулирана транскрипция на гена.

Различен тип генетични дефекти, засягащи гена *IRF2BPL*, са описани към момента (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>). Между тях се срещат missense, nonsense, frameshift варианти, както и делеции и дупликации, обхващащи гена. При пациентите с *IRF2BPL*-свързани заболявания се наблюдават неврологични симптоми с различна тежест, като епилепсията е характерна за почти всички пациенти. Вариабилната клинична симптоматика може да се дължи на типа на генетичните варианти, които се откриват при таргетните пациенти. Особено впечатление правят nonsense мутациите, които се асоциират с прогресивна регресия в неврологичното развитие, спастичност, както и двигателни нарушения (Marcogliese *et al.*, 2018). Всички генетични варианти, които водят до скъсяване на белтъка, най-вероятно имат влияние върху C-терминалния RING finger на *IRF2BPL*. Това може да обясни по-тежката клинична изява, наблюдавана при пациентите с такъв тип генетични дефекти.

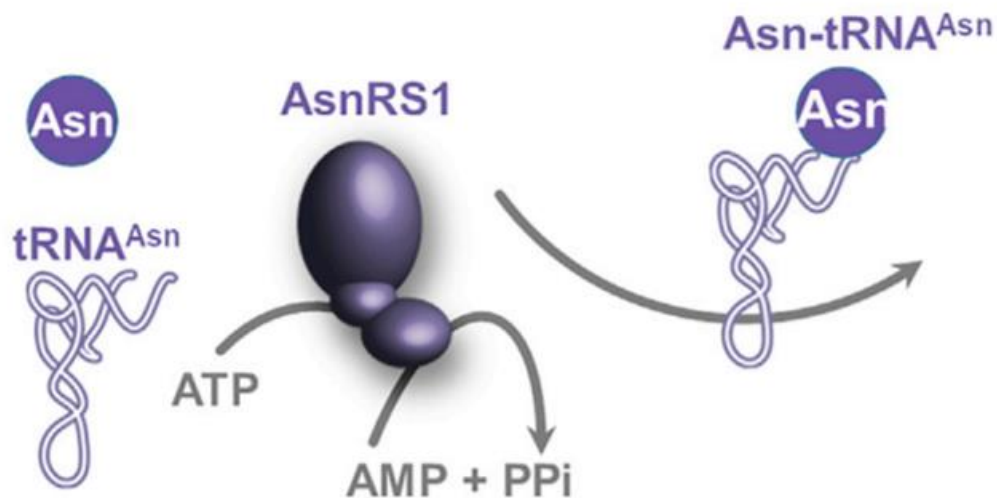
1.1.1.2. *NARS1*-свързани заболявания

NARS1-свързаните заболявания се характеризират с нарушение в неврологичното развитие, микроцефалия, изоставане в говорното развитие, аномалии в походката, хипотония, гърчове и др. (MIM# 619091, MIM# 619092). Хетерозиготни, хомозиготни или двойно хетерозиготни варианти в гена *NARS1* (MIM* 108410), още известен като *NARS*, са причина за изява на тези клинични състояния. Генът е локализиран на дългото рамо на 18-та хромозома (18q21.31) (Фигура 4), като белтъчният продукт на гена е цитоплазмена аспарагинил-тРНК синтетаза (EC 6.1.1.22).



Фигура 4: Локализация на гена *NARS1* върху дългото рамо на 18-та хромозома (18q21.31) (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NARS1>).

Аминоацил-тРНК синтетазите са ензими, които осъществяват правилното свързване на аминокиселините със съответните им транспортни РНК-и (тРНК) както в цитоплазмата, така и в митохондриите. За всяка аминокиселина отговаря точно определена аминокацил-тРНК синтетаза. Аспарагинил-тРНК синтетазата свързва аминокиселината аспарагин (Asn) с правилната ѝ тРНК, процес който е от съществено значение за белтъчната синтеза (Wang *et al.*, 2020). В реакция от две стъпки аспарагинил-тРНК синтетазата образува аспарагинил-тРНК^{Asn}. Първата стъпка е катализирането на АТФ-зависимо активиране на аспарагина в Asn~АМФ с отделяне на пирофосфат. Следващата стъпка е трансферът на активирания аспарагин върху тРНК^{Asn} с освобождаване на АМФ (Фигура 5) (Manole *et al.*, 2020).



Фигура 5: Образуване на аспарагинил-тРНК^{Asn}, посредством аспарагинил-тРНК синтетазата, кодирана от *NARS1* гена (Manole *et al.*, 2020).

Към момента в световната литература са описани около 50 пациента с *NARS1*-свързани заболявания, което предполага ниска честота на тези състояния в световен мащаб. Интерес представлява и оскъдната бройка (по-малко от 30) на доказани патологични варианти в *NARS1* гена (Manole *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Това дава индикация, че

заболяванията, свързани с патогенни варианти в *NARSI*, не са добре изучени на молекулярно-генетично ниво. Въпреки това Manole *et al.*, 2020 обособяват региона в близост до края на гена, като “горещ регион“ за възникване на генетични дефекти.

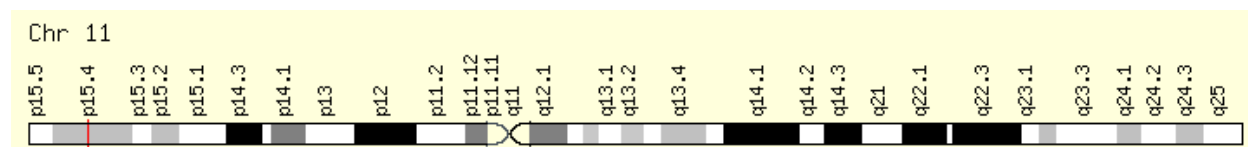
1.1.1.3. *TPP1*-свързани заболявания

Това са група заболявания, които включват автозомно-рецесивните невронална цероид липофускиноза 2 (MIM# 204500) и спиноцеребеларна атаксия 7 (MIM# 609270).

Невронална цероид липофускиноза 2 е лизозомна болест на натрупването. Клиничните симптоми на заболяването включват прогресивна загуба на зрението, регресия в развитието след двегодишна възраст, нарушение в говора, атаксия, трудно овладяеми гърчове, миоклонус, церебрална атрофия и др. Повечето пациенти с тази диагноза умират през второто десетилетие от живота си (Golabek *et al.*, 2003).

Другото *TPP1*-свързано заболяване е спиноцеребеларна атаксия 7, което се характеризира със засягане на централната нервна система. Церебеларна атаксия, засягане на очите, затруднение в походката и дизартрия са едни от водещите симптоми при това клинично състояние (Dy, Sims and Friedman, 2015).

Патогенни варианти, засягащи гена *TPP1* (MIM* 607998) са причина за проява на заболяванията. Генът е локализиран на късото рамо на хромозома 11 (11p15.4) (Фигура 6).



Фигура 6: Локализация на гена *TPP1* върху късото рамо на 11-та хромозома (11p15.4) (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TPP1>).

Разграждането на полипептидите се осъществява с участието на ендо- и екзопептидази. Като резултат се получават свободни аминокиселини и дипептиди, които се използват в клетъчната цитоплазма спрямо метаболитните нужди на клетката.

Белтъчният продукт на гена *TPP1* е трипептидил-пептидаза I (ЕС 3.4.14.9), която е лизозомна екзопептидаза, отстраняваща последователно трипептидите от N краищата на полипептидите (субстратите). Освен това тя има и малка ендопептидазна активност (Golabek *et al.*, 2005). Трипептидил-пептидаза I е изградена от 563 аминокиселинни

остатъка, включващи сигнална последователност, изградена от 19 аминокиселини, както и 176 аминокиселинен пропептид, който се отстранява по време на процеса на зреене. В резултат на това се получава зрелият ензим, изграден от 368 аминокиселинни остатъка. Трипептидил-пептидаза I е единствената хидролаза, описана при бозайниците, която има трипептидил-пептидазна активност. Интересното за този ензим е, че той не се експресира в мозъка по време на ембрионалното развитие, а едва на възраст от 5 месеца, като достига стабилни нива след около 3-годишна възраст. Именно на това се дължи и по-късната форма на изява на заболяванията, дължащи се на нарушена функция на ензима трипептидил-пептидаза I (Sun *et al.*, 2013).

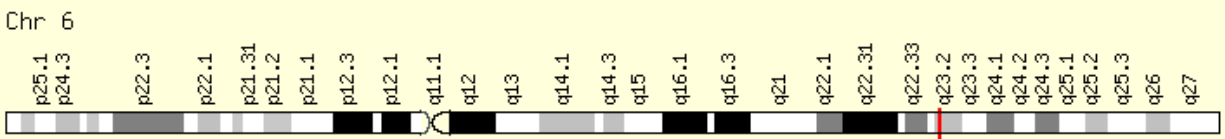
Повече от 100 патогенни варианта в гена *TPP1* са доказани при пациентите с *TPP1*-свързаните заболявания. Описаните генетични дефекти включват missense, nonsense, инсерции, делеции и splice site варианти. Между тях се открояват две мутации (p.Arg208Ter и c.509-1G>C), които се срещат с висока честота при пациентите с *TPP1*-свързани заболявания. Повечето описани генетични варианти водят до много намалена или липсваща ензимна активност (Sun *et al.*, 2013). При нарушена функция на трипептидил-пептидаза I се натрупват протеини или пептиди и други вещества в лизозомите. Тези натрупвания се наблюдават във всички клетки, но има данни, че нервните клетки са особено уязвими към тяхното въздействие. Натрупванията могат да причинят увреждане на клетките, което да доведе до клетъчна смърт. Клетъчната смърт на нервните клетки в мозъка, както и на клетките в други тъкани, са именно причината за наблюдаваната клинична симптоматика при *TPP1*-свързаните заболявания.

Разликата между цероид липофусциноза 2 и спиноцеребеларна атаксия 7 е в това, че при пациентите със спиноцеребеларната атаксия се наблюдават по-високи нива от нормално функциониращия ензим. На това се дължи и по-лекото засягане на пациентите със спиноцеребеларна атаксия 7 в сравнение с цероид липофусциноза 2, при които се наблюдават много ниски нива на трипептидил-пептидаза I.

1.1.1.4. *ARG1*-свързани заболявания

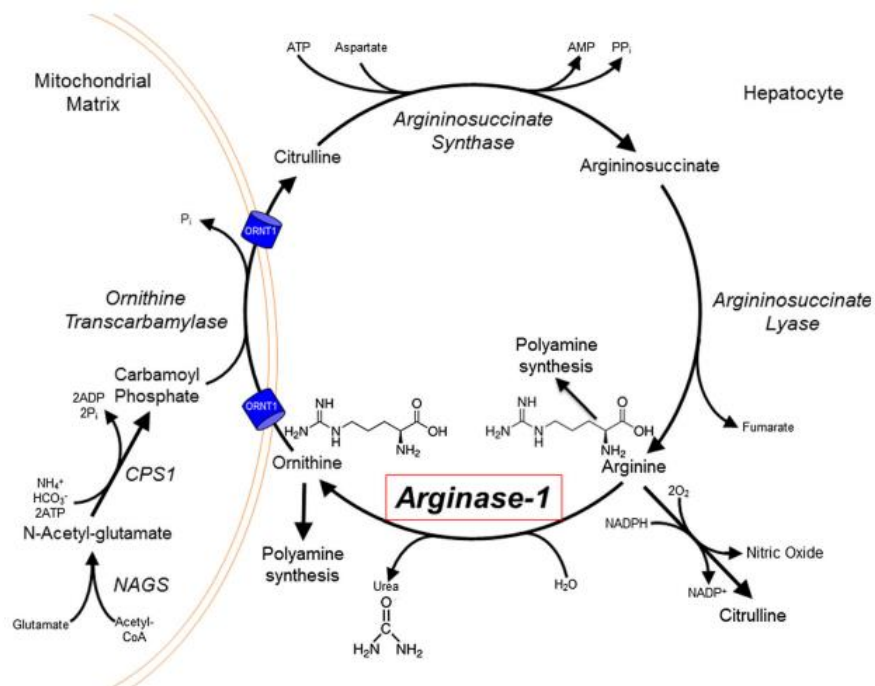
Аргиназният дефицит (Аргининемия) (MIM# 207800) е автозомно-рецесивно заболяване, което се дължи на дефект в последната стъпка от урейнния цикъл – хидролизата на аргинин до урея и орнитин (Ash *et al.*, 1998; Iyer *et al.*, 1998). При пациентите с аргиназен

дефицит се наблюдават епизодична хиперамонемия, изоставане в растежа, спастична тетраплегия, интелектуален дефицит, прогресивно неврологично засягане, гърчове и др. (Ash *et al.*, 1998; Sin *et al.*, 2015). Честотата на заболяването в общата популация е изчислена между 1:350,000 и 1:1,000,000 (Angela Sun, Eric A Crombez, 2021). Патогенни варианти в гена *ARG1* (MIM* 608313), локализиран на дългото рамо на 6-та хромозома (6q23.2) (Фигура 7), са причина за изява на заболяването.



Фигура 7: Локализация на гена *ARG1* върху дългото рамо на 6-та хромозома (6q23.2) (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ARG1>).

Белтъчният продукт на гена е ензимът аргиназа-1 (EC 3.5.3.1), която катализира превръщането на аргинин в урея и орнитин (Фигура 8).

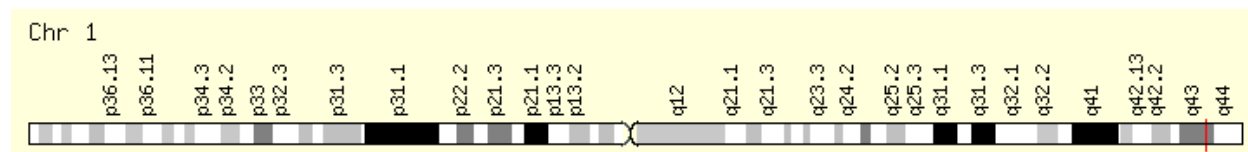


Фигура 8: Схематично представяне на урайния цикъл (Sin *et al.*, 2015). Патогенни варианти в гена, кодиращ аргиназа-1 (arginase-1), водят до проява на заболяването аргиназен дефицит.

Повече от 40 патогенни варианта по дължината на *ARG1* гена са описани при пациенти с аргиназен дефицит, като най-честите генетични дефекти са missense вариантите (Sin *et al.*, 2015; Diez-Fernandez *et al.*, 2018). Три от екзоните (1, 4 и 7) са определени като т.нар. „горещи региони“, в които най-често попадат генетичните дефекти (Diez-Fernandez *et al.*, 2018). Патогенните *ARG1* варианти могат да доведат до засягане на стабилността, структурата или функцията на аргиназа-1 (Sin *et al.*, 2015), в резултат на което се нарушава нормалното образуване на урея и излишният азот се натрупва в кръвта под формата на амоняк. Именно на натрупването на амоняк и аргинин се дължат неврологичните симптоми, които са характерни за пациентите с аргиназен дефицит. При тях могат да се наблюдават повишени нива на аргинин в кръвта повече от 15 пъти над нормалните стойности и повече от 10 пъти в гръбначно-мозъчната течност (Scaglia and Lee, 2006). Освен това при пациентите с аргиназен дефицит се отчитат и високи нива на оротова киселина в урината. Точно тези биохимични изменения дават основание за поставяне на диагноза аргиназен дефицит.

1.1.1.5. *FH*-свързани заболявания

Фумаразният дефицит (MIM# 606812) е автозомно-рецесивно заболяване, което възниква в резултат на патогенни генетични варианти в *FH* гена (MIM* 136850), който е локализиран на дългото рамо на 1-ва хромозома (1q43) (Фигура 9).

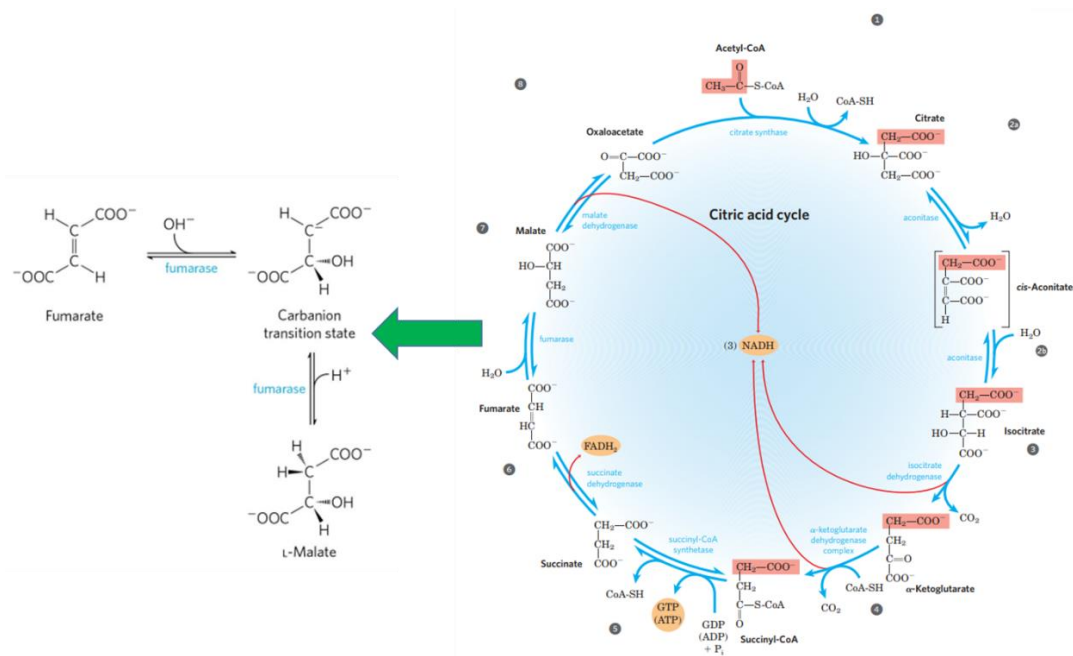


Фигура 9: Локализация на гена *FH* върху дългото рамо на 1-ва хромозома (1q43) (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FH>).

FH гена кодира ензима фумарат хидратаза (известен още като фумараза) (EC 4.2.1.2), който в цикъла на Кребс катализира превръщането на фумарат в малат (Фигура 10). При пациентите с фумаразен дефицит се наблюдават енцефалопатия, изоставане в растежа, хипотония, микроцефалия, дисморфични лицеви характеристики, невъзможност за хранене и говорене, гърчове и др. (Coman D, Kranc KR, 2006). Повишени нива на фумарова киселина и алфа-кетоглутарат в урината дават индикация за това тежко заболяване. При наличие на

тези биохимични изменения следва да се продължи потвърждаването на диагнозата и на молекулярно-генетично ниво.

Различни патогенни генетични варианти в *FH* гена са докладвани във времето. Измежду тях се срещат missense, nonsense, frameshift и splice site варианти. Освен тези генетични дефекти Mroch *et al.*, 2012 представят случай на фумаразен дефицит, при който се наблюдава пълна делеция на едното копие на гена *FH* в комбинация с точкова замяна на другия алел. Установяването на такъв тип генетични комбинации е възможно само чрез сегрегационен анализ в семейството, тъй като чрез секвениране може да бъде установена единствено точковата замяна. В тези случаи сегрегационният анализ дава индикация, че единият родител е хетерозиготен носител на точковия генетичен дефект, а другият не е носител на патологични точкови замени. При получаване на такива резултати трябва да се премине към тест за определяне на вариации в броя копия на гена и по този начин да се потвърди или отхвърли наличието на делеция. В случаите когато бащата не е носител на идентифицираната находка се препоръчва и тест за бащинство. Целта е да се определи дали генетичният вариант не се детектира при бащата в резултат на евентуалното наличие на делеция при него или всъщност той не е баща на таргетния пациент, което също би обяснило отсъствието на варианта.



Фигура 10: Цикъл на Кребс. Дефицит на фумарат хидратаза води до невъзможност за превръщане на фумарат в малат (реакцията е отбелязана със зелена стрелка на фигурата) (Nelson, D. L., & Cox, 2009 с модификации).

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

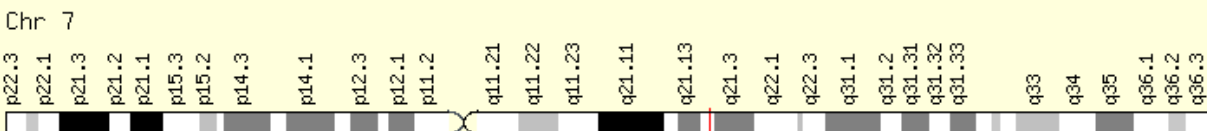
Нарушения на пероксизомната биогенеза (Peroxisome biogenesis disorders - PBD) са група от автозомно-рецесивни заболявания, които възникват поради нарушено сглобяване на пероксизомите. В резултат на това се наблюдават пероксизомни ензимни дефицити, водещи до засягане на различни катаболитни и анаболитни пътища, като по този начин се причиняват множество метаболитни аномалии. При пациентите със заболявания от спектъра на Zellweger (Zellweger spectrum disorders - ZSD) се установява натрупване на дълговерижни мастни киселини, фитанова и пристанова киселина, както и пипеколинова киселина в плазмата. Повишените нива на тези метаболити дават индикация за пероксизомно заболяване.

Правилното сглобяване на пероксизомите се осъществява посредством белтъчните продукти на *PEX* гените (Braverman, D'Agostino and MacLean, 2013). Патогенни варианти в тях водят до ZSD и Rhizomelic chondrodysplasia punctata. В миналото ZSD са се смятали за три отделни заболявания: синдром на Zellweger, неонатална адренолевкодистрофия и инфантилна болест на Refsum. Към момента са обединени под общото название “Заболявания от спектъра на Zellweger“, като най-тежкото клинично състояние представлява синдромът на Zellweger (Steinberg *et al.*, 2006). Пациентите с ZSD се разделят в три групи в зависимост от началото на заболяването (Klouwer *et al.*, 2015):

- Неонатална-инфантилна изява: при тези пациенти са налице чернодробна дисфункция, тежка хипотония, епилептични гърчове, лицев дисморфизъм, очни и мозъчни аномалии и др.
- Изява на заболяването в ранна детска възраст: при тази група пациенти се наблюдава забавяне в развитието, очни аномалии, сензонеурална глухота, хепатомегалия и чернодробна дисфункция, повишени нива на трансминази, епилептични припадъци (при част от пациентите), по-леки краниофациални дисморфични черти, демиелинизация и др.
- Изява при юноши и възрастни: в тази група пациентите са с по-леко засягане, като при тях се наблюдават очни аномалии и засягане на слуха. Всички останали изменения могат да не бъдат изявени.

Патогенни варианти по дължината на *PEX* гените са причина за изява на тези клинични състояния. Обект на настоящия дисертационен труд са гените *PEX1* и *PEX6*.

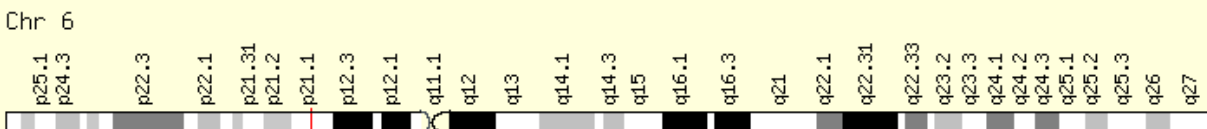
PEX1 генът (MIM*602136) е локализиран на дългото рамо на 7-ма хромозома (7q21.2) (Фигура 11).



Фигура 11: Локализация на гена *PEX1* върху дългото рамо на 7-ма хромозома (7q21.2) (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PEX1>).

Патогенни хомозиготни и двойно хетерозиготни варианти, засягащи *PEX1* гена са доказана причина за нарушения на пероксизомната биогенеза и по-конкретно синдром на Heimler 1 (MIM: #234580), нарушения на пероксизомната биогенеза 1A (Zellweger, MIM# 214100) и нарушения на пероксизомната биогенеза 1B (NALD/IRD, MIM# 601539).

Другият ген *PEX6* (MIM* 601498), отново кодира белтък, който е необходим за правилното сглобяване на пероксизомите. *PEX6* е локализиран на късото рамо на 6-та хромозома (6p21.1) (Фигура 12).



Фигура 12: Локализация на гена *PEX6* върху късото рамо на 6-та хромозома (6p21.1) (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PEX6>).

Патогенни варианти в *PEX6* гена са синдром на Heimler 2 (MIM# 616617), нарушения на пероксизомната биогенеза 4A (Zellweger, MIM# 614862) и нарушения на пероксизомната биогенеза 4B (MIM# 614863).

Към момента са описани разнообразни генетични дефекти, засягащи гените *PEX1* и *PEX6*. Всички те водят до нарушение в сглобяването на пероксизомите в резултат на което се стига до тяхната дисфункция.

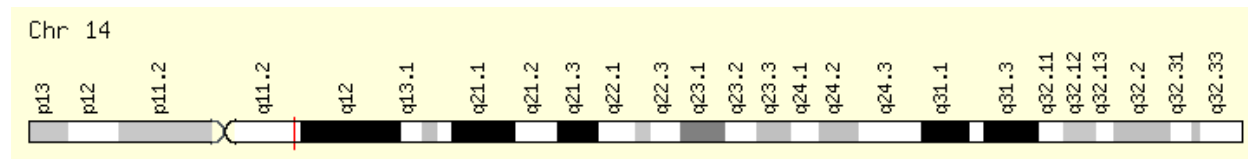
1.1.2. Невромукулни заболявания

Другото основно направление от неврологичните заболявания са невромукулните. Те се характеризират със засягане на невромукулната система (периферната нервна система и мускулите), в резултат на което се проявява мускулна дистрофия, мускулна атрофия или мускулна слабост. Честотата на невромукулните заболявания в световен мащаб е оценена на 1:1000 (Zatz, Passos-Bueno and Vainzof, 2016). Няколко подгрупи заболявания влизат в голямото направление „Невромукулни заболявания“. Измежду тях са: мускулни дистрофии, миопатии, миотонични синдроми, метаболитни миопатии, миастенни синдроми, кардиомиопатии, спинални мускулни атрофии и наследствени атаксии, наследствени сензорни и моторни невропатии, наследствена параплегия, мускулни заболявания, дължащи се на засягане на йонни канали и др. Причините за възникване на тези състояния могат да бъдат придобити или генетични. Към придобитите невромукулни заболявания спадат идиопатичните възпалителни миопатии, миастения гравис и др. Когато говорим за генетично обусловено невромукулно заболяване трябва да отбележим, че към момента са идентифицирани повече от 500 гена, патогенни варианти в които водят до проявата на невромукулна симптоматика (Laing, 2012). Унаследяването на тези генетични дефекти може да бъде автозомно-рецесивно, автозомно-доминантно и Х-свързано. Изявата на клинична симптоматика може да настъпи в ранно детство и да има тежка прогресия, или да се прояви на по-късна възраст с по-бавна прогресия (Laing, 2012).

1.1.2.1. МУН7–свързани заболявания

МУН7–свързаните заболявания обхващат широк спектър от сърдечни и скелетно-мускулни засягания с начало в детска или зряла възраст. Към тази група заболявания се отнасят: дилатативна кардиомиопатия 1S (MIM# 613426), хипертрофична кардиомиопатия 1 (MIM# 192600), Laing дистална миопатия (MIM# 60500), некомпактирана лява камера 5 (Left ventricular noncompaction 5, MIM# 613426), автозомно-доминантна или автозомно-рецесивна миопатия, свързана с натрупване на миозин (myosin storage myopathy, MIM# 608358, MIM# 255160), както и миопатичен тип скапулоперонеален синдром (MIM# 181430). Повечето от тези заболявания имат автозомно-доминантен модел на унаследяване, като в малък процент от случаите се наблюдава и автозомно-рецесивно унаследяване.

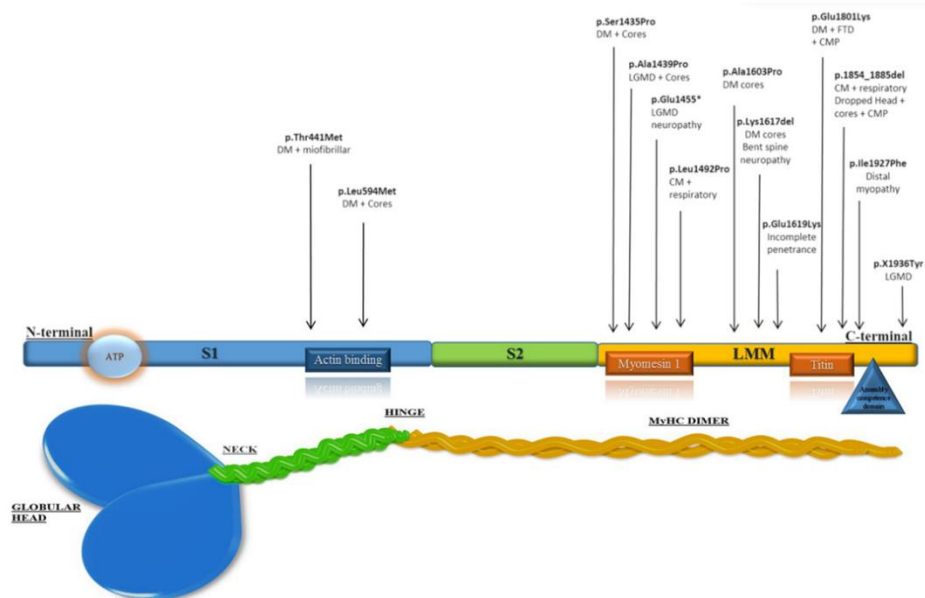
Патогенни варианти в гена *MYH7* (MIM* 160760) са причина за изява на невромускулната симптоматика при засегнатите пациенти. Генът е локализиран на дългото рамо на 14-та хромозома (Фигура 13).



Фигура 13: Локализация на гена *MYH7* върху дългото рамо на 14-та хромозома (14q11.2) (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MYH7>).

Генът *MYH7* кодира изоформа на бета миозиновата тежка верига (beta (β)-myosin heavy chain, МНС- β), която се експресира в сърдечната и скелетната мускулатура (Jaenicke *et al.*, 1990; Quiat *et al.*, 2011). МНС- β е основният протеин, участващ в изграждането на дебелите нишки на сърдечните мускули и играе важна роля при съкращаването им. N-терминалният „globular head“ домен свързва актин и АТФ, които са необходими за моторната активност. С-терминалният край участва в сглобяването на миозина в дебели нишки на саркомера. В С-терминалния край на „rod“ домена е разположен т.нар. лек меромиозин домен (light meromyosin domain – LMM), който участва в сглобяването на нишките. Освен това LMM съдържа и места за свързване на миозин-асоциирани белтъци като миозин-свързващия протеин С и титин (Blair *et al.*, 2002).

Повече от 200 мутации по дължината на гена *MYH7* са описани в асоциация с изолирано или комбинирано засягане на сърдечните и скелетните мускули (Walsh *et al.*, 2009) (Фигура 14). Обособени са два региона от белтъка, патогенните варианти в които причиняват или сърдечно, или скелетно-мускулно засягане. Мутации, локализирани в globular head домена водят до проявата на кардиомиопатия, поради засягането на местата за свързване на актина, докато патогенни варианти в дисталната част на rod домена (LMM) водят до скелетна миопатия. Въпреки това има и описани случаи, при които патогенни варианти във всички участъци на гена *MYH7* водят до комбинирано сърдечно и скелетно-мускулно засягане (Fiorillo *et al.*, 2016).



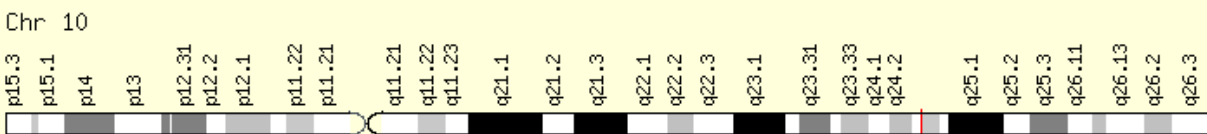
Фигура 14: Схематично представяне на МУН7 протеина, заедно с част от описаните към момента патогенни варианти (Fiorillo *et al.*, 2016).

Впечатление прави това, че причина за *МУН7*-свързаните заболявания най-често са missense варианти (Blair *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2009). В ClinVar базата данни са описани малък брой патогенни/вероятно патогенни nonsense, splice site и frameshift варианти. Това дава индикация, че или вариантите, водещи до загуба на функция на белтъка не са патологичен механизъм при *МУН7*-свързаните заболявания, или патогенната природа на вариантите се определя от локализацията им по дължината на гена, или от структурно-функционалните промени в белтъка, до които могат да доведат.

1.1.2.2. *TWINK*-свързани заболявания

Описаните *TWINK*-свързани заболявания са автозомно-рецесивните синдром на изчерпване на ДНК на митохондриите (хепатоцеребрален тип) 7 (Mitochondrial DNA depletion syndrome (hepatocerebral type) 7, MIM# 271245) и синдром Perrault 5 (MIM# 616138), както и автозомно-доминантна прогресивна външна офталмоплегия с делеции на митохондриална ДНК 3 (MIM# 609286). Клиничните симптоми, които могат да се наблюдават при засегнатите пациенти, включват мускулна слабост, атаксия, невъзможност за самостоятелно придвижване, интелектуален дефицит, статус епилептикус, изоставане в психомоторното развитие, невропатия, мускулни болки и др. Патогенни варианти в гена

TWNK (още известен като C10orf2, MIM* 606075) са причина за изява на тези клинични състояния. Генът е локализиран на дългото рамо на 10-та хромозома (10q24.31) (Фигура 15).



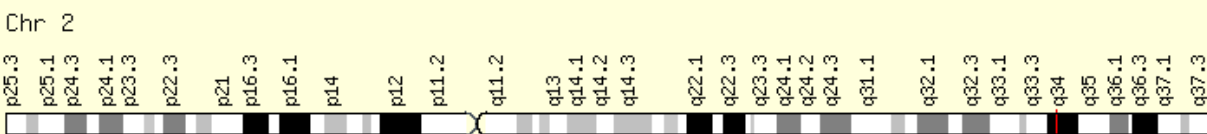
Фигура 15: Локализация на гена *TWNK* върху дългото рамо на 10-та хромозома (10q24.31) (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TWNK&keywords=C10orf2>).

Белтъчният продукт на гена е митохондриална ДНК хеликаза. Митохондриалната ДНК хеликаза (кодирана от ядрения ген *TWNK*) заедно с митохондриалната ДНК полимераза (кодирана от ядрения ген *POLG1*, известен още като *POLG*) участват в репликацията на митохондриалната ДНК (мтДНК). Патогенни варианти в тези гени водят до нарушение в репликационния процес на мтДНК, в резултат на което се губят копия от нея (Hartley *et al.*, 2012).

Различни типове генетични дефекти, засягащи гена *TWNK* са докладвани към момента. Преобладаващите патологични варианти са missense. Срещат се още nonsense, frameshift splice site варианти, но те са с по-ниска четотата.

1.1.2.3. *UNC80*-свързани заболявания

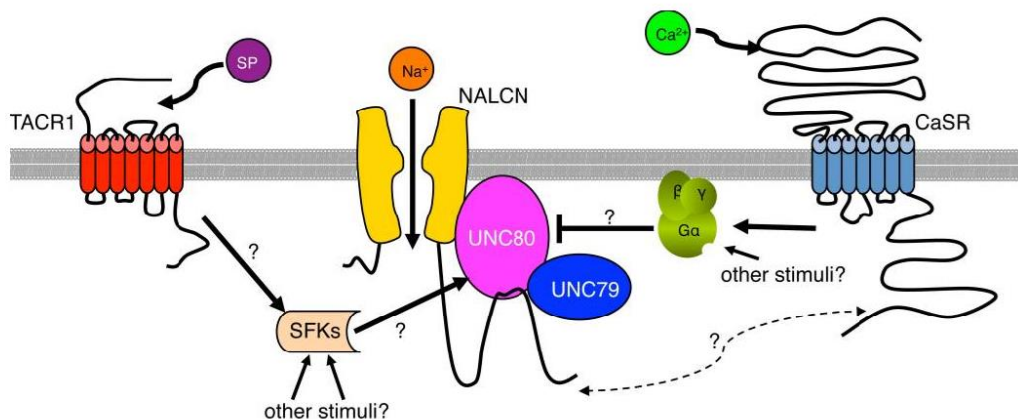
UNC80-свързаните заболявания се характеризират с тежка инфантилна хипотония, психомоторно изоставане и специфични лицеви характеристики (MIM# 616801). Освен тези клинични особености, при пациентите може да се наблюдават и енцефалопатия, интелектуален дефицит, изоставане в развитието, липса или нарушение в говора, гърчове и др. Патогенни хомозиготни или двойно хетерозиготни варианти в гена *UNC80*, локализиран на дългото рамо на 2-ра хромозома (2q34) (Фигура 16), водят до описаните фенотипни характеристики (MIM* 612636).



Фигура 16: Локализация на гена *UNC80* върху дългото рамо на 2-ра хромозома (2q34) (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=UNC80>).

Генът *UNC80* кодира белтък (UNC80), който е необходим за стабилизирането и функцията на натриевия канал, наречен NALCN (<https://medlineplus.gov/genetics/gene/unc80/#conditions>). Натриевите канали транспортират положително заредени натриеви йони в клетките и играят ключова роля в способността им да генерират и предават електрически сигнали. NALCN изгражда независим от напрежението, неселективен, неактивиращ катионен канал, пропусклив за Na⁺, K⁺ и Ca(2+), като образува фонова проводимост за изтичане на Na(+) и контролира възбудимостта на невроните (Lu *et al.*, 2007). Освен за стабилизирането и функцията на NALCN, UNC80 е необходим и за свързване на NALCN с UNC79.

UNC79 функционира като допълнителна субединица на NALCN канала, като му придава чувствителност към извънклетъчна концентрация на Ca(2+) (Lu B, Zhang Q, Wang H, Wang Y, Nakayama M, 2010). Благодарение на UNC80 се осъществява връзката между NALCN и UNC79, като по този начин се формира функционален комплекс (Фигура 17) (Shamseldin *et al.*, 2016).



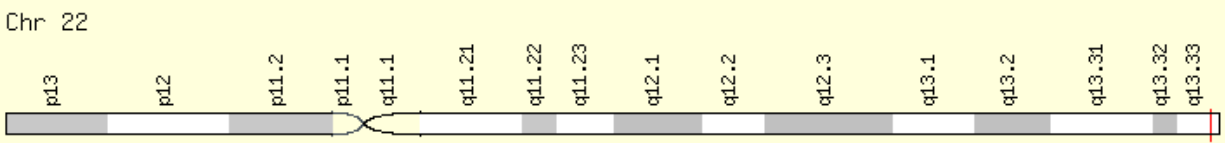
Фигура 17: Схематично представяне на NALCN каналния комплекс и локализацията на UNC80 спрямо NALCN и UNC79 (Ren, 2011).

Патогенните варианти в гена *UNC80* водят до липса на белтък или до експресия на белтък с увредена функция. Това, от своя страна, е причина за нарушаване на стабилността и функционалността на NALCN каналния комплекс.

Описаните патологични генетични варианти, засягащи гена *UNC80* са missense, nonsense и frameshift, като за момента няма ясни и категорични данни за връзката между типа на генетичния дефект и степента на засягане на пациентите. Изказана е хипотеза, че вариантите, водещи до загуба на функция на протеина са причина за по-тежка клинична изява в сравнение с missense вариантите (Shamseldin *et al.*, 2016). Прави впечатление и това, че при по-голяма част от пациентите с missense варианти в *UNC80* гена се наблюдават гърчове в сравнение с пациентите, носители на frameshift и nonsense варианти (Shamseldin *et al.*, 2016; Stray-Pedersen *et al.*, 2016). В световната литература и международните бази данни ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) и LOVD (<https://www.lovd.nl/>), не са описани голям брой патогенни варианти, засягащи гена *UNC80*, което ни дава основание да считаме, че има много все още генетично неизяснени случаи на *UNC80*-свързани заболявания. Предвид автозомно-рецесивния модел на унаследяване на заболяването в семействата, при които родителите са асимптоматични, хетерозиготни носители на патологичен генетичен вариант в *UNC80* гена, вероятността всяко дете да бъде болно е 25%. Освен това всеки родител има 50% риск да предаде този генетичен вариант в поколението си и да има деца, здрави носители на генетичен вариант в *UNC80* гена.

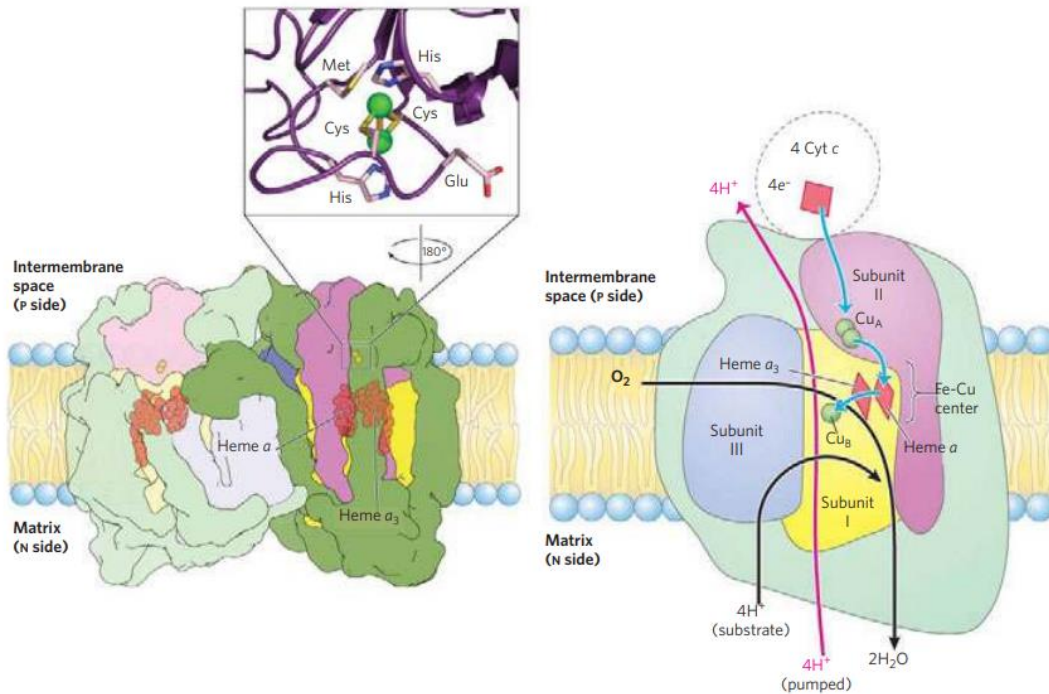
1.1.2.4. *SCO2*-свързани заболявания

Дефицит на митохондриален комплекс IV ядрен тип 2 (MIM# 604377) е автозомно-рецесивно заболяване с мултисистемно засягане. Проявата на клиничната симптоматика може да настъпи от началото на раждането до първата година. При засегнатите пациенти са налице следните симптоми: тежка хипотония, дихателна недостатъчност, тежка хипертрофична кардиомиопатия, изоставане в развитието, мозъчни малформации, повишени стойности на лактат и др. (Papadopoulou *et al.*, 1999; Jaksch *et al.*, 2000). При пациентите със *SCO2*-свързани заболявания се наблюдава сходна със синдром на Leigh неврологична симптоматика. Патогенни хомозиготни и двойно хетерозиготни варианти в гена *SCO2* (MIM* 604272) са доказана причина за проявата на тези клинични състояния. Генът е локализиран на дългото рамо на 22-ра хромозома (Фигура 18).



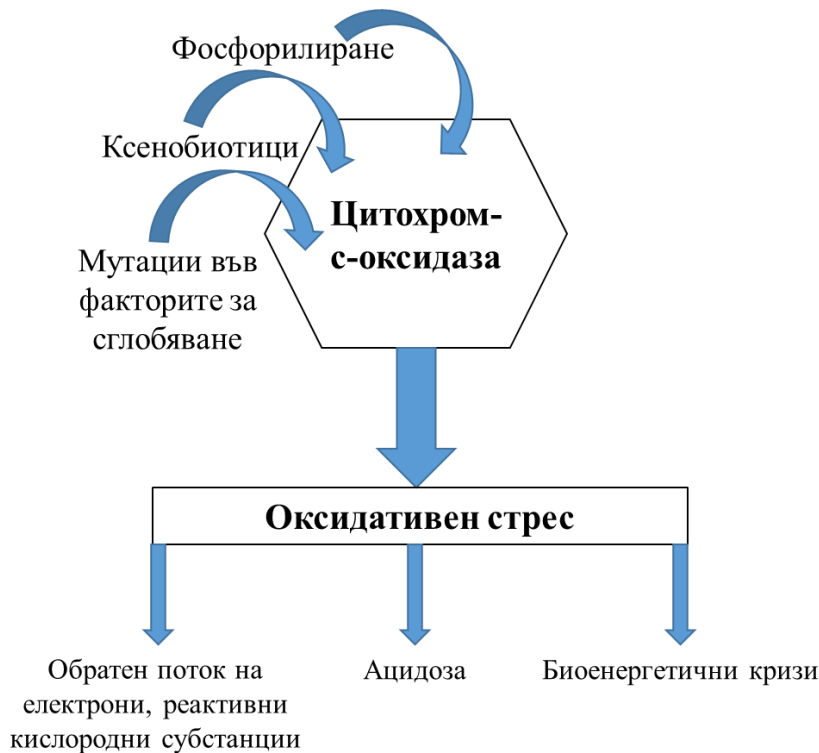
Фигура 18: Локализация на гена *SCO2* върху дългото рамо на 22-ра хромозома (22q13.33) (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SCO2>).

Генът *SCO2* кодира един от белтъците, необходим за сглобяване на цитохром-с-оксидазата (cytochrome c oxidase – COX, комплекс IV). Освен него, за сглобяване на комплекс IV са необходими и следните белтъчни фактори: COX10, COX15, SCO1, COX11, COX17 и SURF1 (Pescina *et al.*, 2004). Цитохром-с-оксидазата е последната стъпка от електрон-транспортната верига във вътрешната митохондриална мембрана. Той предава електрони от цитохром-с до крайния електронен акцептор – кислород, като кислородът се редуцира до вода (Nelson, D. L., & Cox, 2009) (Фигура 19).



Фигура 19: Структура и функция на комплекс IV от електрон-транспортна верига (Nelson, D. L., & Cox, 2009).

Нарушената функция на цитохром-с-оксидазата води до т.нар. оксидативен стрес. В резултат на това се получава обратен поток на електрони и натрупване на реактивни кислородни субстанции, ацидоза и биоенергетични кризи (Фигура 20).

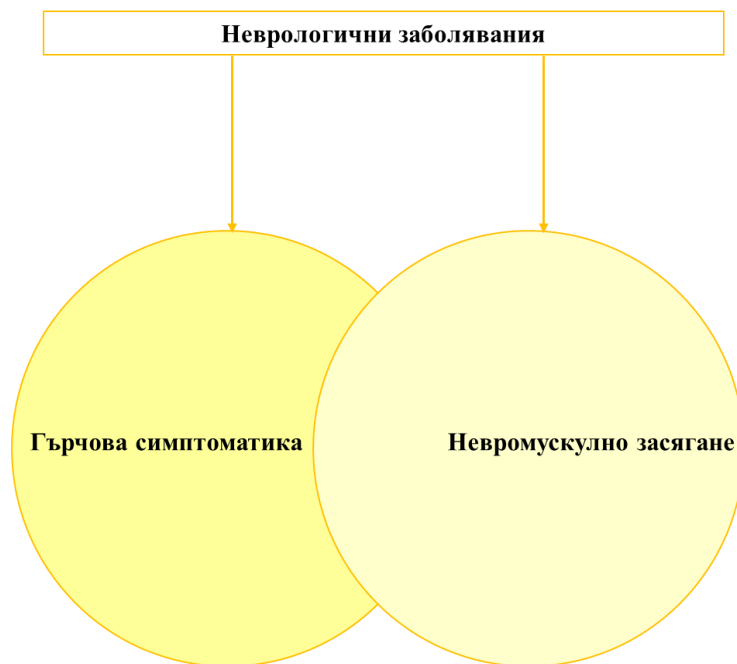


Фигура 20: Последници от нарушаване на функцията на цитохром-с-оксидазата.

По повод на генетичните дефекти, които могат да водят до дефицит на митохондриален комплекс IV ядрен тип 2, до момента в световната литература е описан широк спектър от патогенни варианти, засягащи гена *SCO2*. Един от най-честите генетични дефекти е точкова мутация, водеща до замяна на глутаминова киселина с лизин на позиция 140 (p.Glu140Lys) в аминокиселинната последователност, кодирана от *SCO2* гена. Интересното е, че при пациентите, които са хомозиготни носители на тази мутация, се наблюдава по-късно начало на проява на симптомите в сравнение с двойните хетерозиготи, които освен варианта p.Glu140Lys, носят и друг генетичен дефект, причиняващ сериозни нарушения в белтъчния продукт на гена *SCO2*. Именно на това може да се дължи и по-тежкото засягане на тези пациенти в сравнение с хомозиготните носители на p.Glu140Lys (Verdijk *et al.*, 2008).

Въпреки че разделихме представените неврологични заболявания в две групи, базирайки се на водещите им клинични характеристики: наличие на епилепсия/гърчове или невромускулно засягане, трябва да отбележим, че би било трудно да се постави ясна и категорична граница между отделните неврологични заболявания.

За това в обобщение може да заключим, че при някои заболявания с водещ епилептичен синдром може да се наблюдава невромускулно засягане и обратно (Фигура 21).



Фигура 21: Схематично представяне на припокриващите се клинични характеристики при част от неврологичните заболявания.

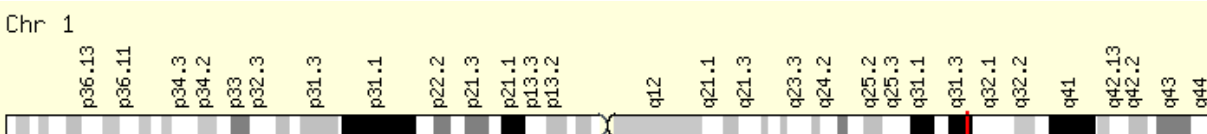
1.2. Офталмологични заболявания

Това са всички заболявания, които засягат човешкото око и зрението. Повечето от очните заболявания засягат възрастните хора, тъй като с възрастта настъпват редица аномалии в зрителния апарат, които водят до отслабване и дори загуба на зрението. Въпреки това има редица очни заболявания, които могат да се наблюдават в по-ранна възраст, като голяма част от тях са наследствени. Броят на наследствените очни заболявания е повече от 350. Към тях спадат далтонизъм, дистрофия на роговицата, глаукома, вродена катаракта,

вродена амавроза на Leber, нощна слепота, retinitis pigmentosa, наследствена оптична невродия на Leber и др. Патологични генетични варианти в редица гени могат да водят до наследствени очни заболявания, които са и обект на настоящия дисертационен труд.

1.2.1. *CRB1*-свързани заболявания

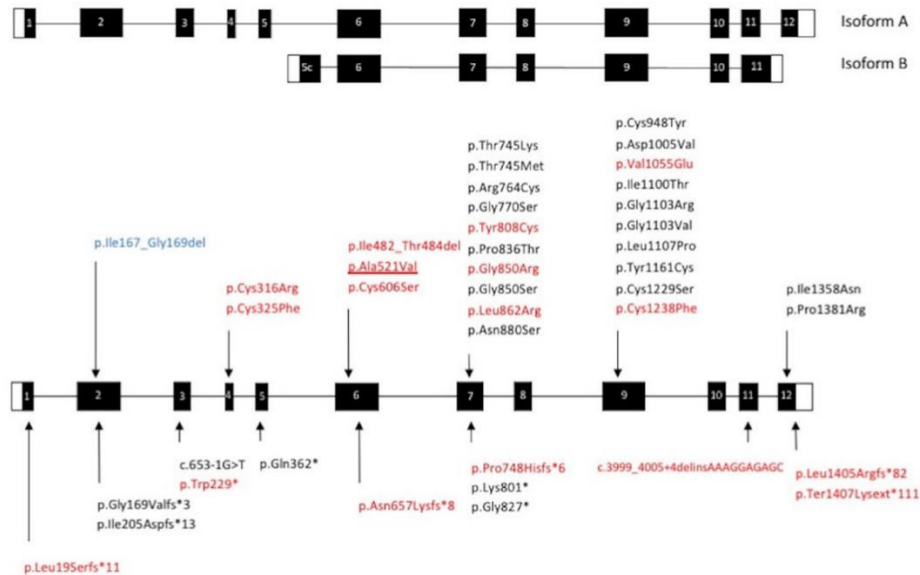
CRB1-свързаните заболявания включват автозомно-рецесивните Retinitis pigmentosa-12 (MIM# 600105) и Вродена амавроза на Leber 8 (MIM# 613835), както и автозомно-доминантната Пигментирана паравенозна хориоретинална атрофия (Pigmented paravenous chorioretinal atrophy) (MIM# 172870). Всички тези заболявания засягат очите и зрението. Клиничните им характеристики могат да включват нистагъм, нощна слепота, retinitis pigmentosa, бели петна в ретината, енофталам и др. Патогенни варианти в гена *CRB1* (MIM* 604210), локализиран на дългото рамо на 1-ва хромозома (1q31.3) (Фигура 22) са причина за тези заболявания.



Фигура 22: Локализация на гена *CRB1* върху дългото рамо на 1-ва хромозома (1q31.3) (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CRB1>).

Белтъчният продукт на гена се експресира в мозъка и ретината, която е специализирана тъкан в задната част на окото. Чрез нея се детектират светлината и цветовете. Белтъкът *CRB1* е част от *CRB* комплекса, изграждащ клетъчните връзки и действа като регулатор на клетъчната поляриност. Освен това той играе важна роля по време на развитието на ретината. Генът *CRB1* съдържа 12 транскрипта, като в ретината два от транскриптите, които кодират протеини на клетъчната повърхност, се експресират в клетките на Müller и фоторецепторите (Mairot *et al.*, 2021). Клетките на Müller експресират транскрипт *CRB1-A*, докато фоторецепторите експресират транскрипта *CRB1-B*. Транскрипт *CRB1-A* се експресира основно по време на развитието на ретината, а транскрипт *CRB1-B* е преобладаващ в ретината на възрастните. Освен транскриптите *CRB1-A* и *CRB1-B* се наблюдава и транскрипт *CRB1-C*, но в по-малко количество. Протеинът *CRB1* участва и във формирането на връзки между различни клетки в ретината.

Повече от 400 генетични варианти, водещи до *CRB1*-свързани заболявания, са докладвани досега. Измежду тях се срещат missense, nonsense, frameshift, splice site и инсерции/делеции (Фигура 23).



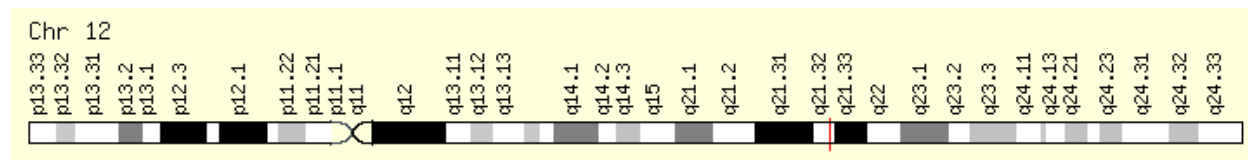
Фигура 23: Схематично представяне на транскриптите, кодиращи *CRB1* изоформи А и В, както и част от генетичните варианти, локализирани по дължината на гена *CRB1* (Mairot *et al.*, 2021).

Патогенни варианти в *CRB1* гена могат да се свързват с прогресивна дегенерация на фоторецепторите, тежко увреждане на клетките на Müller, както и макулна дистрофия в зависимост от транскрипта, който засягат (Den Hollander *et al.*, 1999; Mairot *et al.*, 2021).

1.2.2. *CEP290*-свързани заболявания

Патогенни варианти по дължината на *CEP290* (MIM* 610142) гена водят до автозомно-рецесивните синдром на Bardet-Biedl 14 (MIM# 615991), синдром на Joubert 5 (MIM# 610188), вродена амавроза на Leber 10 (MIM# 611755), синдром на Meckel 4 (MIM# 611134) и синдром на Senior-Loken 6 (MIM# 610189). Характерно за всички тези заболявания е очното засягане, което може да включва нистагъм, вродена амавроза, retinitis pigmentosa, колобома на ретината, намалена зрителна острота и др. Патогенни варианти в гена *CEP290* водят до описаните по-горе генетични заболявания. В зависимост от типа на варианта, клиничните характеристики, които могат да се наблюдават, варират от изолирана слепота до смъртоносния синдром на Meckel-Gruber.

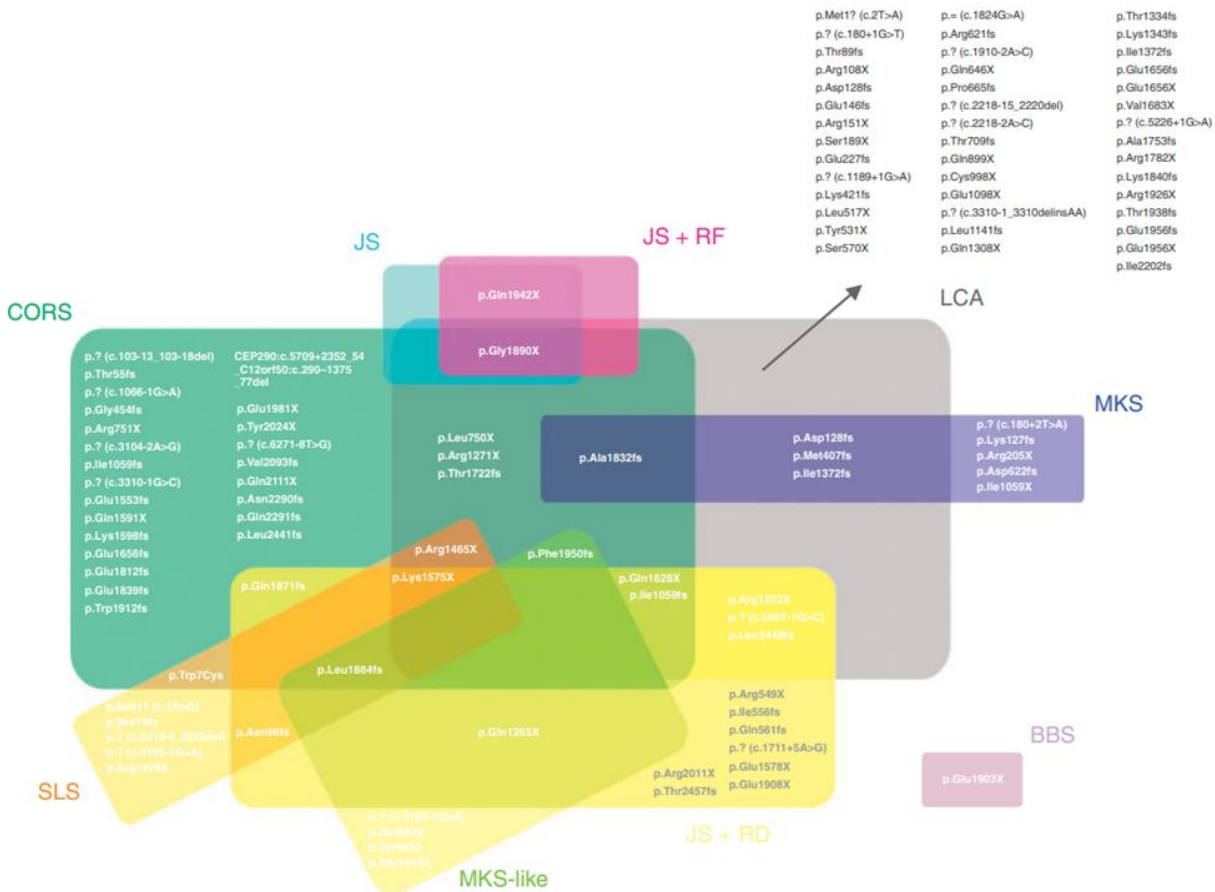
Генът *CEP290* е локализиран на дългото рамо на 12-та хромозома (12q21.32) (Фигура 24).



Фигура 24: Локализация на гена *CEP290* върху дългото рамо на 12-та хромозома (12q21.32) (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CEP290>).

Белтъчният продукт на гена е центрозомен протеин, който се експресира в ресничести клетки в цялото тяло. Той участва в образуването на реснички и транспорта на белтъците, нужни за изграждането им (Corpieters *et al.*, 2010; Burnight *et al.*, 2014). Ресничките участват в движението на клетките и различни химични сигнални пътища. Освен това те са необходими за възприемането на сетивна информация, свързана със зрението, слуха и мириxa.

Към момента са описани различни патологични генетични варианти, засягащи гена *CEP290*. Доказани са както missense, nonsense, frameshift, splice site, така и in-frame мутации. Интерес представлява това, че при различни *CEP290*-свързани заболявания може да се наблюдава един и същ генетичен дефект (Corpieters *et al.*, 2010) (Фигура 25).

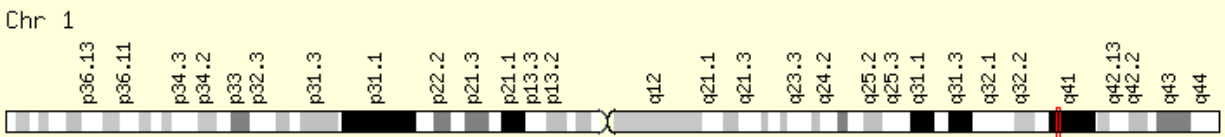


Фигура 25: Припокриването на *CEP290* мутации при различните фенотипни изяви. LCA (вродена амавроза на Leber), SLS (синдром на Senior-Loken), JS (синдром на Joubert), JS+RD (синдром на Joubert, асоцииран с ретинопатия), JS+RF (синдром на Joubert, асоцииран с бъбречна недостатъчност), CORS (cerebello-oculo-renal синдром), MKS (синдром на Meckel-Gruber), MKS-like (Meckel-Gruber подобен синдром), BBS (синдром на Bardet-Biedl) (Coppieters *et al.*, 2010).

По отношение на корелацията между генетичните варианти и фенотипните изяви, трябва да отбележим, че определени мутации се срещат с по-висока честота при някои от *CEP290*-свързаните заболявания. Така например интронният вариант c.2991+1655A>G се наблюдава с изключително висока честота при пациентите с вродена амавроза на Leber (Coppieters *et al.*, 2010; Valkenburg *et al.*, 2018). Описаната генетична находка води до намаляване на активния протеин, кодиран от гена *CEP290*, в резултат на което се нарушава развитието на ретината, чрез засягане на фоторецепторите, които съдържат реснички. Аномалии в ресничките могат да доведат до тежко и рано увреждане на зрението, което е характерно за вродената амавроза на Leber.

1.2.3. *USH2A*-свързани заболявания

USH2A генът (MIM* 608400) е локализиран на дългото рамо на 1-ва хромозома (1q41) (Фигура 26).

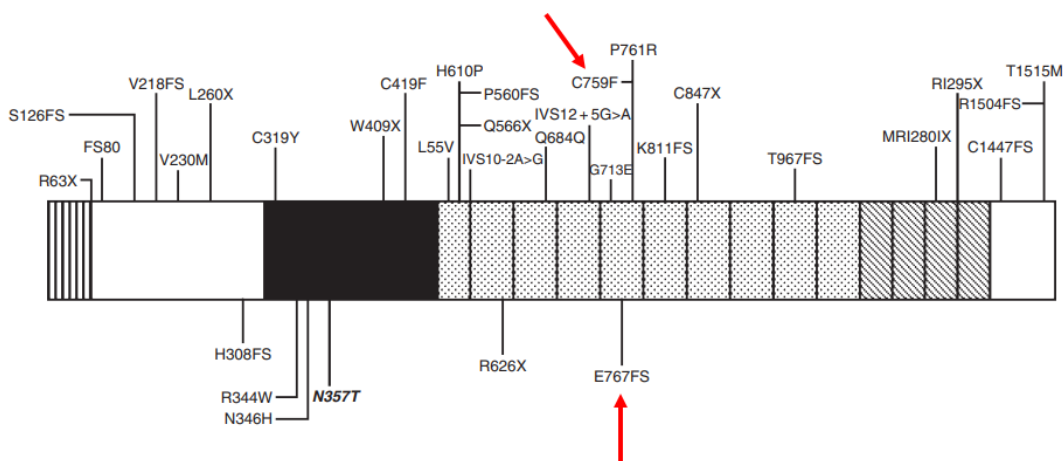


Фигура 26: Локализация на гена *USH2A* върху дългото рамо на 1-ва хромозома (1q41) (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=USH2A>).

Патогенни варианти по дължината на гена са доказана причина за автозомно-рецесивните Retinitis pigmentosa 39 (MIM# 613809) и синдром на Usher тип 2A (MIM# 276901). Прогресивна retinitis pigmentosa е характерна и за двете заболявания. При синдрома на Usher може да се наблюдава и загуба на слуха.

Белтъчният продукт на гена *USH2A* (т.нар. usherin) е локализиран във вътрешното ухо и ретината. Той е важен компонент на базалните мембрани и участва в развитието и хомеостазата на вътрешното ухо и ретината (Bhattacharya *et al.*, 2002).

Повече от 400 патогенни *USH2A* варианти, асоциирани с описаните по-горе клинични състояния, са докладвани досега (DuPont *et al.*, 2018) (Фигура 27).



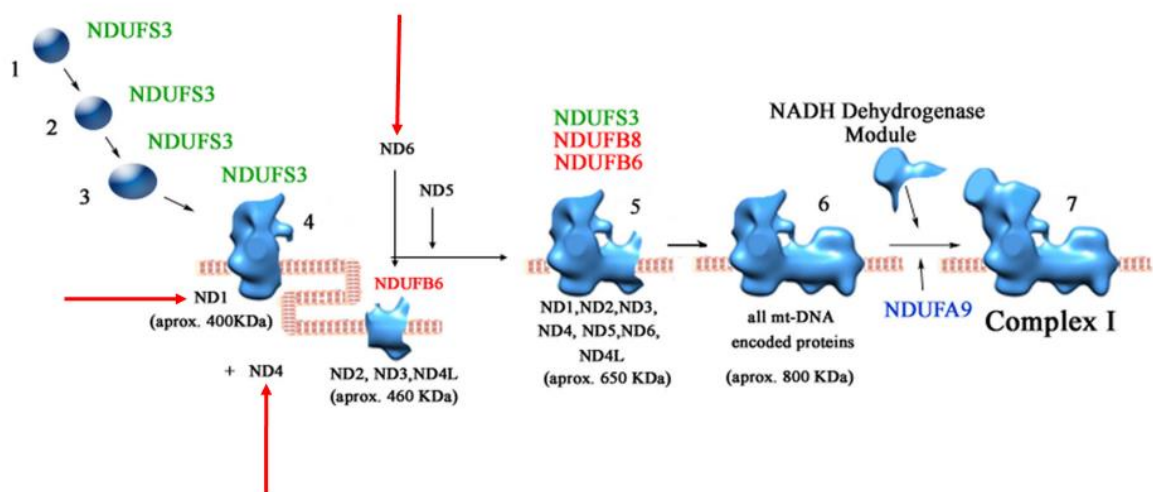
Фигура 27: Схематично представяне на част от мутациите, локализирани по дължината на *USH2A* гена. Едни от най-честите генетични варианти са маркирани с червени стрелки на фигурата (OuYang *et al.*, 2004 с модификации).

Точкови замени по дължината на *USH2A* гена водят до получаване на скъсен или нефункционален белтък. Счита се, че генетичните варианти - делеции/инсерции също водят до компрометиране на белтъчната функция. Едни от най-честите генетични дефекти, засягащи функцията и структурата на usherin са p.Glu767SerfsTer21 и p.Cys759Phe (Ouyang *et al.*, 2004; Blanco-Kelly *et al.*, 2015) маркирани с червена стрелка на Фигура 27. Генотип-фенотипните корелации на пациентите, диагностицирани със синдром на Usher, носители на генетичните варианти p.Glu767SerfsTer21 или p.Cys759Phe, показват, че при наличие на генетичен дефект p.Cys759Phe не се наблюдава тежка загуба на слуха, докато при голяма част от пациентите, носители на мутацията p.Glu767SerfsTer21 се установява умерена глухота (Aller *et al.*, 2004; Blanco-Kelly *et al.*, 2015). Това дава индикация, че фенотипната изява на заболяването зависи от типа на мутацията в комбинация с различни генетични изменения и фактори на околната среда.

1.2.4. Наследствена оптична невропатия на Leber

Наследствената оптична невропатия на Leber (LHON, MIM# 535000) е заболяване, което се характеризира с двустранна, безболезнена остро или подостро протичаща загуба на зрение при индивиди в млада възраст, предимно млади мъже. Проявите на LHON най-често настъпват през второто и третото десетилетие от живота, като при 90% от случаите се стига до загуба на зрението преди 50-годишна възраст (Yu-Wai-Man P, 2000). При пациентите с наследствената оптична невропатия на Leber може да се наблюдава и неврологично засягане, което включва: постурален тремор, периферна невропатия, неспецифична миопатия и двигателни нарушения.

Патогенни missense варианти в митохондриалната ДНК (най-често в гените *MT-ND1*, *MT-ND2*, *MT-ND3*, *MT-ND4*, *MT-ND4L*, *MT-ND5* и *MT-ND6*) водят до LHON. Генетичните мутации могат да действат автономно или в комбинация. Причина за наследствена оптична невропатия на Leber в 95% от случаите е една от трите точкови мутации в митохондриална ДНК: m.3460G>A в гена *MT-ND1*, m.11778G>A в *MT-ND4* и m.14484T>C в *MT-ND6* гена. Гените *MT-ND1*, *MT-ND4* и *MT-ND6* кодират субединици на комплекс I от митохондриалната дихателна верига (Yu-Wai-Man *et al.*, 2009) (Фигура 28).



Фигура 28: Схематично представяне на процеса на сглобяване на комплекс I, заедно с участващите субединици. С червени стрелки са отбелязани основните субединици, които са засегнати при пациентите с LHON (Perales-Clemente *et al.*, 2010 с модификации).

Освен описаните по-горе генетични варианти, при пациентите с LHON се срещат и други мутации по дължината на митохондриалния геном, но те са с много по-ниска честота (Fraser, Biousse and Newman, 2010; Achilli *et al.*, 2012; Vi *et al.*, 2012).

LHON възниква в резултат на патологични варианти в митохондриалната ДНК, което означава, че заболяването е с майчино унаследяване. Майките на засегнатите пробанди носят патологичен генетичен вариант в мтДНК, като при тях както може да се стигне до загуба на зрение, така и може то да не бъде засегнато. Мъжете, носители на патологичен вариант, свързан с LHON не могат да предават мутацията в поколението си, тъй като митохондриалната ДНК се унаследява от майката. В приблизително 60% от семействата с LHON има анамнеза за загуба на зрението, засягаща роднини по майчина линия (Yu-Wai-Man P *et al.*, 2000).

Установяването на генетичната причина за наблюдаваните клинични симптоми при засегнатите пациенти с редки неврологични и офталмологични заболявания е от изключително значение за засегнатите семейства. При някои заболявания има разработени терапии, които биха подобрили начина на живот на засегнатите пациенти. В допълнение верифицирането на генетичния дефект подпомага правилната медико-генетична консултация в засегнатите семейства, като превенция на заболяването стои в основата ѝ.

Чрез провеждане на сегрегационен анализ в семействата може да се установи носителския статус на родствениците на таргетните пациенти. Единствено по този начин може да се проведе коректна генетична консултация и семейно планиране. Усъвършенстването на молекулярно-генетичната диагностика в днешно време дава възможност за подбор на различни методи за анализ с цел установяване и разбиране на механизма на възникване на конкретното заболяване.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

2.1. Цел

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

2.2. Задачи

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

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. Материали

3.1.1. Клиничен материал

В хода на изработване на настоящия дисертационен труд бяха изследвани 279 проби, сред които пациенти с неврологични и офталмологични заболявания, здрави и засегнати родственици, както и при част от семействата бяха извършени пренатални диагностики по повод на откритите гентични варианти. В допълнение, обект на изследване в настоящия дисертационен труд бяха и новородени деца от потенциален ендемичен регион в страната за заболяването аргиназен дефицит, както и здрави контроли от цялата страна (Таблица 1).

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

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

Изследваните лица могат да се обобщят в следните групи:

- **Неврологични заболявания:** Изследвахме общо 33 пробанда, както и 32 родственика на генетично верифицираните таргетни пациенти. Проведохме мутационен скрининг на 100 новородени от ромски произход от потенциален ендемичен регион в страната за заболяването аргиназен дефицит, както и на 100 контролни проби от цялата страна.
- **Офталмологични заболявания:** Изследвахме общо 7 пациента, както и 7 родственика на генетично потвърдените пациенти.

Пациентите, които бяха обект на изследвания в настоящия дисертационен труд бяха насочени за ДНК анализ от:

- СБАЛ по детски болести „Проф. Иван Митев”, гр. София
- УМБАЛ „Св. Георги“, гр. Пловдив
- УМБАЛ „Св. Марина“, гр. Варна
- УМБАЛ „Софиямед“, гр. София
- УМБАЛ „Александровска“, гр. София
- УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, гр. София
- МБАЛ „Национална кардиологична болница“, гр. София

Информирано съгласие за извършване на генетично изследване беше подписано от всички пациенти или техните родители/настойници. Част от изследванията, които бяха обект на настоящия дисертационен труд, са финансирани по договори Д-58/02.05.2017г., Д-116/03.05.2018г. и Д-120/23.04.2019г. на Медицински Университет-София.

3.1.2. Биологичен материал

За провеждане на молекулярно-генетичните изследвания беше използвана високомолекулна ДНК, изолирана от левкоцити от венозна или капилярна кръв. Количеството кръв, което беше необходимо е 3-6 ml в епруетка с антикоагулант етилен диамин тетраацетат – натриева сол (ЕДТА). За провеждане на молекулярно-генетичните изследвания не е необходимо пациентите да са гладни, така че пробите бяха взети след нахранване. Биологичният материал може да се съхранява при температура +4°C (до 48 часа), докато започне процесът по изолиране на ДНК. За провеждане на пренаталните изследвания се изолира ДНК материал от проба, взета чрез хорионбиопсия или амниоцентеза. В хода на изработване на настоящия дисертационен труд приложихме и изолиране на ДНК от урина и букална лигавица при един таргетен пациент и негови родственици.

За извършване на таргетния мутационен скрининг в потенциалния ендемичен регион за заболяването аргиназен дефицит, както и при контролните проби от цялата страна, беше изолирана ДНК от кръв, взета върху филтърни бланки, които се набавят за целите на неонаталния скрининг. Те бяха предоставени от Националната Генетична Лаборатория. Предимството на този тип проби е това, че те могат да се съхраняват на стайна температура,

без това да доведе до нарушаване в качеството на материала, могат и да се транспортират без специфични изисквания.

3.2. Методи

3.2.1. Преданалитична обработка на материала

3.2.1.1. Изолиране на високомолекулна ДНК от периферна кръв по солеви метод

Принцип на метода:

Принципът на метода включва няколко стъпки: първо трябва да се разрушат червените кръвни клетки, като втора стъпка е утаяване на ядрените клетки и последващото им разрушаване. Преципитация на белтъците е следващата стъпка при изолиране на високомолекулна ДНК. Като последна стъпка е преципитацията на ДНК материала.

Процедура:

Взетата кръв се излива в стерилна пластмасова епруветка от 50 ml, като към нея се добавя 30 ml студен лизиращ буфер (pH=7.4, NH₄Cl – 155mM, KHCO₃ - 10mM, Na₂EDTA – 0.1mM). Епруветката се разклаща добре и се инкубира на лед за около 30 мин. След това се центрофугира за 15 мин. при 3000 rpm. Супернатантата се отлива и се изхвърля. Към получената след центрофугиране утайка, се добавя 10 ml студен лизиращ буфер и отново се разбърква добре. Следва центрофугиране при същите условия и надстоящата течност отново се отлива. Получената утайка съдържа ядрени клетки, към които се добавя 5 ml SE (нуклеолизиращ) буфер (pH=8.0, NaCl – 75mM, Na₂EDTA – 25 mM). Освен това се прибавят и 50 µl протеиназа К (10mg/ml) и 400 µl 10% натриев додецил сулфат (SDS). Вортексира се добре и се инкубира на 37°C за цяла нощ. Следващата стъпка е утаяване на белтъците. Добавя се 2 ml преситен 6 M натриев хлорид и се вортексира добре. След това се центрофугира за 15 min на 3000 rpm при стайна температура, за да не се доведе до преципитация на SDS-а. В резултат на центрофугирането белтъците се утаяват на дъното. След това идва стъпката за преципитация на ДНК. Супернатантата, получена в резултат на предходното центрофугиране, се отлива внимателно отново в стерилна пластмасова епруветка от 50 ml, като към нея се добавят 2 обема ледено студен абсолютен етанол. ДНК преципитира и изплува на повърхността. След това тя се събира със стерилен накрайник за

пипета и се промива в 70% етанол. Изсушава се на въздух и се разтваря в стерилен TE-буфер (pH=7.4, TRIS/HCl (pH=7.4) – 10mM, EDTA (pH=8.0) – 1mM). Апаратите, които използвахме са: центрофуга Hermle, Germany, центрофуга MiniSpin Eppendorf, вортекс Heidolph Reax Top, термостат Memmert, Germany.

3.2.1.2. Изолиране на високомолекулна ДНК от материал, получен след хорионбиопсия, амниоцентеза, както и от букална лигавица

За целта използвахме Chelex 100 Resin от Bio-Rad, като следвахме инструкциите на производителя. Апаратурата, която е необходима е центрофуга MiniSpin Eppendorf; вортекс Heidolph Reax Top; Biore Thermo E термоблок.

3.2.1.3. Изолиране на високомолекулна ДНК от урина

За целта използвахме DNA-sorb-B кит от AmpliSens, като следвахме инструкциите на производителя. Апаратурата, която е необходима е центрофуга MiniSpin Eppendorf; вортекс Heidolph Reax Top; Biore Thermo E термоблок.

3.2.1.4. Изолиране на ДНК от филтърни бланки с помощта на Dried Blood Spot (DBS) DNA Isolation kit от NORGEN

От филтърната бланка се изрязват дискове с диаметър 3mm, които са необходими за изолиране на ДНК. Те се подлагат на обработка с комерсиален кит (Dried Blood Spot (DBS) DNA Isolation kit от NORGEN), като се следват инструкциите на производителя. Апаратурата, която е необходима е центрофуга MiniSpin Eppendorf; вортекс Heidolph Reax Top; Biore Thermo E термоблок. При част от филтърните бланки проведехме полимеразна верижна реакция към изрязания диск с размер 3mm, като към парчето добавихме директно компонентите, необходими за провеждането на полимеразната верижна реакция (Todorova *et al.*, 1999).

3.2.1.5. Директна спектрофотометрия

Измерването на абсорбцията при дължина на вълната 260 nm и 280 nm срещу контрола TE буфер, се извършва в платмасова кювета с размер 10 mm на 2 mm. 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. Апаратурата, която се използва е спектрофотометър BioPhotometer, Eppendorf.

3.2.2. Аналитична обработка на материала

3.2.2.1. Секвениране от ново поколение (NGS)

Секвенирането от ново поколение беше извършено в колаборация с две лаборатории Admera Health, Ню Джърси, Америка и Clinical Institute of Medical Genetics, UMC Ljubljana, Любляна, Словения. За секвенирането беше използвана технологията секвениране чрез синтез на Illumina. Принципът на метода включва фрагментиране на ДНК (фрагментите са с дължина около 200 бази), закачане на адапторни секвенции в двата края на получените фрагменти, за да се създаде секвенционна библиотека. Секвенирането се извършва в т.нар. поточни клетки (“flow cell”), като фрагментите се свързват към тази повърхност. Следваща стъпка е полимеразна верижна реакция или т.нар. мостова амплификация, в резултат на която се генерират клъстери на повърхността на поточната клетка. Последната стъпка е процесът на секвениране чрез синтез (<https://bitesizebio.com/13546/sequencing-by-synthesis-explaining-the-illumina-sequencing-technology/>).

Файловете от секвенирането се обработваха и анализираха в хода на настоящия дисертационен труд, чрез специализиран софтуер GensearchNGS (Phenosystems). Получените секвенции се подравняват спрямо референтния човешки геном (GRCh37). Следва анализиране на данните, като несъответствията между секвенциите на пациентите и референтната секвенция се подлагаха на филтруване, за да се определи кои от тях биха имали патогенен ефект.

При всички пациенти бяха анализирани различен набор от гени в зависимост от таргетната диагноза/клиничната симптоматика. Анализирането на данните се осъществяваше не само по гени, но и на база фенотипни характеристики. За бърз и качествен анализ на огромния набор от генетична информация, която генерира секвенирането от ново поколение, прилагаме различни филтри, посредством които програмата визуализира само вариантите, които отговарят на зададените от нас параметри.

Основните филтри, които използвахме са:

- **Честота (Frequency):** това е частта от прочитите, които са различни от референтната последователност на дадено място. Когато имаме перфектен хетерозигот стойността трябва да бъде 0.5. Ние задавахме честота 0.2, за да може да детектираме вероятните хетерозиготи и в региони на гените, които не са добре покрити, както и евентуални мозаечни форми.
- **MAF (minor allele frequency):** стойностите, които задавахме варираха от 0.05 до 0.01, тъй като искахме да анализираме само вариантите, които са с много ниска честота в общата популация.
- **Var. balance:** показва колко симетрично се вижда вариантът в правата и обратната верига. В идеалния случай вариантът трябва да има баланс 1, което означава, че се вижда много пъти в правата и обратната верига. Ако се вижда само в едната посока, балансът ще бъде 0. В случаите, когато правихме анализа на данните, задавахме стойност 1.
- **Pos. balance:** показва колко симетрично се вижда позицията в правата и обратната верига за всички прочити, независимо дали съдържа варианта или дивия тип нуклеотид.
- **Exon distance (разстояние до екзона):** използва се в случаите, когато искаме да зададем точно определена нуклеотидна последователност от интрона, която целим да визуализираме.

Освен изброените филтри до тук, програмата ни позволява да филтруваме по фенотип, когато искаме да детектираме генетични варианти в гени, които имат ясна корелация с клиничните характеристики, наблюдавани при анализирания пациенти. Може да избираме и да анализираме конкретен ген в случаите, когато в хода на анализ сме получили информация за това, че клиничните симптоми при пациента може да са причинени от патогенни варианти в таргетен ген. Ако желаем или не желаем да виждаме варианти в некодиращи участъци на гена, както и в 5' и 3'UTR, може да зададем и тези параметри. В допълнение програмата позволява да анализираме данните и по класификация на вариантите (напр. да виждаме само патогенните генетични варианти).

3.2.2.2. Полимеразна верижна реакция (ПВР, polymerase chain reaction; PCR)

- Протокол за размножаване на региони от гените *IRF2BPL*, *FH*, *PEX6*, *PEX1*, *MYH7*, *TWNK*, *SCO2*, *CRB1*, *CEP290*, в които попадат идентифицираните чрез NGS генетични варианти, както и част от гена *ARG1* (екзони 1, 2, 3 и 4)

Праймерите, които са необходими за амплификация на описаните в тази точка специфични региони от гените, са дизайнирани чрез програмата In-Silico PCR (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>)

За всеки от регионите са оптимизирани условията за провеждане на PCR. Оптимизацията включваше промяна в концентрацията на компонентите, температура и време за хибридизация на праймерите, както и времето за синтез на специфичния продукт. Оптималната концентрация на компонентите, необходими за провеждането на PCR са представени в таблица 2.

Таблица 2: Концентрация на компонентите, участващи в PCR за размножаване на региони от гените *IRF2BPL*, *FH*, *PEX6*, *PEX1*, *MYH7*, *TWNK*, *SCO2*, *CRB1*, *CEP290*, както и част от гена *ARG1* (екзони 1, 2, 3 и 4).

| Компонент на реакционната смес | Обем (µl) |
|--|------------------|
| Високомолекулна ДНК | 1 |
| 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 |

За получаване на специфичен продукт, оптимизирахме условията за провеждане на PCR. Програмата е представена в таблица 3.

Таблица 3: Програма за провеждане на PCR за получаване на специфични продукти на региони от гените *IRF2BPL*, *FH*, *PEX6*, *PEX1*, *MYH7*, *TWNK*, *SCO2*, *CRB1*, *CEP290*, както и част от гена *ARG1* (екзони 1, 2, 3 и 4).

| Етап | Температура | Време | Брой цикли |
|----------------------------|-------------|---------|------------|
| Начална денатурация | 94°C | 5 мин. | 1 |
| Денатурация | 94°C | 30 сек. | 30 |
| Хибридизация на праймерите | 60°C | 30 сек. | |
| Синтез на нова верига | 72°C | 1 мин. | |
| Краен синтез | 72°C | 5 мин. | 1 |

- **Протокол за размножаване на региони от гените *NARS1*, *TPP1*, *UNC80*, *USH2A*, в които попадат идентифицираните чрез NGS генетични варианти, както и част от гена *ARG1* (екзони 5, 6, 7 и 8).**

Праймерите, които са необходими за амплификация на описаните в тази точка региони от гените, са дизайнирани чрез програмата In-Silico PCR (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>).

Отново проведехме оптимизиране на условията за провеждане на PCR, като в таблица 4 представяме оптималната концентрация на компонентите, необходими за провеждането на PCR.

Таблица 4: Концентрация на компонентите, участващи в PCR за получаване на специфични продукти на региони от гените *NARS1*, *TPP1*, *UNC80*, *USH2A*, както и част от гена *ARG1* (екзони 5, 6, 7 и 8).

| Компонент на реакционната смес | Обем (µl) |
|--|------------------|
| ДНК | 1 |
| Праймер F (10 pmol/µl) | 1 |
| Праймер R (10 pmol/µl) | 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 |

За получаване на специфичен продукт, оптимизирахме условията за провеждане на PCR. Програмата е представена в таблица 5.

Таблица 5: Програма за провеждане на PCR за получаване на специфични продукти на региони от гените *NARS1*, *TPP1*, *UNC80*, *USH2A*, както и част от гена *ARG1* (екзони 5, 6, 7 и 8).

| Етап | Температура | Време | Брой цикли |
|----------------------------|-------------|---------|------------|
| Начална денатурация | 94°C | 5 мин. | 1 |
| Денатурация | 94°C | 45 сек. | 35 |
| Хибридизация на праймерите | 60°C | 45 сек. | |
| Синтез на нова верига | 72°C | 1 мин. | |
| Краен синтез | 72°C | 5 мин. | 1 |

- **Протокол за размножаване на всички региони от митохондриалния геном**

Праймерите, които са необходими за амплификация на описаните в тази точка специфични региони от митохондриалния геном, отново бяха дизайнирани чрез програмата In-Silico PCR (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>).

За всеки от регионите оптимизирахме условията за провеждане на PCR, като установихме, че оптималната концентрация на компонентите, необходими за провеждането на PCR и получаване на специфичен продукт са същите, като тези представени в таблица 2. Оптимизирахме условията за провеждане на PCR. Програмата е представена в таблица 6.

Таблица 6: Програма за провеждане на PCR за получаване на специфични продукти на всички региони от митохондриалния геном.

| Етап | Температура | Време | Брой цикли |
|----------------------------|-------------|---------|------------|
| Начална денатурация | 94°C | 5 мин. | 1 |
| Денатурация | 94°C | 40 сек. | 30 |
| Хибридизация на праймерите | 60°C | 40 сек. | |
| Синтез на нова верига | 72°C | 1 мин. | |
| Краен синтез | 72°C | 5 мин. | 1 |

3.2.2.3. Електрофореза в агарозен гел

Количеството и качеството на получените чрез PCR амплификационни продукти се анализира с помощта на агарозна гел-електрофореза. За целта се използва 2-3% агарозен гел и хоризонтална електрофорезна система. Пробите се анализират спрямо молекулен маркер, за да се определи дължината на намножения фрагмент. Разделянето на фрагментите зависи от молекулната им маса. В агарозния гел има разтворен етидиев бромид, който подпомага визуализирането на ДНК след облъчване с ултравиолетова светлина. Неоходимите буфери са 1x TBE буфер: TRIS – 90 mmol/l; борна киселина – 90 mmol/l; Na₂EDTA – 1 mmol/l, буфер за нанасяне на пробите: 0.25% бромфенол блу; 25% фикол. Апаратурата, която използвахме за изготвяне на агарозен гел е микровълнова фурна, нивелирна масичка, ваничка за изливане на агарозен гел (2500x1800 mm), стартови гребени с размер 2x22 cm, размери на ямките 5 x 4 x 1 mm. Необходимата апаратура за провеждане на електрофорезата е апарат за хоризонтална подводна гел-електрофореза A. Hartenstein, Wuerzburg, Germany; токоизправител Consort EV222, Turnhout, Belgium. Визуализирането на пробите се осъществи посредством трансилюминатор LKB Bromma 2011 Macrovue, LKB Vertriebs GmbH, Vienna, Austria. Всички агарозни гелове бяха архивирани, чрез

използването на фотодокументационна система: Alpha DigiDoc Pro, Alpha Innotech, Cell Biosciences, Inc., Santa Clara, CA, USA.

3.2.2.4. Директно секвениране по Sanger с флуоресцентно белязани дидезоксинуклеотиди

Секвенирането по Sanger е ензимен метод за определяне на нуклеотидната последователност на таргетен участък от ДНК. Провежда се реакция за синтез на ДНК вериги върху едноверижна матрица с помощта на ДНК полимераза. Полимеразната реакция започва на точно определено място, където праймерите хибридизират с матрицата. Случайното включване на флуоресцентно белязани нуклеотидни аналози (2', 3'-дидезоксинуклеотид 5'-трифосфати (ддНТФ)), които не позволяват удължаването на растящата верига тъй като нямат 3'-хидроксилна група, води до прекратяване на реакцията в различни места. ДНК синтезът *in vitro* се осъществява чрез PCR с помощта на ензима Thermo Sequenase II ДНК-полимераза. Получават се различни по дължина фрагменти с еднакво начало и различен край, определен от включването на един от четирите вида ддНТФ. Получените фрагменти се разделят електрофоретично на принципа на капилярната гел-електрофореза, посредством автоматичен секвенатор ABI3130 Sequence Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Стъпките за провеждането на секвенирането включват:

- Намножаване на таргетния ДНК фрагмент посредством PCR.
- Ензимно пречистване на намножения продукт чрез реагента ExoSAP. Целта на тази стъпка е пречистване на амплифицирания продукт от останалите в пробата ддНТФ, праймери и неспецифични продукти, които биха повлияли върху по-нататъчните реакции. Тази стъпка се осъществява, като в епруветка от 0.2 ml се смесват 2 µl амплификационен продукт и 1 µl ExoSAP. Следва инкубиране на 37°C за 30 min, след което реакцията се спира чрез инактивиране на ензимите на 80°C за 15 min.
- Секвенционна реакция, която се осъществява с помощта на Big Dye® Terminator kit v3.1. (Applied Biosystems), който включва ДНК-полимераза, небелязани нуклеотиди и флуоресцентно белязани дидезоксинуклеотиди. Към ензимно пречистената матрица се добавят 0.3 µl праймер с концентрация 10 pM/µl, 2 µl 5x секвенционен буфер, 1 µl от кита Dye® Terminator v3.1 и бидестилирана вода до краен обем 10 µl. Протоколът за провеждане на секвенционната реакция е представен в таблица 7.

Таблица 7: Протокол за провеждане на секвенционната реакция.

| Етап | Температура | Време | Брой цикли |
|----------------------------|-------------|---------|------------|
| Начална денатурация | 96°C | 3 мин. | 1 |
| Денатурация | 96°C | 20 сек. | 30 |
| Хибридизация на праймерите | 55°C | 20 сек. | |
| Синтез на нова верига | 60°C | 2 мин. | |
| Краен синтез | 60°C | 7 мин. | 1 |

- Преутаяване на секвенционния продукт чрез преципитация с етанол с цел отстраняване на несвързаните нуклеотиди. Към секвенционната проба се добавят по 1/10 от обема 1.5 М натриев ацетат с рН>8 / 250 mM ЕДТА буфер и се хомогенизира добре чрез неколкократно пипетиране. След това се добавя 80 µl студен абсолютен етанол и се вортексират. 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, вортексират се и се центрофугира за 10 min на 12 000 rpm при стайна температура. Супернатантата се премахва чрез изсмукване на вакуум. Утайката се суши на стайна температура и на тъмно.
- Подготовка на секвенционния продукт за електрофоретично разделяне. Получените след преутаяване утайки се разтварят в 20 µl Hi-Di Formamide (Applied Biosystems) и се вортексират. Следва денатурация за 5 min на 94 °C и инкубация на лед за 5 min. С цел събиране на цялото количество на дъното, пробите се вортексират и леко центрофугират. След това се прехвърлят в 96-ямкова плака и се подават на апарата за анализ.
- Визуализиране на резултата. Тъй като използваните при секвенционната реакция терминиращи дидезоксинуклеотиди са флуоресцентно белязани, се осъществява лазерна детекция. Секвенционните данни се обработват автоматично чрез 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.

3.2.3. Литературни бази данни, както и *in silico* предиктори, използвани в хода на изработване на настоящия дисертационен труд

За анализиране на секвенционните данни, получени в резултат на секвениране по Sanger, сравнявахме разчетената секвенция с публикуваната за всеки ген в UCSC Genome Browser и GenBank. Всички генетични варианти, които бяха открити в хода на изработване на настоящия дисертационен труд, бяха сравнени с редица публикации на други автори, както и различни бази данни, описани в раздел „РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ“. Откритите варианти бяха класифицирани, базирайки се на стандартите и препоръките на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти (Richards *et al.*, 2015). Освен това те бяха проверявани в базата данни gnomAD v2.1.1 (Karczewski *et al.*, 2020) (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), за да се определи дали са откривани в общата популация и каква е честотата на носителство. При част от генетичните варианти, използвахме *in silico* предиктори MutationTaster (<https://www.mutationtaster.org/>) и Human Splicing Finder v3.0 (Desmet *et al.*, 2009), за да се провери евентуалния патогенен ефект на таргетните генетични находки. В допълнение за част от новооткритите генетични варианти създадохме *in silico* белтъчен модел, използвайки AlphaFold2 (Evans *et al.*, 2021; Jumper *et al.*, 2021), за да проверим дали биха имали влияние върху белтъчната структура. *In silico* белтъчните модели бяха генерирани от Иван Туртуриков.

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Общият брой изследвани индивиди в настоящия дисертационен труд е 279. При 17 от 40 таргетни пациента верифицирахме генетичната причина на молекулно ниво.

В допълнение изследвахме 39 засегнати, незасегнати или асимптоматични родственици с неизявени клинични симптоми към момента, както и фетуси от пренатална диагностика. Към пациентската група добавихме 100 здрави новородени деца от потенциалния ендемичен регион за аргиназен дефицит в България и 100 здрави контроли от цялата страна. Не беше установена генетичната причина за наблюдаваната клинична симптоматика при 23-ма пациента.

4.1. Неврологични заболявания

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

Таблица 8: Молекулярно-генетични данни на пациенти с неврологични заболявания, включващи гърчова симптоматика, обект на настоящата дисертация.

| Номер | Пол | Изследвани родственици | Засегнат ген | Установен генетичен вариант | Зиготност | Тип на генетичния вариант | Унаследен от | Използван анализ при таргетния пациент |
|-------|--------|-------------------------------------|----------------|---|-------------|---------------------------|----------------|--|
| 1 | женски | двама родители | <i>IRF2BPL</i> | c.376C>T, p.Gln126Ter | хетерозигот | nonsense | <i>de novo</i> | NGS |
| 2 | женски | двама родители | <i>NARS1</i> | c.676G>C, p.Val226Leu | хетерозигот | missense | майка | NGS |
| | | | | c.986G>A, p.Arg329Gln | хетерозигот | missense | баща | |
| 3 | женски | двама родители и незасегната сестра | <i>TPP1</i> | c.119G>A, p.Arg40His и c.1375T>G, p.Tyr459Asp | хетерозигот | missense | майка | NGS |
| | | | | c.622C>T, p.Arg208Ter | хетерозигот | nonsense | баща | |
| 4 | мъжки | двама родители и незасегната сестра | <i>ARG1</i> | c.329+1G>A | хомозигот | splice site | майка | Секвениране по Sanger |
| | | | | | | | баща | |
| 5 | мъжки | / | <i>ARG1</i> | c.775G>A, p.Gly259Ser | хомозигот | missense | / | Секвениране по Sanger |
| 6 | женски | двама родители | <i>FH</i> | c.1048C>T, p.Arg350Trp | хомозигот | missense | майка | NGS |
| | | | | | | | баща | |
| 7 | женски | двама родители и два фетуса | <i>PEX1</i> | c.2097dup, p.Leu700TyrfsTer42 | хомозигот | frameshift | баща | NGS |
| | | | | | | | майка | |
| 8 | женски | двама родители и един фетус | <i>PEX6</i> | c.2663G>C, p.Arg888Pro | хетерозигот | missense | баща | NGS |
| | | | | c.160_243del, p.Val54_Leu81del | хетерозигот | In-frame делеция | майка | |

От групата на неврологичните заболявания с невромускулно засягане, изследвахме 11 пациенти, като при 5 от тях (45%) верифицирахме генетичната причина за клиничната им изява. В таблица 9 са представени всички генетично верифицирани пациенти от групата на неврологичните заболявания с невромускулно засягане, обект на настоящия дисертационен труд.

Таблица 9: Молекулярно-генетични данни на генетично верифицираните пациенти с неврологични заболявания с невромускулно засягане, обект на настоящата дисертация.

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

Чрез секвениране от ново поколение изяснихме генетична причина при 11 от изследваните таргетни пациенти с редки неврологични заболявания. При тях използвахме и секвениране по Sanger с цел потвърждаване на всички открити генетични находки от NGS, както и сегрегационен анализ в семействата.

Класическото секвениране по Sanger беше основен метод за анализ при двама пациенти с диагноза аргиназен дефицит, както и при незасегнатите родственици от семействата им.

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

Следва детайлно представяне на генетично потвърдените пациенти с неврологични заболявания, обект на настоящия дисертационен труд.

4.1.1. Неврологични заболявания с гърчова симптоматика

4.1.1.1. *IRF2BPL*-свързани заболявания

Клинична картина

Таргетният пациент е жена на 26 години с клинична диагноза „прогресивна миоклонична епилепсия“. На възраст от 1г. и 6м. се наблюдава регрес в нервно-психическото развитие. Интелектуален дефицит, изоставане в говорното развитие, атаксия и лек страбизъм са едни от водещите клинични характеристики при пациентката.

Молекулярно-генетичен анализ

При предходно проведени молекулярно-генетични изследвания при пациентката са изключени патологични генетични варианти, свързани със спиноцеребеларни атаксии, както и мутации по дължината на митохондриалния геном.

Имайки предвид големия набор от гени, патогенни варианти в които могат да бъдат причина за наблюдаваната симптоматика, директно преминахме към цялостно екзомно секвениране с последващ таргетен анализ на подбрани гени.

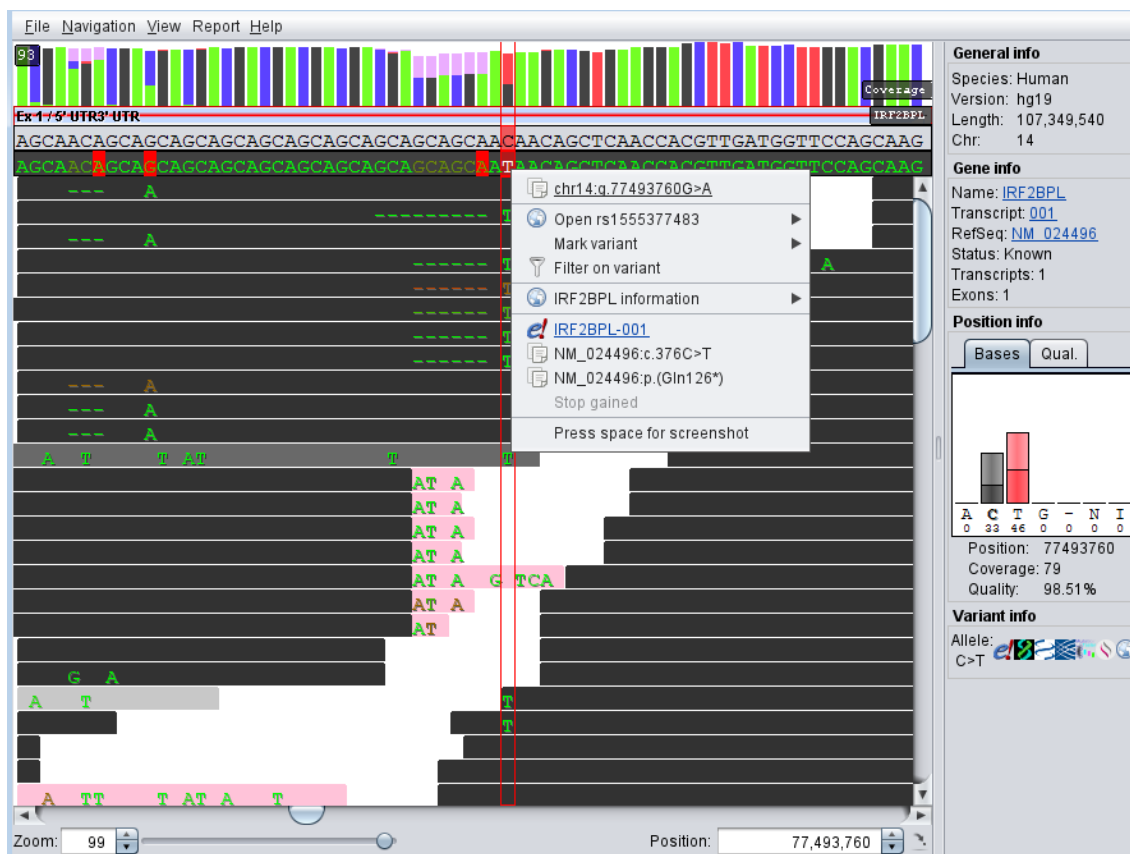
Чрез първоначалния анализ не бяха открити патологични генетични варианти в анализраните гени. Това може да се дължи на:

- генетични дефекти, които не могат да бъдат детектирани посредством секвенционен метод (напр. големи делеции/дупликации)
- генетична замяна, която попада в участък от генома, който не е добре покрит
- патогенният вариант е локализиран в ген, който към момента на анализ не е бил съобщаван в асоциация с наблюдаваните клинични симптоми, в резултат на което този ген не е анализиран

Подходът, който може да приложим в тази ситуация е или да преминем към молекулярно-генетичен анализ, чрез който могат да се детектират големи делеции/дупликации, или да преанализираме данните от екзомното секвениране след време.

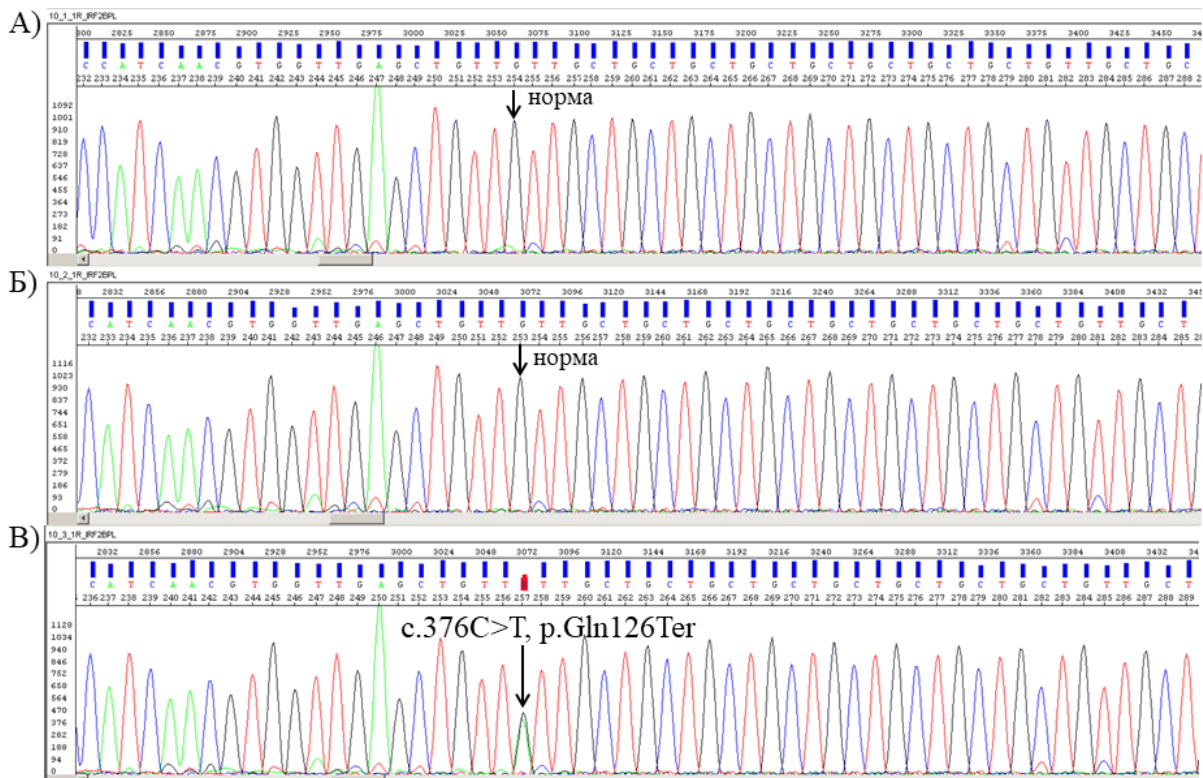
В този случай избрахме да проведем преанализ на NGS данните след време. Повече от година ни беше необходима за верифициране на диагнозата на молекулярно ниво. През този

период многократно преанализирахме данните от NGS секвенирането, докато трудът ни най-накрая се увенча с успех. На база на извършеното преанализиране установихме наличието на хетерозиготен nonsense вариант с.376C>T, p.Gln126Ter в гена *IRF2BPL* (NM_024496) (Фигура 29).



Фигура 29: Секвенционен NGS профил на мутацията с.376C>T, p.Gln126Ter в гена *IRF2BPL* при таргетната пациентка.

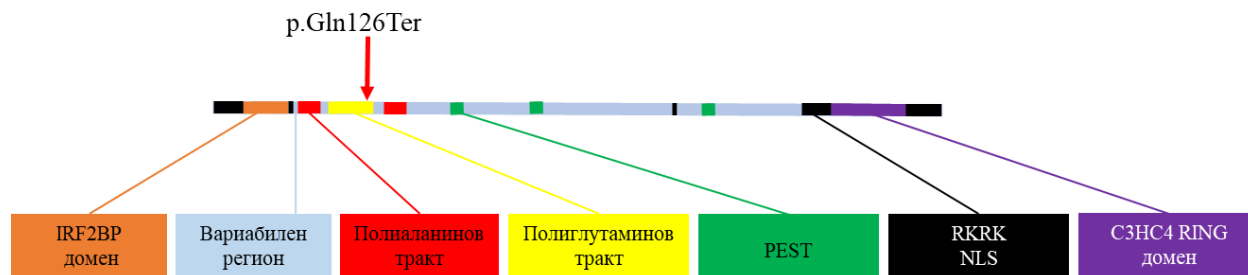
Проведеният сегрегационен анализ в семейството показва, че вариантът е възникнал *de novo* при пациентката (Фигура 30).



Фигура 30: Секвенционен профил на мутацията c.376C>T, p.Gln126Ter в гена *IRF2BPL*. А). Секвенционен профил на майката, който показва нормален генотип. Б). Секвенционен профил на бащата, който показва нормален генотип. В). Секвенционен профил на пациентката, хетерозиготен носител на варианта c.376C>T, p.Gln126Ter в *IRF2BPL* гена.

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

Откритият генетичен вариант е локализиран в края на полиглютаминовия тракт (Marcogliese *et al.*, 2018) (Фигура 31).



Фигура 31: Локализация на варианта p.Gln126Ter в полиглутаминовия тракт на IRF2BPL протеина.

Описаните до момента nonsense варианти по дължината на гена *IRF2BPL* (включително и вариантът с.376C>T, p.Gln126Ter) избягват механизма на nonsense-mediated decay (NMD), което означава, че се получава скъсен протеин, който може да се транслира (Tran Mau-Them *et al.*, 2019). При възникване на стоп кодон на позиция 126 се експресира белтък, в който липсват важни за нормалната му функция домени, като C3HC4 RING finger домена. Както вече споменахме в глава „Литературен обзор“, C3HC4 RING finger доменът е характерен за членовете на семейството на E3 лигазите. Дерегулацията на E3 убиквитин лигазите или натрупването на неразградени убиквитинирани белтъчни агрегати водят до невродегенеративни заболявания или епилептични енцефалопатии.

В резултат на генетичния вариант с.376C>T, p.Gln126Ter се получава белтък, който е скъсен и с нарушена функция. Именно на това може да се дължи по-тежкото протичане на заболяването в сравнение с описаните пациенти, които са носители на missense варианти.

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

Установяването на генетичната причина, довела до наблюдаваната клинична симптоматика при таргетната пациентка, беше изключително предизвикателство, тъй като отне години работа, докато се стигне до потвърждаване на диагнозата на молекулно ниво. С този случай демонстрирахме необходимостта от преанализране на пациентите, при които първоначалният анализ не установява генетична причина за клиничната симптоматика. Независимо от напредването на молекулярно-генетичната диагностика, все още има много заболявания, при които генетичната етиология е неизвестна. В световната литература непрестанно се публикуват много нови заболявания, дължащи се на патогенни варианти в

различни гени. Поради тази причина преанализирането на данните ни дава възможност да проверим дали пациентите, при които не сме установили генетична причина, всъщност са носители на патогенен вариант в някой ген, който към момента на първоначалния анализ не е бил ясно асоцииран като причина за заболяване.

4.1.1.2. *NARS1*-свързани заболявания

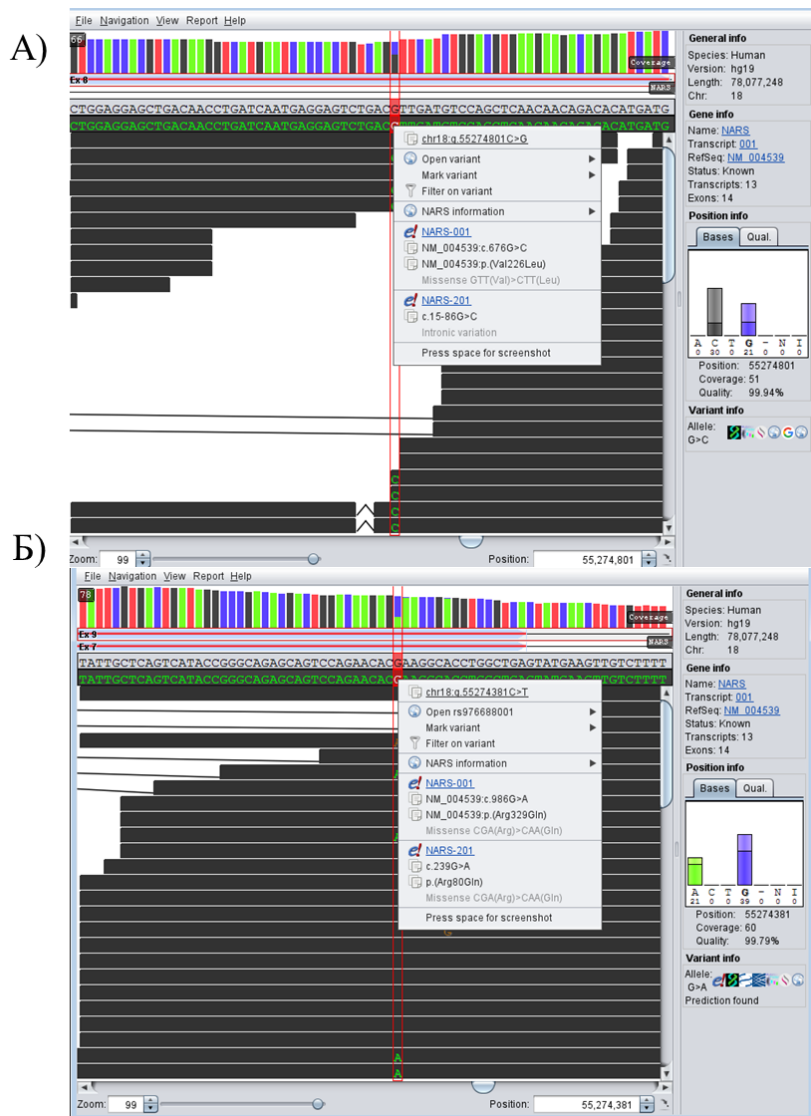
Клинична картина

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

Молекулярно-генетичен анализ

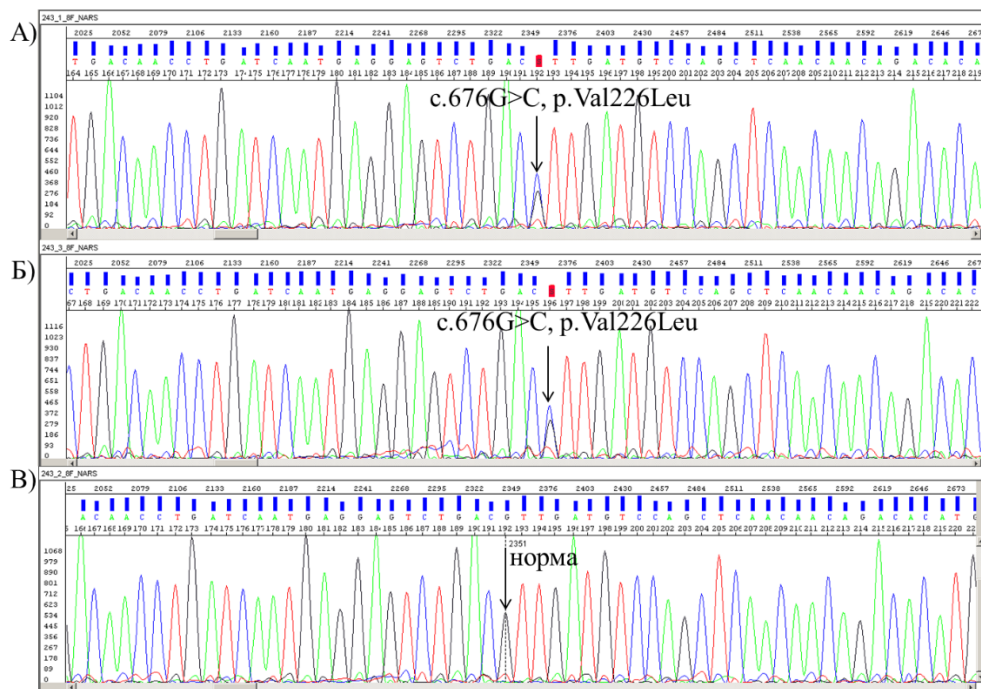
В този случай директно преминахме към секвениране от ново поколение (цялостно екзомно секвениране), тъй като няхахме ясен генетичен таргет.

На база на проведения молекулярно-генетичен анализ установихме наличието на два хетерозиготни варианта с.676G>C, p.Val226Leu и с.986G>A, p.Arg329Gln в *NARS1* гена (NM_004539) (Фигура 32).

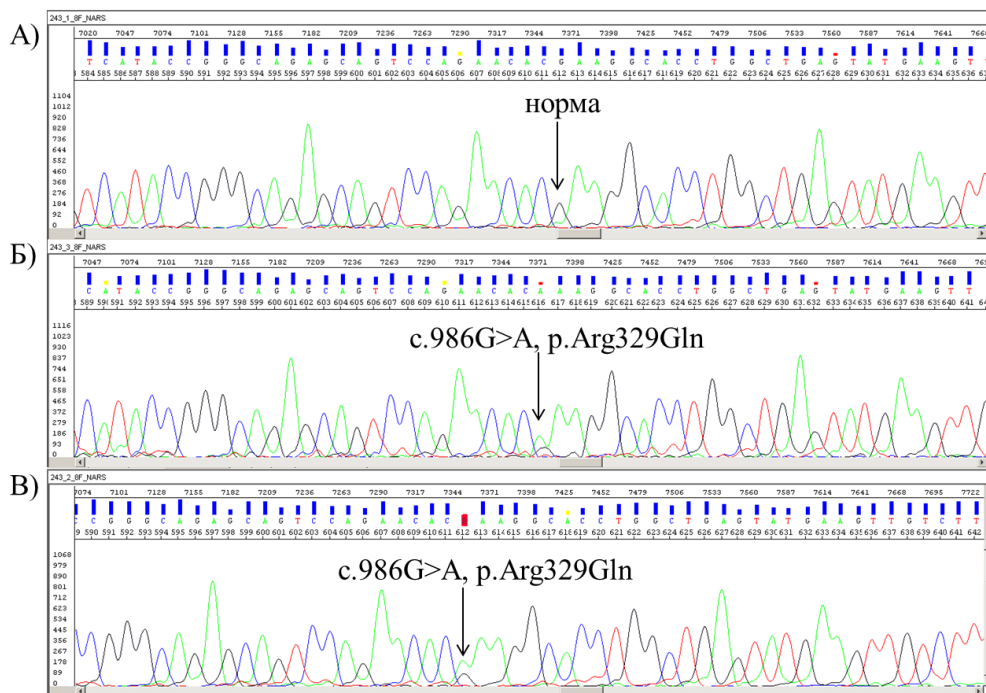


Фигура 32: Секвенционен NGS профил на генетичните варианти в *NARS1* гена. А). Секвенционен профил на варианта c.676G>C, p.Val226Leu. Б). Секвенционен профил на варианта c.986G>A, p.Arg329Gln.

За да проверим модела на унаследяване на двата генетични варианти, проведохме сегрегационен анализ в семейството, който показва, че генетичният вариант c.676G>C е унаследен от майката на пациентката, докато вариантът c.986G>A е унаследен от бащата (Фигура 33 и Фигура 34).

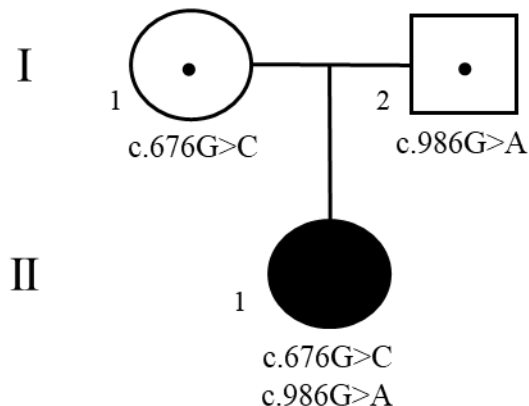


Фигура 33: Секвенционен профил на мутацията c.676G>C, p.Val226Leu в гена *NARS1*. А). Секвенционен профил на майката, хетерозиготен носител на варианта. Б). Секвенционен профил на пациентката, хетерозиготен носител на варианта. В). Секвенционен профил на бащата, който показва нормален генотип.



Фигура 34: Секвенционен профил на мутацията c.986G>A, p.Arg329Gln в гена *NARS1*. А). Секвенционен профил на майката, който показва нормален генотип. Б). Секвенционен профил на пациентката, хетерозиготен носител на варианта. В). Секвенционен профил на бащата, хетерозиготен носител на варианта.

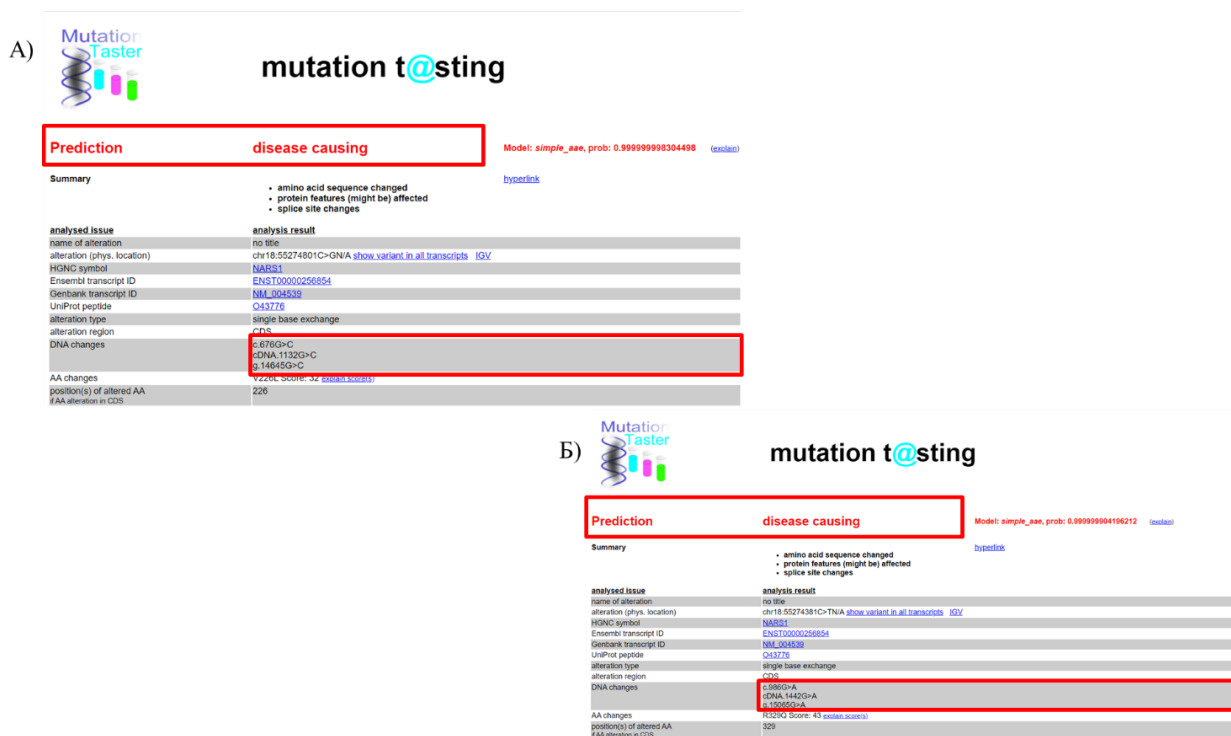
Това потвърждава разположението на генетичните варианти върху двата алела на гена *NARS1* при таргетната пациентка и съответства на автозомно-рецесивен модел на унаследяване (Фигура 35).



Фигура 35: Родословно дърво, показващо разположението на детектираните варианти в *NARS1* гена при таргетната пациентка и нейните родители.

Генетичните варианти c.676G>C, p.Val226Leu и c.986G>A, p.Arg329Gln не са откривани сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1), което ни дава основание да заключим, че те са с изключително ниска честота в общата популация. Към момента в базите данни ClinVar и LOVD са публикувани по-малко от 30 генетични варианта при пациенти с *NARS1*-свързани заболявания. Клиничните характеристики на тези пациенти включват общо изоставане в развитието, изоставане или липса на говор, микроцефалия, аномалии в походката, гърчова симптоматика и др. (OMIM: * 108410), което съответства на клиничната картина, наблюдавана при нашата пациентка. По-малко от 50 засегнати пациенти с missense, nonsense и frameshift мутации по дължината на *NARS1* гена са описани към момента в световната литература (Manole *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Това ни дава основание да смятаме, че или *NARS1*-свързаните заболявания са с изключително ниска честота в световен мащаб, или те все още не са достатъчно добре диагностицирани. Въпреки че идентифицираните от нас генетични находки не са докладвани преди в асоциация със заболявания при човек следните доказателства са в подкрепа на

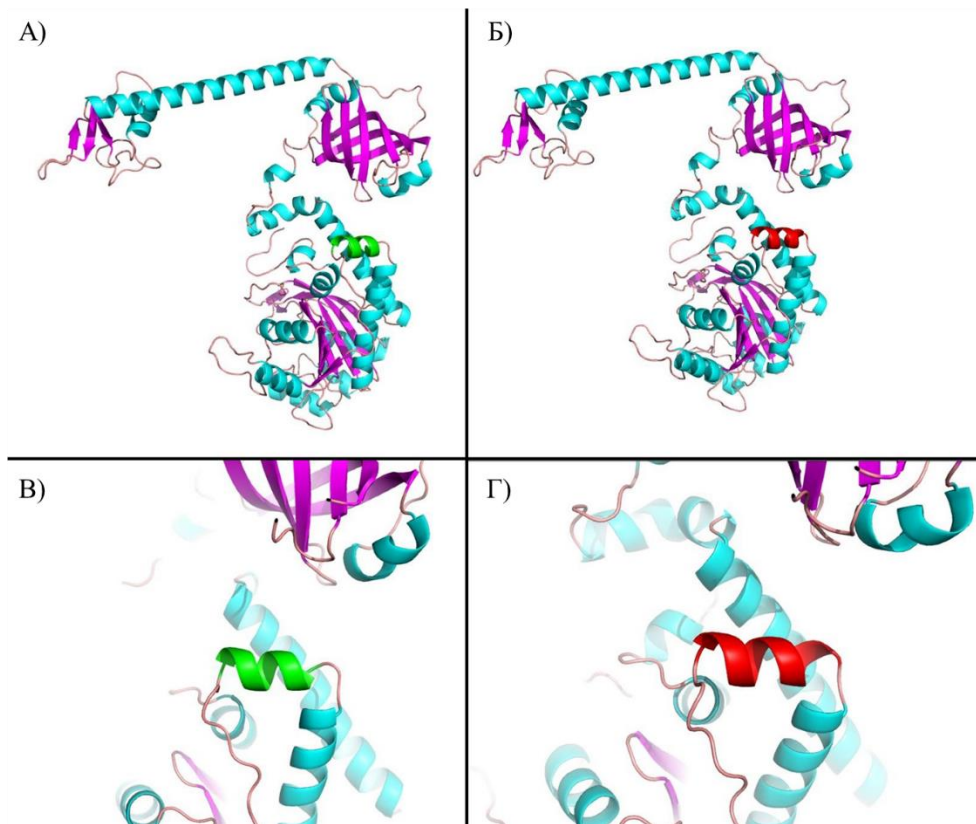
патогенната им природа: 1) отсъствието на вариантите от контролните популации по проекта gnomAD, 2) резултатите от *in silico* предиктор MutationTaster, който потвърждава патогенната природа на вариантите (Фигура 36), 3) резултатите от сегрегационния анализ, които потвърждават автозомно-рецесивен модел на унаследяване и 4) съответствието на клиниката при пациентката с описаните към момента *NARS1*-свързани заболявания. На база на стандартите и препоръките на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицирахме откритите в *NARS1* варианти като вероятно патогенни.



Фигура 36: Резултати от *in silico* предиктор MutationTaster. А). Оценка на варианта c.676G>C – вариант причиняващ заболяване. Б). Оценка на варианта c.986G>A – вариант причиняващ заболяване.

Използвайки AlphaFold2, създадохме *in silico* белтъчни модели, за да проверим дали откритите missense варианти водят до структурни изменения в протеина. Установихме, че един от тях (p.Val226Leu) води до лека промяна в протеиновата структура, посредством удължаване на алфа-спирала в резултат на включване на аминокиселина пролин на позиция 369 от полипептидната верига на белтъка, кодиран от *NARS1* гена, в структурата ѝ. В нормалния протеин тази аминокиселина не влиза в структурата на алфа-спиралата. Другият

генетичен вариант p.Arg329Gln не показва структурни изменения върху белтъка, на база на *in silico* модела (Фигура 37).



Фигура 37: Протеинови модели на дивия тип и p.Val226Leu мутантната цитоплазмена аспарагинил-тРНК синтетаза. А). Див тип цитоплазмена аспарагинил-тРНК синтетаза. Б). AlphaFold2 модел на p.Val226Leu мутацията. В). Дивият тип алфа-спирала (маркирана със зелен цвят) в протеина. Г). Удълженият мотив (маркиран с червен цвят), получен в резултат на вмъкване на пролин, локализиран на позиция 369 в полипептидната верига на белтъка, кодиран от *NARS1* гена, в структурата на алфа-спиралата.

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

Потвърждаването на диагнозата при таргетната пациентка допринесе за провеждане на коректна медико-генетична консултация в семейството. При следваща бременност ще се проведе пренатална диагностика с цел превенция на *NARSI*-свързаното заболяване.

4.1.1.3. *TPPI*-свързани заболявания

Клинична картина

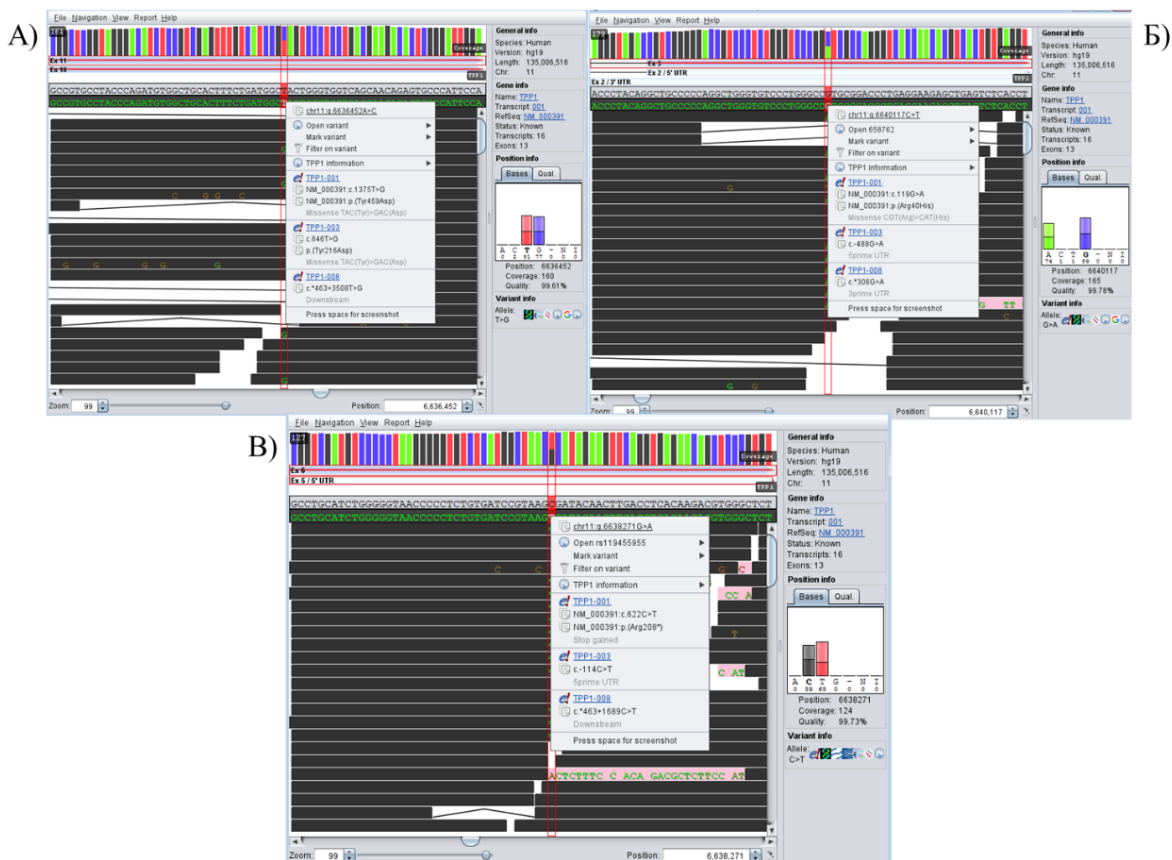
Индексният пациент е на 4 години от женски пол с нормално постнатално развитие. На възраст от 3 години се наблюдават първите миоклонични епилептични пристъпи. Атаксия и регрес в развитието също са едни от водещите клинични характеристики, наблюдавани при пациентката. На база на проведена магнитно-резонансна томография се установява хидросирингомиелия на гръбначния стълб и дифузни атрофични промени в главния мозък. На 5-годишна възраст е насочена за молекулярно-генетичен анализ с цел установяване на причината, довела до тези клинични състояния.

Молекулярно-генетичен анализ

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

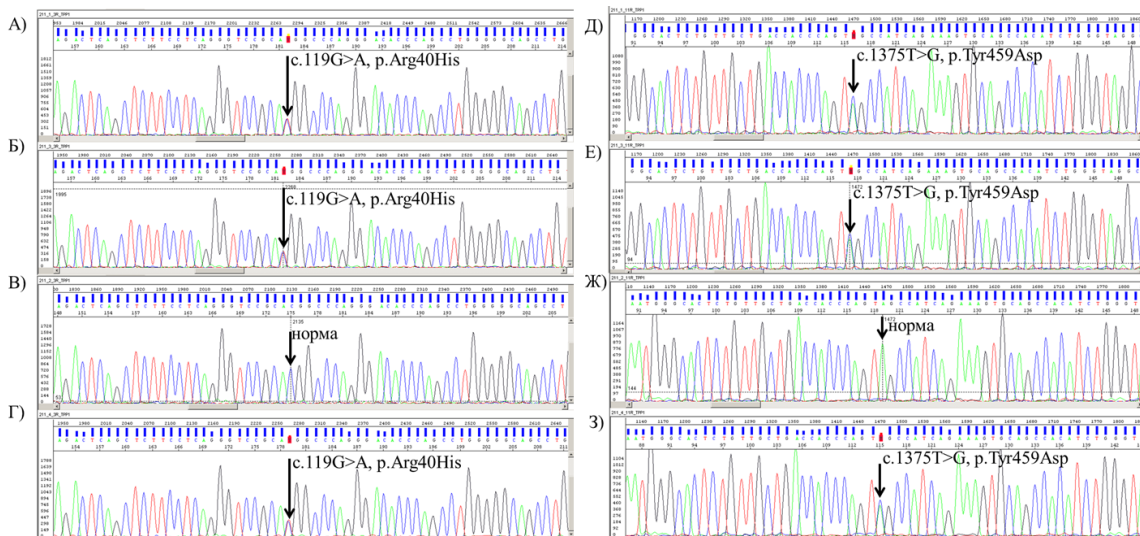
Поради тази причина преминахме към цялостно екзомно секвениране с таргетен анализ на гени, мутации в които са доказана причина за гореописаните клинични прояви.

На база на проведения молекулярно-генетичен анализ установихме наличието на три хетерозиготни варианта c.119G>A, p.Arg40His; c.1375T>G, p.Tyr459Asp и c.622C>T, p.Arg208Ter в *TPPI* гена (NM_000391) (Фигура 38).

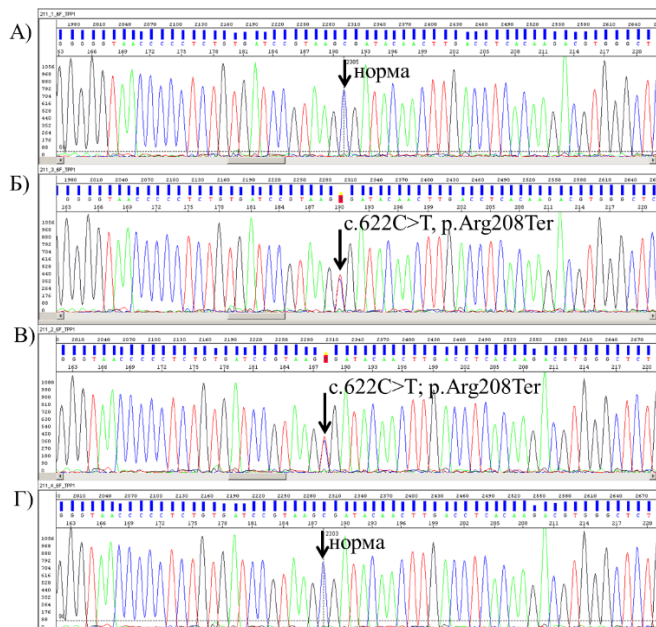


Фигура 38: Секвенционен NGS профил на генетичните варианти в *TPP1* гена. А). Секвенционен профил на варианта с.1375T>G, р.Тур459Асп. Б). Секвенционен профил на варианта с.119G>A, р.Арг40His. В). Секвенционен профил на варианта с.622C>T, р.Арг208Тер.

За да определим локализацията на откритите генетични варианти върху алелите на *TPP1* гена при таргетната пациентка, проведохме сегрегационен анализ в семейството, чрез класическо секвениране по Sanger. Получените резултати показаха, че генетичните варианти с.119G>A и с.1375T>G са локализирани на единия алел на гена (майчиния алел), а вариантът с.622C>T е локализиран на другия алел на гена (бащиния алел). В допълнение установихме, че здравата сестра на пациентката е носител само на едноалелните варианти с.119G>A и с.1375T>G в *TPP1* гена в хетерозиготно състояние, което означава, че тя е клинично здрав носител, като своята майка (Фигура 39 и Фигура 40).



Фигура 39: Секвенционен профил на вариантите c.119G>A, p.Arg40His и c.1375T>G, p.Tyr459Asp в гена *TPPI1*. А). Секвенционен профил на майката, хетерозиготен носител на варианта c.119G>A. Б). Секвенционен профил на пациентката, хетерозиготен носител на варианта c.119G>A. В). Секвенционен профил на бащата, който показва нормален генотип. Г). Секвенционен профил на здравата сестра, хетерозиготен носител на варианта c.119G>A. Д). Секвенционен профил на майката, хетерозиготен носител на варианта c.1375T>G. Е). Секвенционен профил на пациентката, хетерозиготен носител на варианта c.1375T>G. Ж). Секвенционен профил на бащата, който показва нормален генотип. З). Секвенционен профил на здравата сестра, хетерозиготен носител на варианта c.1375T>G.



Фигура 40: Секвенционен профил на варианта c.622C>T, p.Arg208Ter в гена *TPPI1*. А). Секвенционен профил на майката, който показва нормален генотип. Б). Секвенционен профил на пациентката, хетерозиготен носител на варианта. В). Секвенционен профил на бащата, хетерозиготен носител на варианта. Г). Секвенционен профил на здравата сестра, който показва нормален генотип.

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

Генетичният вариант с.1375T>G, p.Tyr459Asp в *TPPI* гена не е откриван в контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1), което показва, че е с много ниска честота в общата популация. Вариантът с.1375T>G не е съобщаван преди в асоциация с *TPPI*-свързани заболявания, въпреки това на същата аминокиселинна позиция е откриван вероятно патогенен вариант с.1376A>C, p.Tyr459Ser при пациенти с Невронална цероидна липофусциноза 2 (Sheth *et al.*, 2018; Angural *et al.*, 2021). Sheth *et al.*, 2018 считат, че вариантът p.Tyr459Ser вероятно компрометира активния център и дестабилизира хидрофобния джоб на трипептидил-пептидаза I (Sheth *et al.*, 2018), което от своя страна може да доведе до редуциране или липса на ензимната активност и до изявата на клиничните симптоми, характерни за заболяването. На база на тези резултати се установява значимостта на аминокиселината тирозин в позиция 459 на аминокиселинната последователност, кодирана от *TPPI* гена. Замени, засягащи тази аминокиселина най-вероятно биха били с патогенен ефект. В съответствие със стандартите и препоръките на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицираме открития от нас вариант с.1375T>G като вероятно патогенен.

Nonsense вариантът с.622C>T, p.Arg208Ter в *TPPI* гена е един от най-честите генетични дефекти при пациентите с Невронална цероидна липофусциноза 2 (Gardner *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2021). Ma *et al.*, 2021 доказват, че хомозиготните носители на варианта могат да имат редуциран или липсващ протеин, следователно и дефицит на ензимната активност на трипептидил-пептидаза I. Вариантът с.622C>T е откриван сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1), като неговата популационна честота е оценена на 0.03% (няма докладвани хомозиготни носители). Вариантът е съобщаван в базата данни ClinVar под номер 2643, като патогенен (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/2643/>). Базирайки

се на стандартите и препоръките на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицираме варианта с.622C>T като вероятно патогенен.

Описаните генетични варианти най-вероятно компрометират функцията на ензима трипептидил-пептидаза I, която е лизозомна екзопептидаза, отстраняваща последователно трипептидите от N краищата на полипептидите (субстратите). Нарушената функция на трипептидил-пептидаза I води до натрупване на протеини/пептиди и други вещества в лизозомите, като по този начин се компрометира тяхната функция.

Откритите генетични находки в комбинация с наблюдавания фенотип при таргетната пациентка ни дадоха основание да заключим, че при нея се касае за диагноза Невронална цероидна липофусциноза 2, дължаща се на патогенни варианти в *TPP1* гена.

Потвърждаването на диагнозата беше от изключително значение, тъй като това позволи да се проведе терапия при засегнатото дете. При пациентите с Невронална цероидна липофусциноза 2, дължаща се на патогенни варианти в *TPP1* гена, се прилага ензим-заместителна терапия, която доставя TPP1 директно в мозъка. При пациентите, подложени на тази терапия се наблюдава стационаране на заболяването. В допълнение трябва да отбележим и това, че ранната диагностика на заболяването може да позволи на таргетните пациенти да бъдат лекувани на по-ранен етап или дори пресимптоматично (Mole *et al.*, 2021).

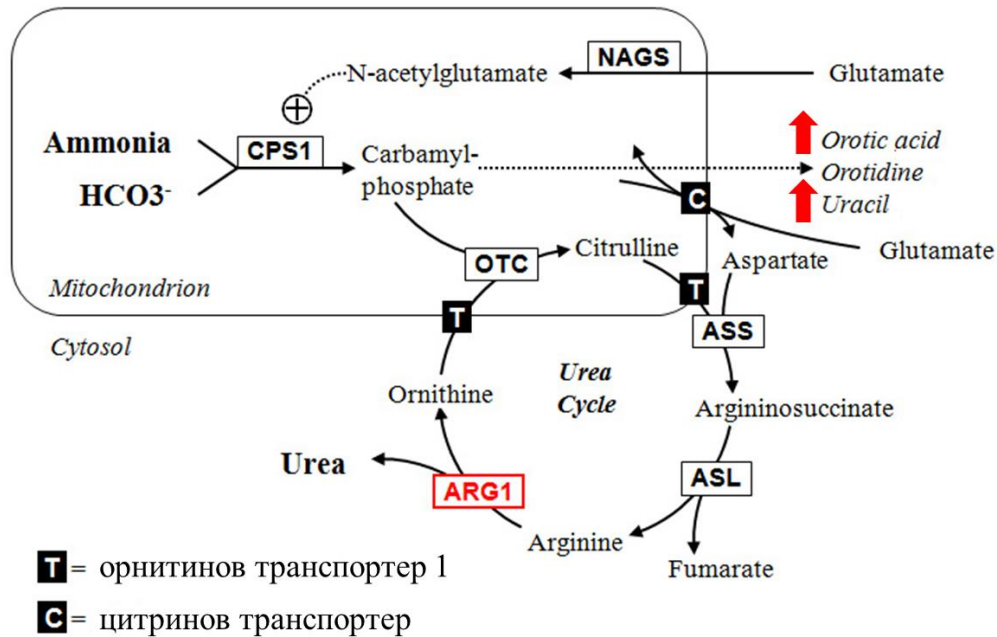
4.1.1.4. ARG1-свързани заболявания

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

Клинична картина на случай 1

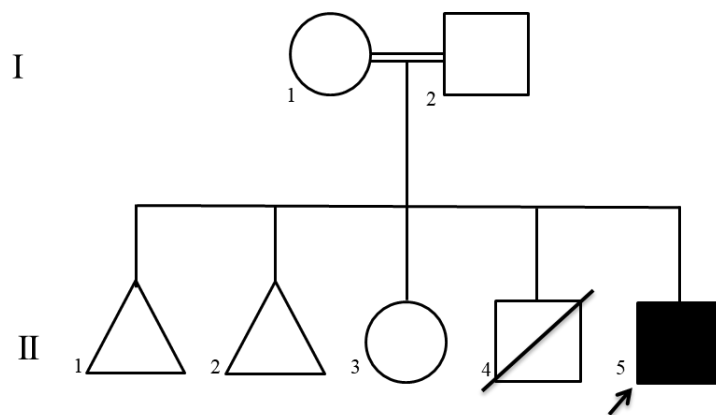
Момче на 14 години (към момента на генетичното изследване) от ромски произход, родено от пета нормално протекла бременност. Регрес в развитието се наблюдава от 9-месечна възраст: спира да сяда сам и не може да се изправя на крака. На 20-месечна възраст е диагностициран с епилепсия. Освен това е налице и тежка спастичност. Проведеният метаболитен скрининг показва високи нива на оротова киселина и урацил в урината, както и

повишени нива на аргинин и амоняк в кръвта. Всички тези изменения дават индикация за дефект в урейнния цикъл и по конкретно аргиназен дефицит (Фигура 41).



Фигура 41: Схематично представяне на урейнния цикъл. С червени стрелки на фигурата са маркирани метаболитите (оротова киселина и урацил), при които се наблюдават отклонения в резултат на нарушената функция на аргиназа-1 (<https://www.medlink.com/media/gha1> с модификации).

Фамилната история включва близкородствен брак (родителите са трети братовчеди), майката има два спонтанни аборта и едно починало дете на 9 месеца (след хоспитализация поради повръщане, диария и епилептичен статус в хода на инфекция). Семейството имат и едно незасегнато момиче (Фигура 42).

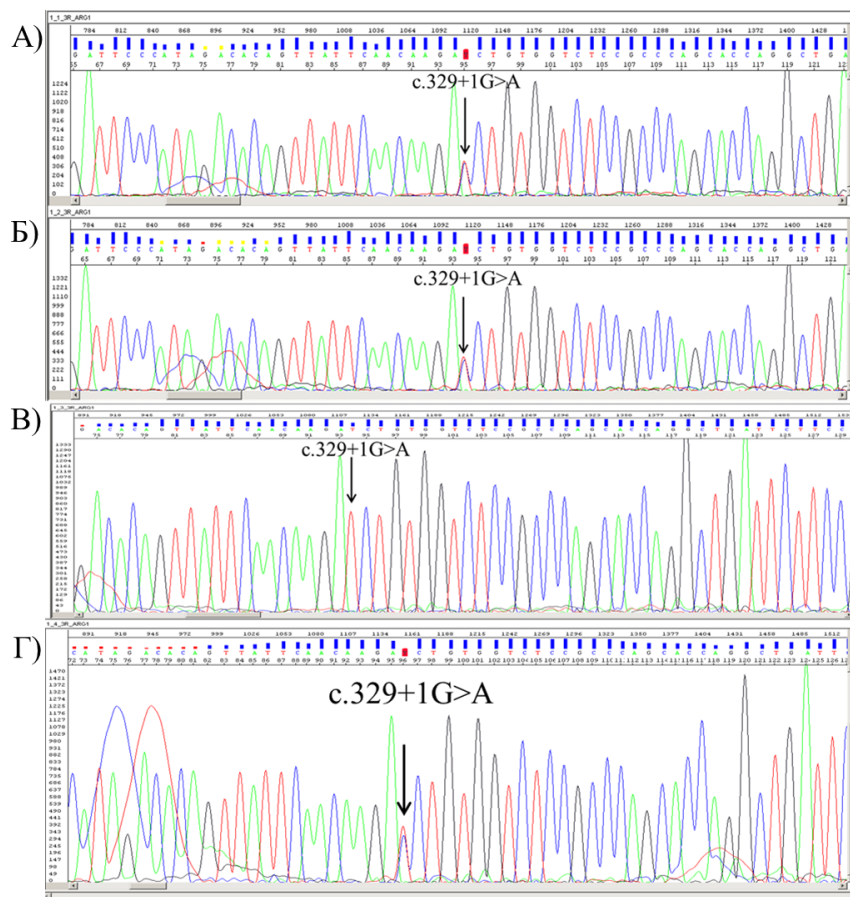


Фигура 42: Родословно дърво на семейството с предполагаема диагноза аргиназен дефицит.

Молекулярно-генетичен анализ

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

Проведеният молекулярно-генетичен анализ показва наличието на непубликуван хомозиготен splice site вариант c.329+1G>A в интрон 3 на *ARG1* гена (NM_001244438). Сегрегационният анализ в семейството показва, че родителите и здравата сестра на пациента са хетерозиготни носители на идентифицираната генетична находка (Фигура 43).



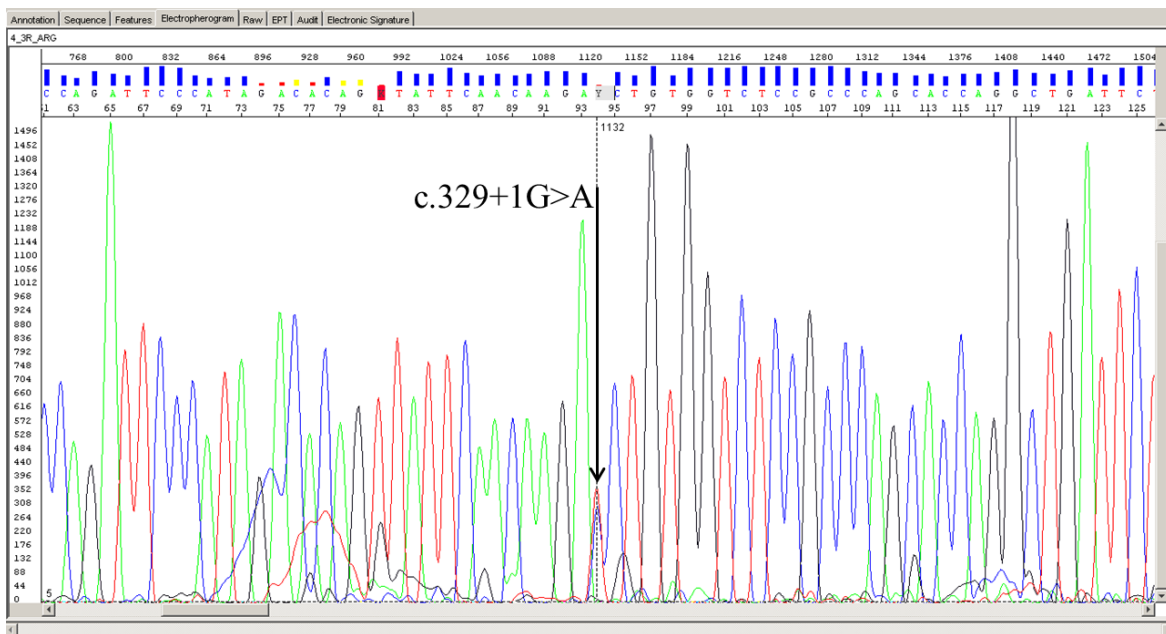
Фигура 43: Секвенционен профил на варианта $c.329+1G>A$ в гена *ARG1*. А). Секвенционен профил на майката, хетерозиготен носител на варианта. Б). Секвенционен профил на бащата, хетерозиготен носител на варианта. В). Секвенционен профил на пациента, хомозиготен носител на варианта. Г). Секвенционен профил на здравата сестра, хетерозиготен носител на варианта $c.329+1G>A$ в гена *ARG1*.

Генетичният вариант $c.329+1G>A$ в гена *ARG1* не е откриван сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1). Освен това той най-вероятно води до нарушаване на правилния екзонен сплайсинг, което се потвърждава и с теоретичен *in silico* предиктор Human Splicing Finder v3.0 (Desmet *et al.*, 2009). Jain-Ghai *et al.*, 2011, предполагат, че наличието на nonsense, splice site или frameshift мутации водят до неонатална изява на заболяването, докато missense вариантите се асоциират с класическа форма на заболяването с по-късно начало (Jain-Ghai *et al.*, 2011). Базирайки се на факта, че splice site вариантите не са много чести Villegas-Ruiz *et al.*, 2015 смятат, че този тип генетични дефекти водят до по-тежка фенотипна изява в сравнение с missense мутациите (Villegas-Ruiz *et al.*, 2015). Именно на това може да се дължи ранната и тежка изява при нашия пациент. Позовавайки се на

казаното до тук и съгласно критериите на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицираме открития генетичен вариант с.329+1G>A като патогенен.

В хода на медико-генетичната консултация със семейството, установихме че таргетният пациент е роден в резултат на близкородствен брак. Тъй като честотата на изява на рецесивните заболявания се повишава при близкородствени бракове предположихме, че е възможно наличието на ендемичен регион за заболяването аргиназен дефицит при роми от региона на с.Осиковица, Община Правец, Софийска област, от където е и нашият индексен пациент. За да проверим тази хипотеза проведохме селективен мутационен скрининг за генетичния вариант с.329+1G>A в *ARG1* гена при 100 новородени от ромски произход от региона на с.Осиковица. За да сравним и обобщим получените резултати изследвахме и 100 контролни проби на новородени от ромски произход от цялата страна за таргетния генетичен вариант. За целта на мутационния скрининг използвахме филтърни бланки на новородени от дадения географски регион и контролни проби от цялата страна. Филтърните бланки, които бяха обект на настоящото изследване, са набавяни за целите на неонаталния скрининг и ни бяха предоставени от екипа на Национална Генетична Лаборатория. Подборът на пробите от предполагаемия ендемичен регион се осъществи на база на информация, касаеща етническа принадлежност (ромски произход) и място на раждане (региона на с.Осиковица). Контролните проби от цялата страна бяха подбрани на база на етнически произход.

В резултат на проведените молекулярно-генетични изследвания установихме хетерозиготно носителство на варианта с.329+1G>A при една от изследваните проби от таргетния ендемичен регион (региона на с.Осиковица), което отговаря на честота на носителство 1% (1/100) (Фигура 44). Хетерозиготната проба е от с.Джурово, което се намира на 4 км. от с.Осиковица (Фигура 45).



Фигура 44: Секвенционен профил на таргетния генетичен вариант с.329+1G>A в *ARG1* гена, доказан при 1 от изследваните 100 проби от региона на с.Осиковица.



Фигура 45: Географско разположение на с.Джурово спрямо с.Осиковица.

Тъй като всеки ген има 2 алела, следователно бяха анализирани и двата алела на *ARG1* гена за всяка от 100-те проби, което означава, че общо бяха анализирани 200 алела.

Проведените молекулярно-генетични изследвания показаха честота на мутантния алел в нашата извадка 1:200 (0.5%).

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

Базирайки се на получените резултати доказахме висока честота на носителство на генетичния вариант с.329+1G>A при роми от региона на с.Осиковица спрямо цялата страна. Това ни дава основание да обособим тергетният географски регион като ендемичен за заболяването аргиназен дефицит. На база на честотата на заболяването в световен мащаб между 1:350,000 и 1:1,000,000 и честотата на носителство 1% в региона на с.Осиковица считаме, че провеждането на селективни скринингови програми сред хората от ромски произход от ендемичния регион биха помогнали за адекватната медико-генетична консултация в засегнатите семейства и биха довели до превенция на заболяването аргиназен дефицит в България.

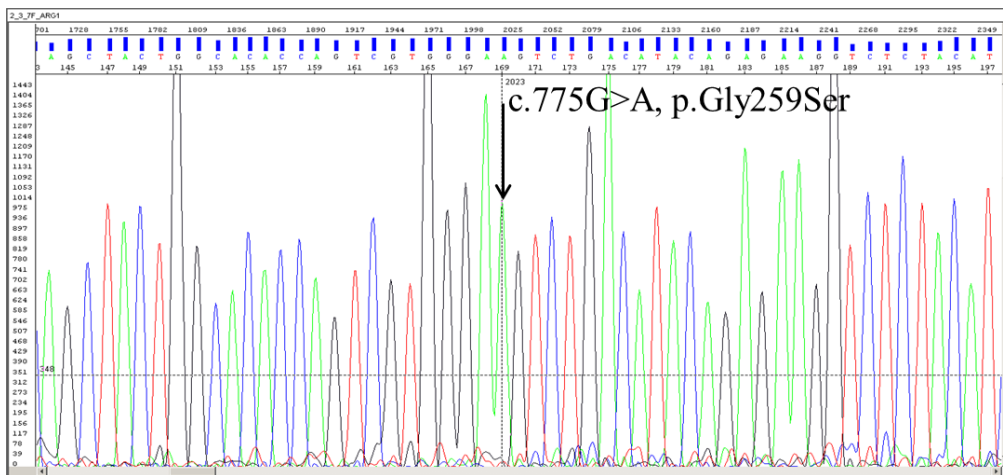
Клинична картина на случай 2

Индексният пациент е момче на 20 години (към момента на генетичното изследване), родено от нормално протекла бременност с нормално ранно моторно и нервно-психическо развитие. На 2-годишна възраст започва да ходи на пръсти, установява се спастична квадрипареза. Когнитивният спад започва да става очевиден на 7-годишна възраст. На 14-годишна възраст се наблюдава дизартрия. Година по-късно се проявяват и генерализирани тонично-клонични гърчове. На 20-годишна възраст при пациента манифестира спастична квадрипареза, псевдобулбарна дисфагия и дизартрия, нистагъм, атаксия, сколиоза и хипотрофии в дисталните части на четирите крайника. Проведените метаболитни изследвания установиха високи нива на аргинин в кръвта и повишени нива на оротова киселина и урацил в урината, съответстващи на диагноза аргиназен дефицит.

Молекулярно-генетичен анализ

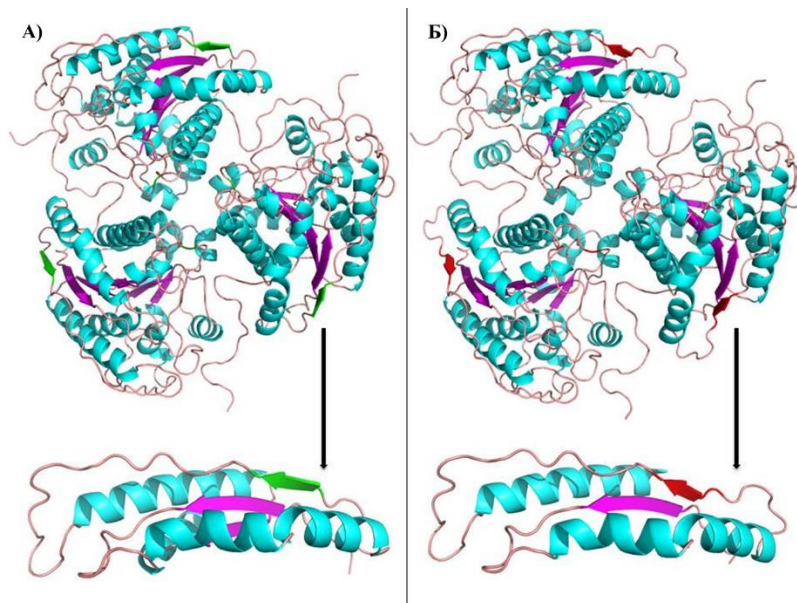
Таргетно секвениране по Sanger на *ARG1* гена беше проведено върху ДНК материал от индексния пациент, предоставен от Национална Генетична Лаборатория. Молекулярно-генетичният анализ показва наличие на хомозиготен missense вариант с.775G>A, p.Gly259Ser

в екзон 7 на *ARG1* гена (NM_001244438) (Фигура 46). Сегрегационният анализ в семейството не беше възможен поради липса на генетичен материал от родителите.



Фигура 46: Секвенционен профил на варианта c.775G>A, p.Gly259Ser в *ARG1* гена.

Вариантът c.775G>A не е откриван сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1). Elsayed *et al.*, 2020 смятат, че missense варианти в консервативните региони (екзони 1, 4 и 7) на *ARG1* гена може да имат влияние върху каталитичната активност на ензима, което определя вариантите, локализирани в тези региони на гена като вероятно патогенни (Elsayed *et al.*, 2020). Патогенната природа на открития вариант може да се обясни и с промените в протеиновата структура на ензима аргиназа-1. Откритата мутация води до замяна на аминокиселината глицин със серин на позиция 259 в аминокиселинната последователност, кодирана от гена *ARG1*. Генерирахме *in silico* протеинов модел, използвайки AlphaFold2, който показва, че откритата генетична находка най-вероятно води до промяна в структурата на протеина. В нативния протеин един от β -листове е изграден от четири аминокиселини Asp54, Val55, Lys56 и Asp57, докато в мутантния протеин този β -лист вече е съставен само от 3 аминокиселини Val55, Lys56 и Asp57 (Фигура 47).



Фигура 47: *In silico* протеинов модел на ензима аргиназа-1. А) Див тип протеин. Нормалният β -лист, който включва аминокиселини Asp54, Val55, Lys56 и Asp57 е маркиран със зелен цвят на фигурата. Б) Мутантен протеин. С червен цвят на фигурата е маркиран β -листа, в който се включват аминокиселините Val55, Lys56 и Asp57.

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

Увредената функция на аргиназа-1, която катализира превръщането на аргинин в урея и орнитин, нарушава нормалното образуване на урея в резултат на което излишният азот се натрупва в кръвта под формата на амоняк. Високите нива на амоняк и аргинин водят до тежка неврологична симптоматика, каквато се наблюдава и при нашите пациенти. В допълнение, както вече коментирахме, missense вариантите в *ARG1* гена вероятно водят до по-късна и по-лека клинична симптоматика при пациентите. Именно на това може да се дължи разликата в тежестта на клиничната изява при изследваните от нас пациенти (случай 1 и случай 2).

Навременното потвърждаване на диагнозата аргиназен дефицит би помогнало за адекватното лечение и диетичен режим, насочен към регулиране на повишените нива на аргинин при засегнатите пациенти. Освен това генетично верифицираните пациенти могат своевременно да бъдат подложени на новоутвърдени терапии (напр. ензим-заместителна терапия, РНК терапии др.) с цел лечение на заболяването или забавяне на прогресията му.

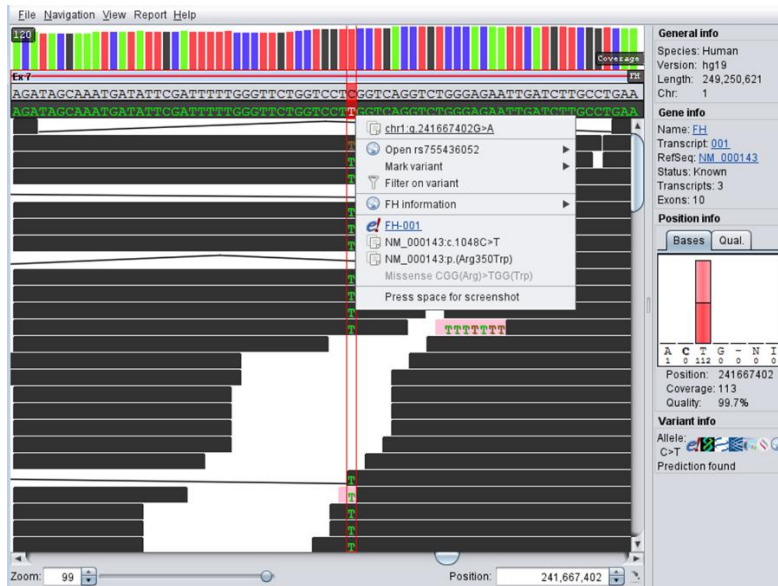
4.1.1.5. FH-свързани заболявания

Клинична картина

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

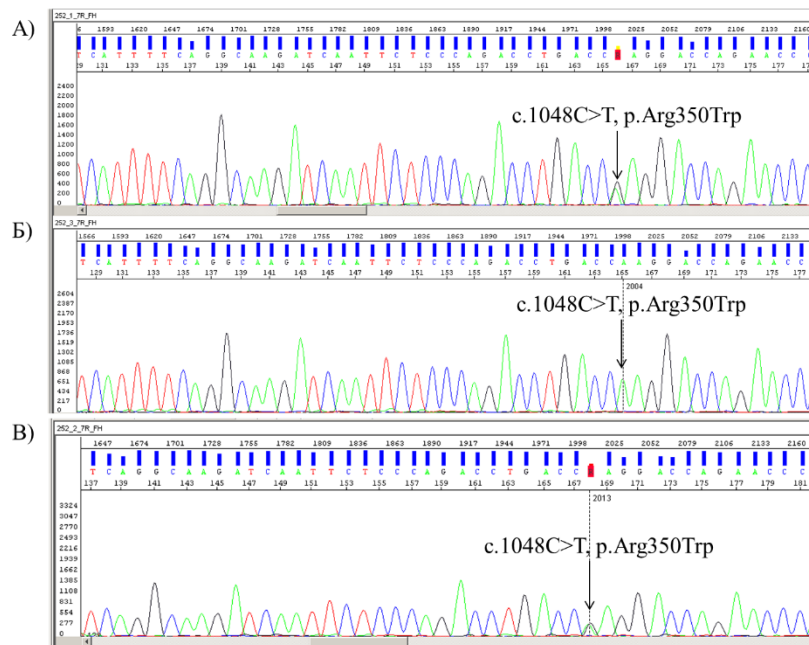
Молекулярно-генетичен анализ

Както вече описахме в някои от представените по-горе случаи, когато имаме всеобхватна клинична симптоматика без ясен генетичен таргет е най-добре да се премине към секвениране от ново поколение. В конкретния случай избрахме цялостно екзомно секвениране с анализ на таргетни гени, мутации в които могат да бъдат причина за наблюдаваната фенотипна изява. Проведеният молекулярно-генетичен анализ показва наличието на хомозиготен missense вариант с.1048C>T, p.Arg350Trp в FH гена (NM_000143) (Фигура 48).



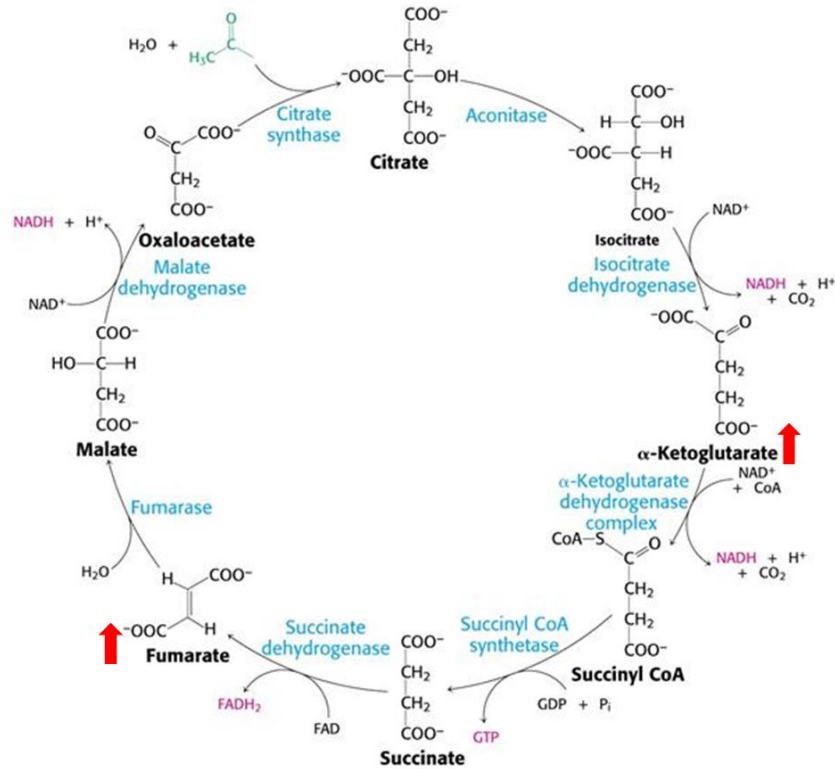
Фигура 48: Секвенционен NGS профил на генетичния вариант с.1048C>T, p.Arg350Trp в *FH* гена.

Сегрегационният анализ в семейството показва, че родителите на пациентката са хетерозиготни носители на идентифицираната генетична находка (Фигура 49).



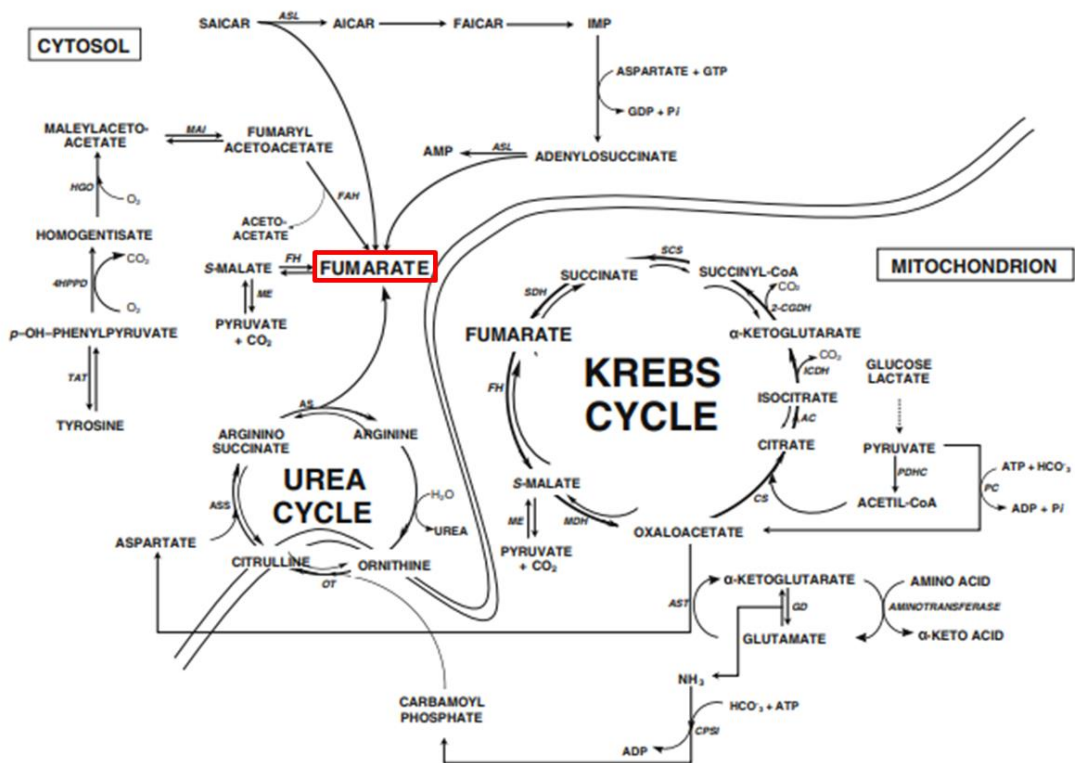
Фигура 49: Секвенционен профил на варианта с.1048C>T, p.Arg350Trp в *FH* гена. А). Секвенционен профил на майката, хетерозиготен носител на варианта. Б). Секвенционен профил на пациентката, хомозиготен носител на варианта. В). Секвенционен профил на бащата, хетерозиготен носител на варианта.

Патогенни варианти по дължината на *FH* гена са доказана причина за фумаразен дефицит. Тъй като фумаразният дефицит е метаболитно заболяване с широка неврологична симптоматика, насочихме пациентката към провеждане на метаболитно изследване с цел потвърждаване на диагнозата и чрез метаболитен тест. На база на проведените изследвания се установиха повишени нива на фумарат, 2-оксоглутарат (алфа-кетоглутарат) и 4-хидроксibenзоат в урината, което потвърждава диагноза фумаразен дефицит (Фигура 50).



Фигура 50: Схематично представяне на цикъла на Кребс. С червени стрелки на фигурата са маркирани метаболитите (фумарат и алфа-кетоглутарат), при които се наблюдават отклонения в резултат на нарушена функция на ензима фумараза (https://teaching.ncl.ac.uk/bms/wiki/index.php/Krebs_cycle с модификации).

Нарушената функция на ензима фумараза води до натрупване на фумарат, в резултат на което се увреждат множество метаболитни пътища (Фигура 51), сред които са биосинтеза на пуринови нуклеотиди, катаболитният път на тирозина, урейният цикъл и цикълът на Кребс (Allegri *et al.*, 2010). Нарушаването на всички тези метаболитни пътища води до мултиорганно засягане и до всеобхватната клинична симптоматика, характерна за пациентите с фумаразен дефицит.



Фигура 51: Метаболитни пътища, включващи фумарат (Allegri *et al.*, 2010 с модификации).

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

Изясняването на генетичната причина, довела до клиничните симптоми при таргетната пациентка, беше от особено значение не само за провеждане на терапия след време (тъй като към момента няма ефективна терапия за пациентите с фумаразен дефицит), но и за превенция на заболяването в семейството. Чрез установяване на носителския статус на родителите на пациентката, знаем, че семейството има 25% риск за дете с фумаразен дефицит. Поради тази причина се препоръчва пренатална диагностика при всяка следваща бременност, за да се избегне появата на това тежко неврологично заболяване отново в семейството.

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

От групата на пероксизомните заболявания ще разгледаме два клинични случая.

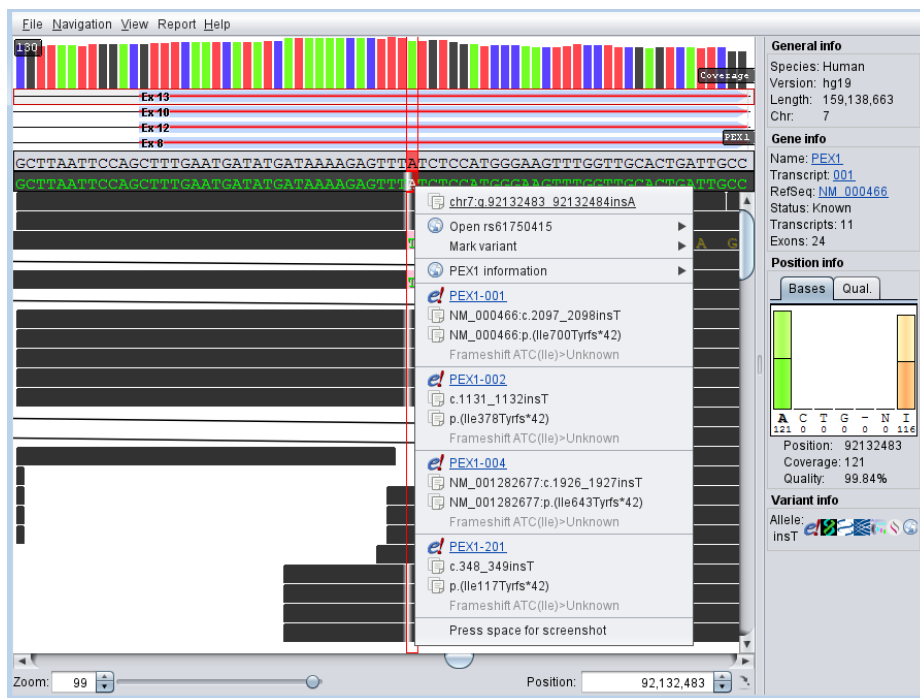
Клинична картина на случай 1

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

Молекулярно-генетичен анализ

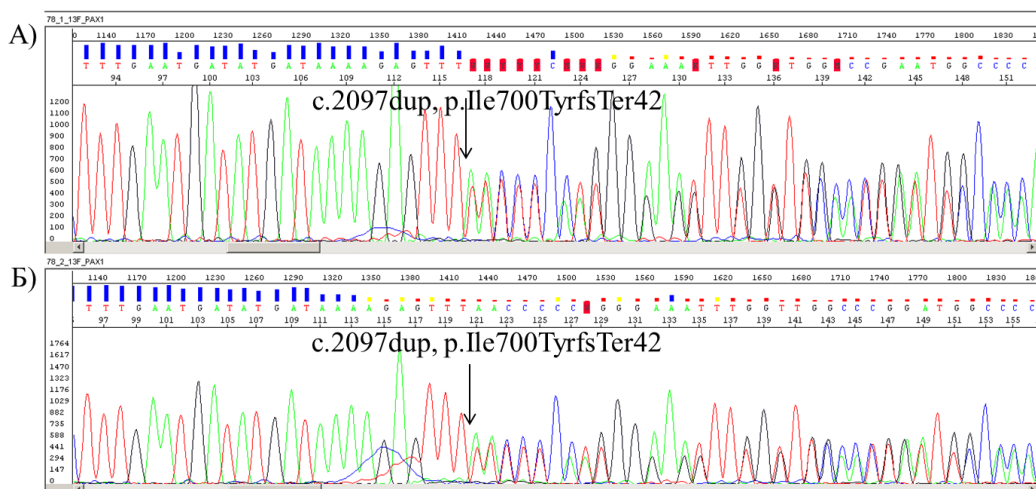
Тъй като пероксизомните заболявания могат да се проявяват в резултат от мутации в голям набор от гени, директно преминахме към секвениране от ново поколение. Избрахме да проведем клинично екзомно секвениране (~4800 гена), поради факта, че имаме ясно поставена клинична диагноза – Пероксизомно заболяване.

На база на проведения молекулярно-генетичен анализ установихме хомозиготен frameshift вариант с.2097dup, p.Le700TyrfsTer42 в *PEX1* гена (NM_000466) (Фигура 52).



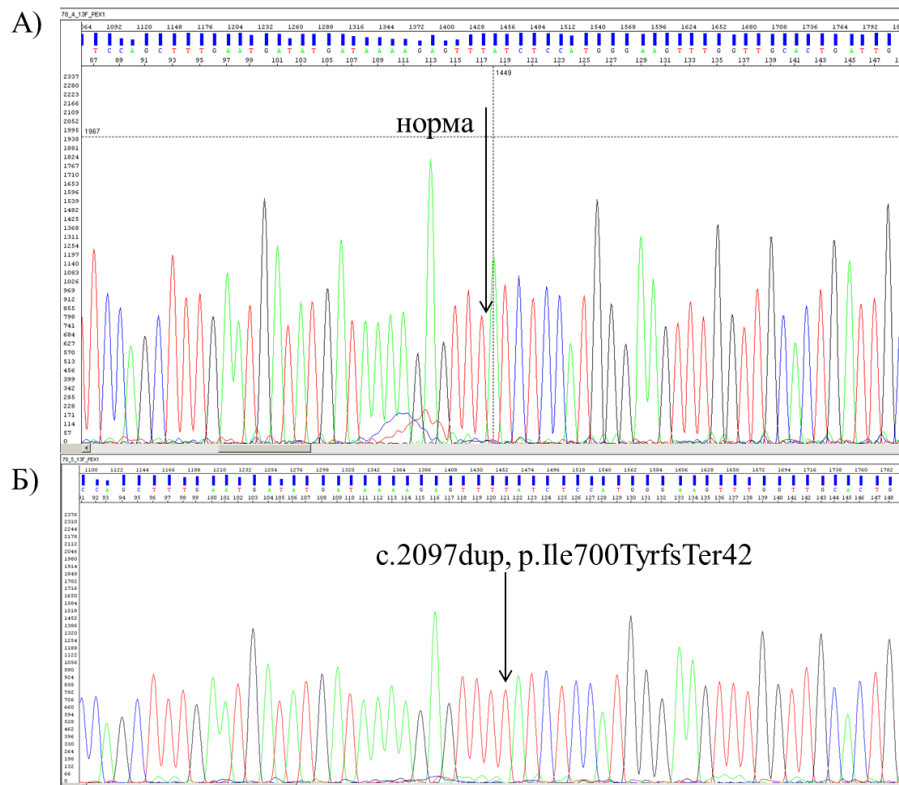
Фигура 52: Секвенционен NGS профил на генетичния вариант c.2097dup, p.Ile700TyrfsTer42 в *PEX1* гена.

Сегрегационният анализ в семейството показва, че родителите на пациентката са хетерозиготни носители на идентифицираната генетична находка (Фигура 53), което потвърждава автозомно-рецесивния модел на унаследяване.



Фигура 53: Секвенционен профил на варианта c.2097dup, p.Ile700TyrfsTer42 в *PEX1* гена. А). Секвенционен профил на майката, хетерозиготен носител на варианта. Б). Секвенционен профил на бащата, хетерозиготен носител на варианта.

В хода на изработване на настоящия дисертационен труд проведохме и две пренатални диагностики в семейството по повод на идентифицирания вариант в *PEX1* гена. Единият фетус не беше носител на генетичния вариант, докато другият беше отново засегнат, хомозиготен носител на вариатна с.2097dup, p.Ile700TyrfsTer42 (Фигура 54).



Фигура 54: Секвенционен профил на варианта с.2097dup, p.Ile700TyrfsTer42 в *PEX1* гена при изследваните фетуси. А). Секвенционен профил на фетус с нормален генотип. Б). Секвенционен профил на фетус, хомозиготен носител на варианта.

Генетичният вариант е откриван сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1), като неговата популационна честота е оценена на 0.05% (няма докладвани хомозиготни носители). В допълнение мутацията е достъпна в базата данни ClinVar под номер 7519, като патогенна (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/7519/>). Откритият генетичен вариант с.2097dup, p.Ile700TyrfsTer42 е един от най-честите дефекти, засягащи *PEX1* гена. Той води до тежка фенотипна изява при засегнатите пациенти, което най-вероятно се обяснява с това, че генетичният дефект води до загуба на белтъчната функция (Collins and Gould, 1999; Crane, Maxwell and Paton, 2005) и нарушаване на нормалното сглобяване на пероксизомите. Доказано е, че генетичният дефект води до ниски нива на

PEX1 информационната РНК (иРНК), което е индикация, че получената в резултат на мутацията с.2097dup иРНК е таргет за разграждане по механизма на nonsense-mediated decay (NMD) (Waterham and Ebberink, 2012). Базирайки се на казаното до тук и съгласно препоръките на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицираме варианта като патогенен.

Представеният случай нагледно показва необходимостта от генетично верифициране на поставената диагноза. Тъй като пероксизомните заболявания са много тежки клинични състояния, които водят до летален изход, установяването на генетичната причина позволява провеждане на пренатална диагностика с цел превенция на заболяването. В конкретния случай извършихме две пренатални диагностики. В единия случай при семейството се роди здраво дете, носител на фамилия генетичен дефект, докато при втората пренатална диагностика, установихме, че фетусът е хомозиготен носител на идентифицирания генетичен вариант в *PEX1* гена. На база на този резултат бременността беше прекъсната по медицински показания, като по този начин в семейството се предотврати раждането на второ дете с пероксизомно заболяване.

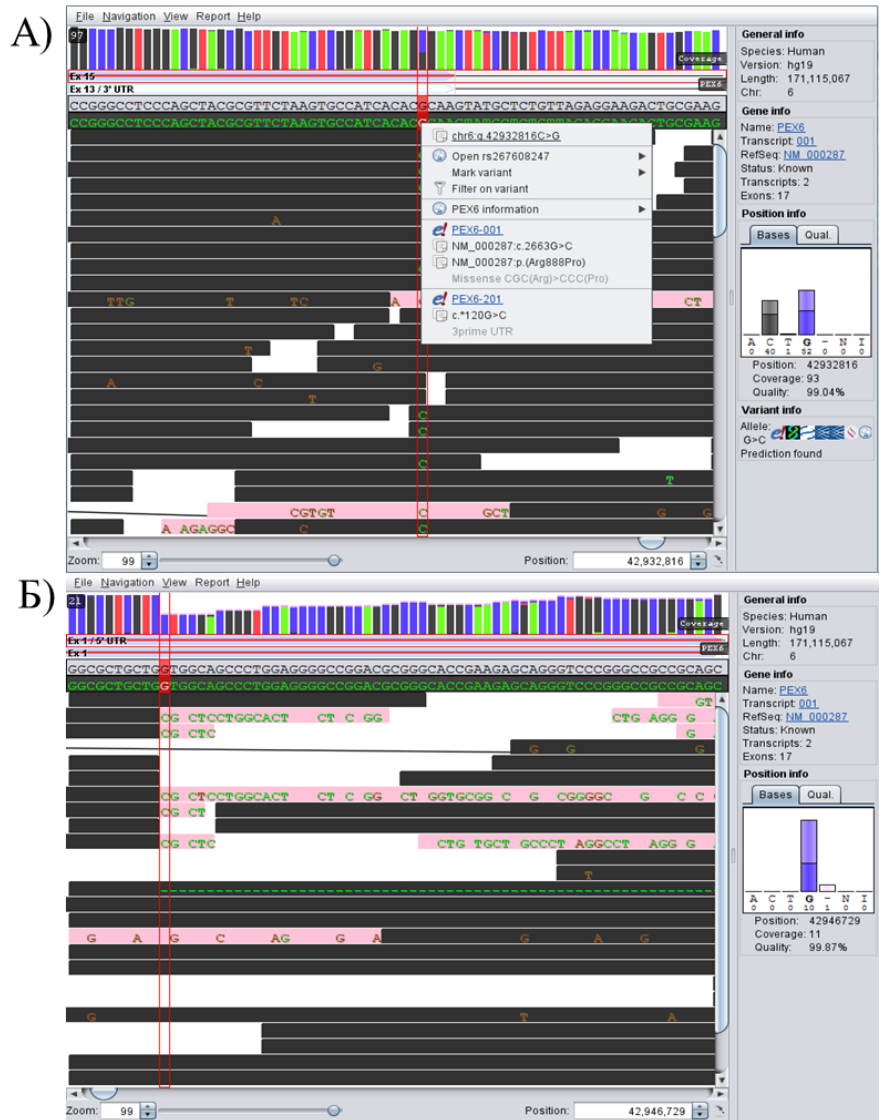
Клинична картина на случай 2

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

Молекулярно-генетичен анализ

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

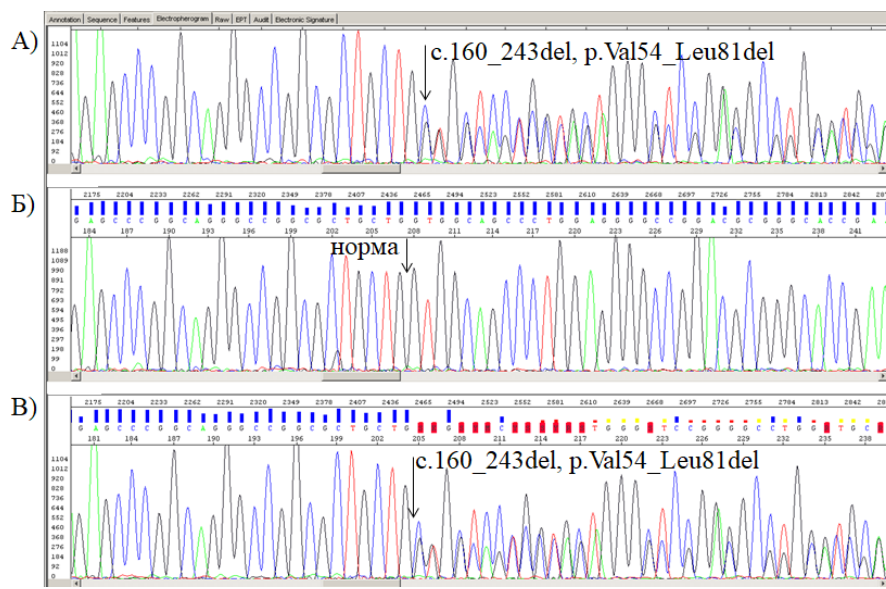
Проведените генетични изследвания показаха наличието на два хетерозиготни варианта с.2663G>C, p.Arg888Pro и с.160_243del, p.Val54_Leu81del в *PEX6* гена (NM_000287) (Фигура 55).



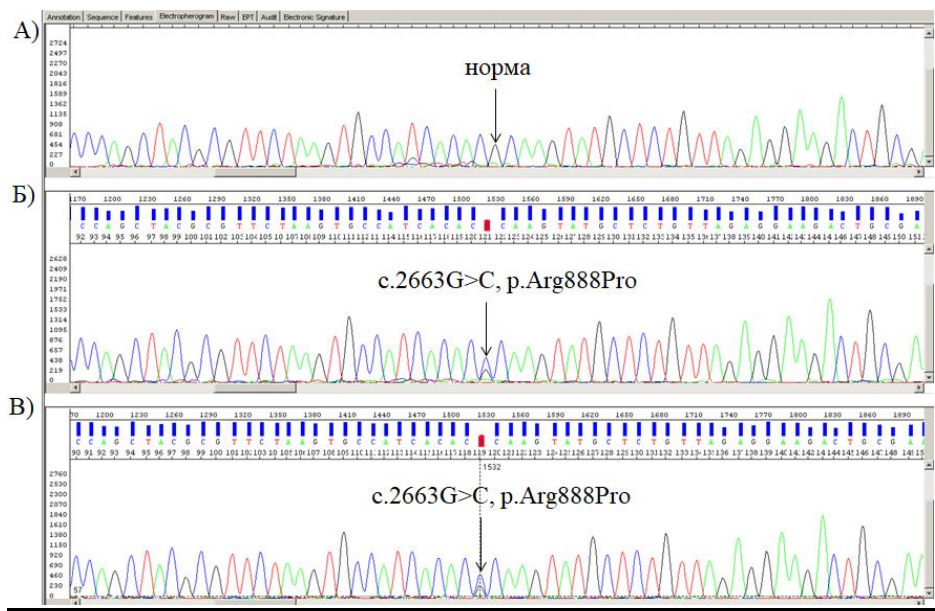
Фигура 55: Секвенционен NGS профил на *PEX6* мутациите при таргетната пациентка. А). Секвенционен профил на варианта c.2663G>C, p.Arg888Pro. Б). Секвенционен профил на варианта c.160_243del, p.Val54_Leu81del.

В хода на анализиране на данните от клиничното екзомно секвениране впечатление прави това, че генетичният вариант c.160_243del, p.Val54_Leu81del не е добре покрит и на практика можеше да бъде пропуснат (Фигура 55 Б). Тъй като имахме ясна генетична диагноза и наличието на един патологичен вариант c.2663G>C, p.Arg888Pro в ген, който би могъл да обясни наблюдаваната клинична симптоматика при пациентката, преминахме към по-задълбочен анализ, чрез който уснатовихме наличието и на втория вариант c.160_243del. Поради ограниченията на използвания метод за анализ (секвениране от ново поколение) е възможно да се наблюдават такъв тип събития, защото не винаги покритието на всички гени

или всички екзони от даден ген е достатъчно надеждно. Поради тази причина винаги се препоръчва верифициране на откритите генетични варианти, чрез друг метод (напр. секвениране по Sanger). В случаите, когато имаме ясна диагноза и откриваме само един генетичен вариант в ген с автозомно-рецесивен модел на унаследяване, се препоръчва набогатяване на непокритите екзони или анализирането им чрез секвениране по Sanger с цел откриване на втори генетичен дефект. В конкретния случай прегледахме файловете в дълбочина и установихме втори предполагаем вариант c.160_243del, p.Val54_Leu81del в *PEX6* гена. След това преминахме към верификация на откритите генетични находки и сегрегационен анализ в семейството, използвайки класическо секвениране по Sanger. Молекулярно-генетичният анализ потвърди наличието на вариантите c.2663G>C, p.Arg888Pro и c.160_243del, p.Val54_Leu81del при таргетната пациентка. Сегрегационният анализ установи, че вариантът c.160_243del е унаследен от майката на пациентката, докато вариантът c.2663G>C е унаследен от бащата (Фигура 56 и Фигура 57), което отговаря на автозомно-рецесивен модел на унаследяване.

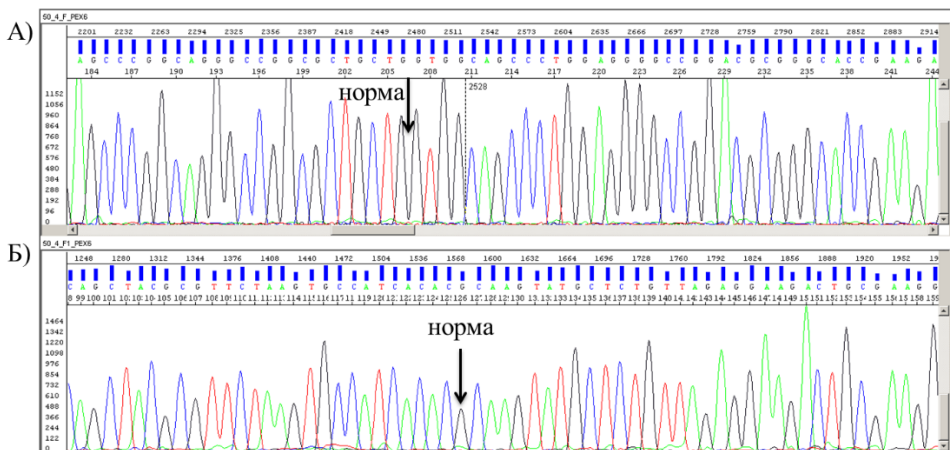


Фигура 56: Секвенционен профил на варианта c.160_243del, p.Val54_Leu81del в *PEX6* гена. А). Секвенционен профил на майката, хетерозиготен носител на варианта. Б). Секвенционен профил на бащата с нормален генотип. В). Секвенционен профил на пациентката, хетерозиготен носител на варианта.



Фигура 57: Секвенционен профил на варианта c.2663G>C, p.Arg888Pro в *PEX6* гена. А). Секвенционен профил на майката с нормален генотип. Б). Секвенционен профил на бащата, хетерозиготен носител на варианта. В). Секвенционен профил на пациентката, хетерозиготен носител на варианта.

В хода на изработване на настоящия дисертационен труд проведохме и пренатална диагностика в семейството по повод на идентифицираните варианти в *PEX6* гена. Молекулярно-генетичният анализ показва, че фетусът не е носител на фамилен генетични варианти c.2663G>C, p.Arg888Pro и c.160_243del, p.Val54_Leu81del (Фигура 58).



Фигура 58: Секвенционни профили на вариантите c.2663G>C, p.Arg888Pro и c.160_243del, p.Val54_Leu81del при изследвания фетус. А). Секвенционен профил на варианта c.160_243del, p.Val54_Leu81del - нормален генотип. Б). Секвенционен профил на варианта c.2663G>C, p.Arg888Pro – нормален генотип.

Идентифицираният генетичен вариант с.2663G>C в *PEX6* гена не е откриван в контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1). Той може да се проследи като патогенен в базата данни LOVD (<https://databases.lovd.nl/shared/variants/0000640194#00015987>). Генетичната находка е докладвана преди от Ebberink *et al.*, 2010 при пациент със заболяване от спектъра на Zellweger (Ebberink *et al.*, 2010). На същата нуклеотидна позиция е публикувана замяната с.2663G>A отново при пациент с ZSD (Wangler *et al.*, 2018). В допълнение всички докладвани случаи на пациенти, които носят замяна в позиция 2663 от нуклеотидната последователност на *PEX6* гена, са двойни хетерозиготни носители, каквато е и нашата пациентка. Съгласно препоръките на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицираме откритата генетична находка с.2663G>C като вероятно патогенна.

Другият генетичен вариант с.160_243del в *PEX6* гена също не е откриван сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1). В резултат на възникване на този генетичен вариант отпадат 28 аминокиселини от аминокиселинната последователност, кодирана от *PEX6* гена. Въпреки че генетичната находка с.160_243del не е описвана преди като патогенна, следните доказателства са в подкрепа на патогенната природа на идентифицирания вариант: 1) отсъствието на варианта в хетерозиготно и хомозиготно състояние при здрави контролни популации по проекта gnomAD, 2) еволюционната консервативност на засегнатата аминокиселинна последователност, 3) резултатите от сегрегационния анализ, които потвърждават автозомно-рецесивен модел на унаследяване и 4) съответствието на клиничната картина, наблюдавана при пациентката с описаните към момента *PEX6*-свързани заболявания. Макар че същата in-frame делеция не е окривана при пациенти с подобна клинична симптоматика, много други missense варианти и in-frame делеции в този регион на гена са съобщавани като патогенни (напр.: p.Leu57Pro, p.Val92_Arg93del). Базирайки се на казаното до тук и съгласно критериите на ACMG/AMP, класифицираме варианта като вероятно патогенен.

Както споменахме по-рано потвърждаване на диагнозата на молекулярно-генетично ниво е от особено значение за адекватната медико-генетична консултация с цел семейно планиране. Чрез провеждане на пренатална диагностика в семейството, може да

гарантираме здраво поколение по отношение на установеното пероксизомно заболяване. На база на проведената медико-генетична консултация, семейството се запозна с рисковете от появата на това заболяване отново. Поради тази причина при следваща бременност извършихме пренатална диагностика, на база на която установихме, че фетусът не е носител на фамилните *PEX6* варианти.

Пероксизомите са клетъчни органели, които съдържат множество ензими, необходими за разграждането на различни вещества включително мастни киселини и някои токсични съединения. Освен това те участват в биосинтезата на липидите. Увредената функция на белтъците, кодирани от *PEX1* и *PEX6* гените, води до нарушение в сглобяването на пероксизомите и до тяхната дисфункция. В резултат на това се наблюдават пероксизомни ензимни дефицити, водещи до засягане на различни катаболитни и анаболитни пътища, като по този начин се причиняват множество метаболитни аномалии, на които се дължат и наблюдаваните клинични характеристики при засегнатите пациенти, в това число и описаните от нас случаи.

С представените случаи от групата на неврологични заболявания с гърчова симптоматика, демонстрирахме предизвикателствата при диагностицирането им. Все по трудно може да се осъществи таргетно анализиране на конкретен ген, тъй като с напредването на молекулярно-генетичната диагностика се установиха редица гени, мутации в които могат да водят до заболявания с припокриващи се клинични характеристики. В хода на изработване на настоящия дисертационен труд, верифицирахме генетичната причина за наблюдаваните клинични характеристики при 36% от изследваните пациенти с редки неврологични заболявания, включващи гърчова симптоматика. При 6 от общо 8 (75%) генетично потвърдени пациенти, доказахме генетичната причина, чрез секвениране от ново поколение. При 2-ма (25%) от пациентите, генетичната причина се установи посредством таргетно секвениране по Sanger. Нагледно демонстрирахме и това, че при наличие на ясен генетичен дефект директно може да се премине към таргетен анализ (секвениране по Sanger) с цел определяне на носителския статус при родственици на засегнатите пациенти.

4.1.2. Невромускулни заболявания

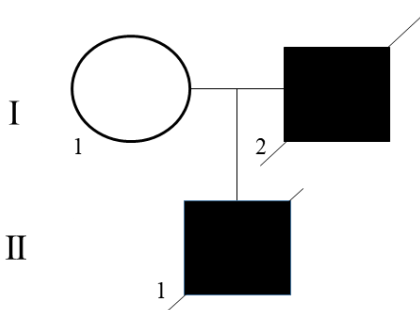
4.1.2.1. МУН7–свързани заболявания

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

Клинична картина на случай 1

Индексният пациент е момче с нормално постнатално развитие. На възраст от 11 месеца е диагностициран с дилатативна кардиомиопатия. При момчето се наблюдават тахипнея, тахикардия с галопен ритъм и систоличен сърдечен шум. Установява се и лека генерализирана мускулна хипотония, но без видима мускулна слабост. От фамилната история има данни за мускулна дистрофия, диагностицирана на 6-годишна възраст при бащата на пациента, като клиничните му симптоми се манифестират на 1-годишна възраст, когато прохожда с клатушкаща походка. Заболяването при него прогресира много бавно до 34-годишна възраст, когато започват оплаквания, свързани с умора и диспнея. Установена е атрофия на проксималните мускули на четирите крайника. В допълнение ехокардиографията показва тежка дилатативна кардиомиопатия (Фигура 59).

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



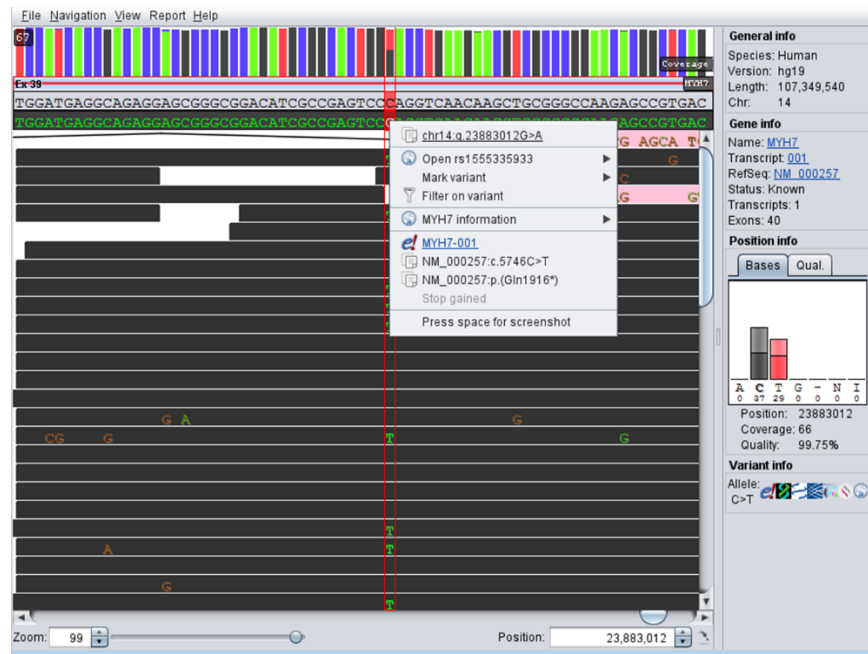
Фигура 59: Родословно дърво на семейството.

Молекулярно-генетичен анализ

Предварително проведени молекулярно-генетични изследвания на таргетни гени (*DMD*, *LMNA* и *EMD*), свързани с диагнози мускулна дистрофия Дюшен/Бекер и мускулна дистрофия Emery-Dreifuss, не показаха патологични генетични варианти, които могат да

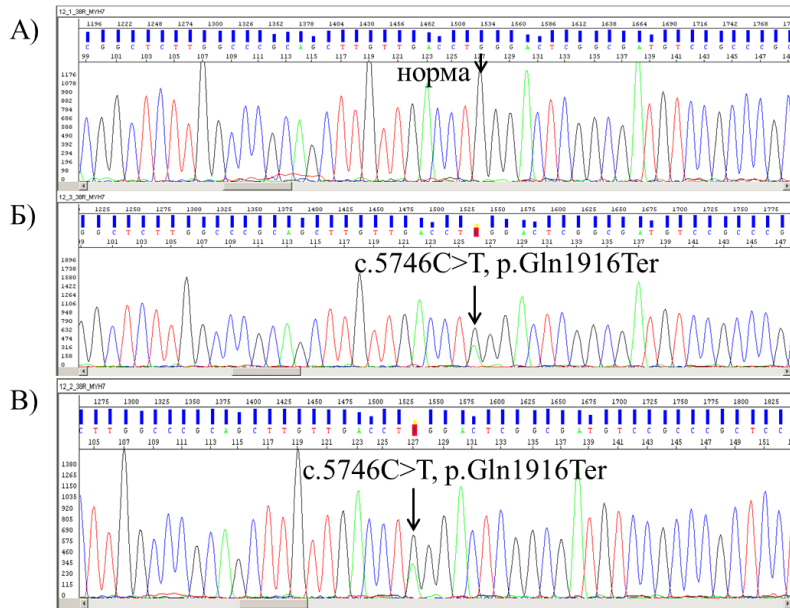
обяснят наблюдаваната клинична симптоматика при таргетния пациент и неговия баща. Това даде индикация, че секвенирането ген-по-ген не би било подходящ метод за бърза и своевременна генетична диагностика. Поради тази причина преминахме към секвениране от ново поколение и по-конкретно клинично екзомно секвениране при таргетния пациент.

На база на проведения молекулярно-генетичен анализ установихме наличието на непубликуван хетерозиготен nonsense вариант с.5746C>T, p.Gln1916Ter в *MYH7* гена (NM_000257) (Фигура 60).



Фигура 60: Секвенционен NGS профил на генетичния вариант с.5746C>T, p.Gln1916Ter в *MYH7* гена при таргетния пациент.

Проведеният сегрегационен анализ чрез класическо секвениране по Sanger показва, че вариантът е унаследен от бащата на пациента (Фигура 61).



Фигура 61: Секвенционен профил на варианта с.5746С>Т, р.Gln1916Ter в *MYH7* гена. А). Секвенционен профил на майката с нормален генотип. Б). Секвенционен профил на таргетния пациент, хетерозиготен носител на варианта. В). Секвенционен профил на бащата, хетерозиготен носител на варианта.

Генетичният вариант с.5746С>Т, р.Gln1916Ter не е откриван сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1). За да потвърдим вероятната патогенност на варианта, разгледахме и обсъдихме дали механизмът за разграждане на иРНК-и, които съдържат предварително възникнали стоп кодони (NMD), би действал в конкретния случай. Ако предварително възникналият стоп кодон е на повече от 50-55 нуклеотида от 3' най-крайната екзон-екзонна граница, иРНК ще бъде разградена по механизма на NMD. Ако предварително възникналият стоп кодон е локализиран в последните 50-55 нуклеотида на предпоследния екзон или в последния екзон на гена, иРНК няма да бъде подложена на разграждане (Nagy and Maquat, 1998; Kurosaki, Popp and Maquat, 2019). Предвид това, че откритият от нас генетичен вариант с.5746С>Т е локализиран в последните 50-55 нуклеотида на предпоследния екзон на *MYH7* гена, най-вероятно получените иРНК, които носят варианта избягват NMD. Това би довело до синтез на скъсен протеин, който най-вероятно има нарушена функция, в резултат на което се проявяват клиничните характеристики, наблюдавани при таргетния пациент и неговия баща. Тази теория се потвърждава и от Aguib *et al.*, 2021, които доказват, че някои иРНК на *MYH7* с предварително възникнал стоп кодон, локализиран в последния екзон на гена, избягват механизма на NMD. До сега се считаше, че варианти в *MYH7* гена, които са свързани с

предварително възникнали стоп кодони, най-вероятно не са патологични (но могат да бъдат силни модификатори, ако са в хомозиготно състояние или са локализирани в транс позиция с друг патогенен вариант), тъй като иРНК подлежат на разграждане от NMD. За пръв път Aguib *et al.*, 2021 доказват експресия на вариант в *MYH7* гена, който генерира предварително възникнал стоп кодон при пациенти с хипертрофична кардиомиопатия (Aguib *et al.*, 2021).

Описаният от тях генетичен дефект води до белтък, който е само с 4 аминокиселини по-къс от дивия тип белтък. В нашия случай белтъкът, който се получава е с 19 аминокиселини по-къс (Фигура 62) от нормалния протеин. Именно на това може и да се дължи различната клинична симптоматика при нашите пациенти и описаните от Aguib *et al.*, 2021.



Фигура 62: Схематично представяне на част от аминокиселинната последователност на белтъка, кодиран от гена *MYH7* и локализацията на варианта p.Gln1916Ter. Аминокиселините, които отпадат в резултат на предварително възникналия стоп кодон са отбелязани на фигурата.

В допълнение впечатление прави това, че откритият от нас генетичен вариант води до различия в клиничните симптоми и начало на изява на фенотипната симптоматика при засегнатите пациенти в рамките на едно семейство.

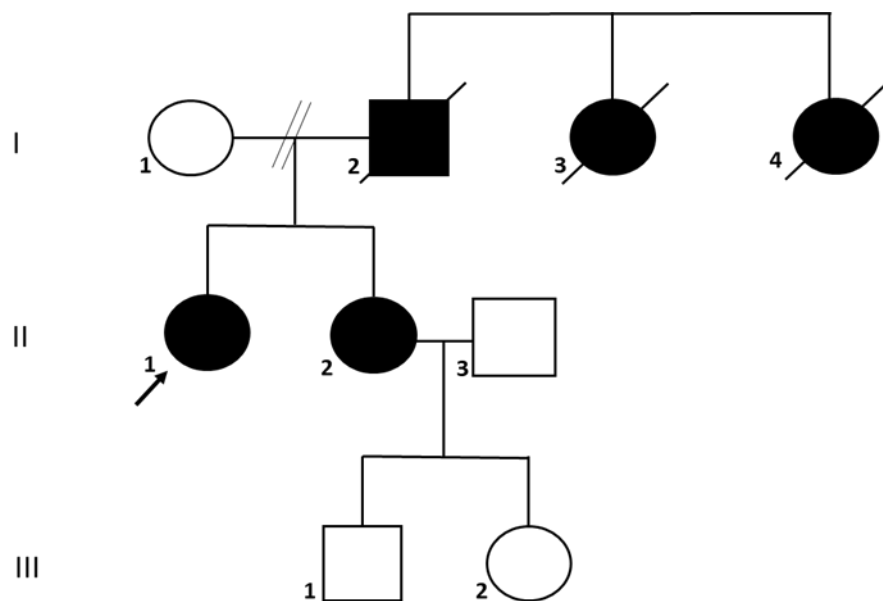
Базирайки се на казаното до тук и позовавайки се на стандартите и препоръките на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицираме варианта, като вариант с неясно клинично значение.

С този случай отново демонстрирахме необходимостта от навременно молекулярно-генетично верифициране на заболяванията в засегнатите семейства. Бащата на таргетния пациент е диагностициран с невромускулно заболяване от ранна детска възраст без установен генетичен дефект, който да обясни клиничната симптоматика. Следователно при него не може да се проведе адекватна медико-генетична консултация с цел семейно планиране. В тези случаи не може да се определи риска за поява на заболяването отново, както и да се гарантира здраво поколение, за което свидетелства и таргетния ни пациент, който унаследява генетичния дефект от засегнатия си баща.

Клинична картина на случай 2

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

Фамилната история включва сестра с подобна клинична симптоматика, която се проявява на възраст около 49 години. Починалият баща на пациентката, както и двете му починали сестри също са имали подобни клинични оплаквания (Фигура 63).

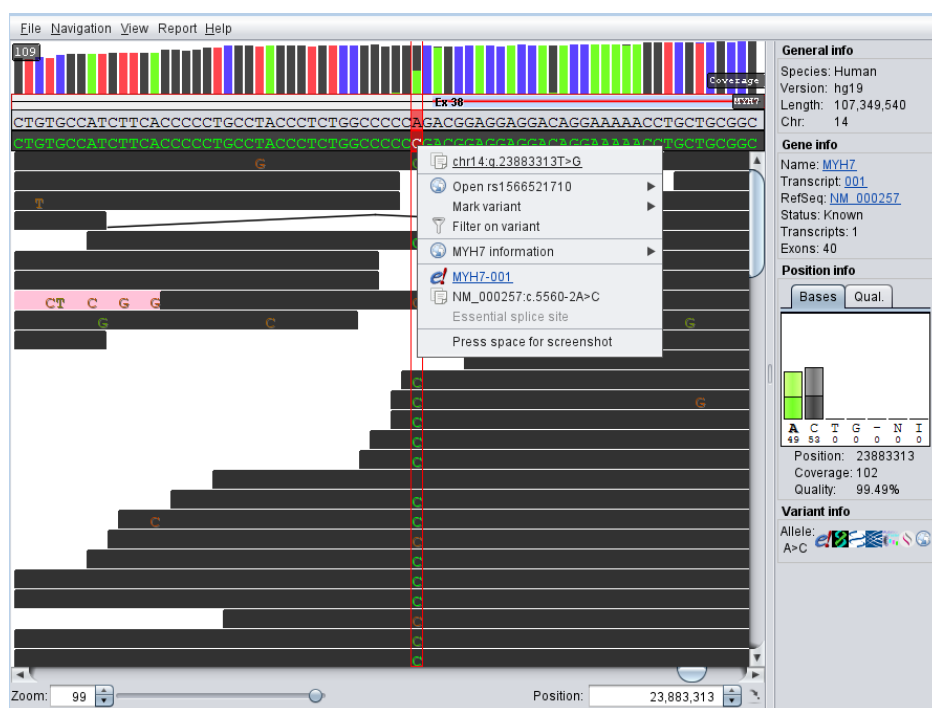


Фигура 63: Родословно дърво на семейството. Индексната пациентка е отбелязана със стрелка на фигурата.

Молекулярно-генетичен анализ

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

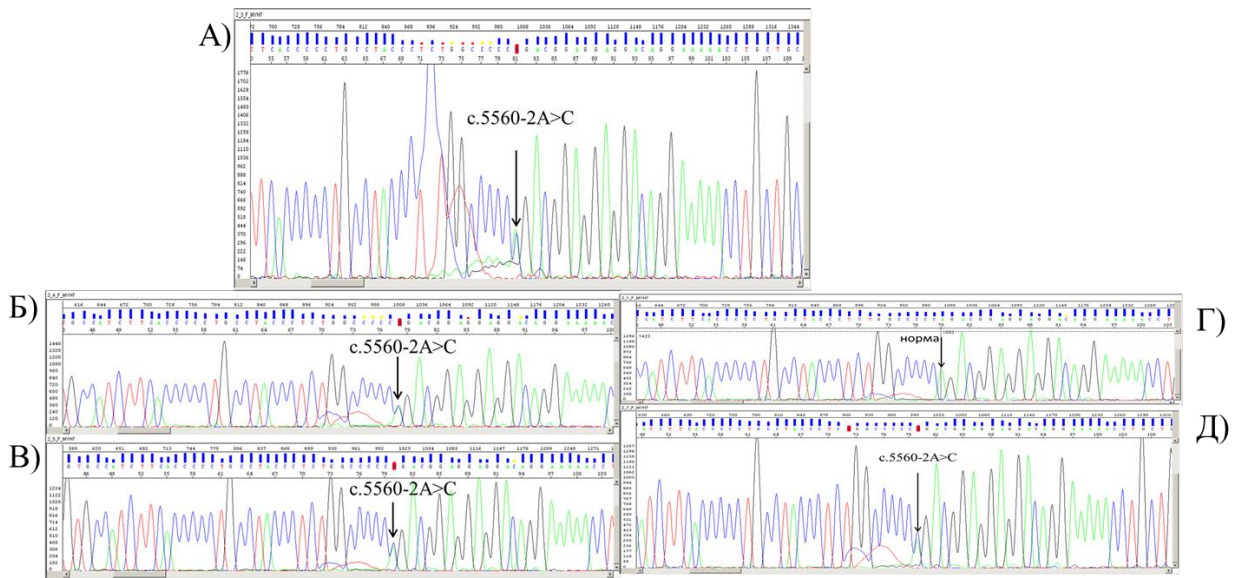
На база на проведеното секвениране от ново поколение установихме непубликуван хетерозиготен splice site вариант c.5560-2A>C в *MYH7* гена (Фигура 64).



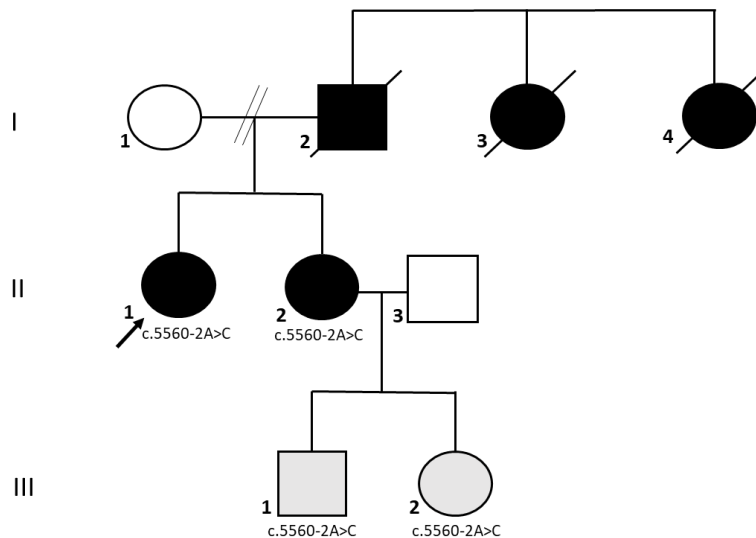
Фигура 64: Секвенционен NGS профил на генетичния вариант c.5560-2A>C в *MYH7* гена при таргетната пациентка.

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

провеждане на сегрегационния анализ установихме, че племенниците на таргетната пациентка също са носители на идентифицираната находка (Фигура 65 и Фигура 66).



Фигура 65: Секвенционен профил на варианта c.5560-2A>C в *МУН7* гена. А). Секвенционен профил на таргетната пациентка, хетерозиготен носител на варианта. Б). Секвенционен профил на сестрата на пациентката, хетерозиготен носител на варианта. В) и Д). Секвенционен профил на племенниците на таргетната пациентка, хетерозиготни носители на варианта. Е). Секвенционен профил на майката на пациентката, показващ нормален генотип.



Фигура 66: Родословно дърво, показващо носителството на детектирания вариант в *МУН7* гена при таргетната пациентка и нейните родственици.

Към момента на генетичното изследване племенниците на пациентката нямаха никаква клинична изява на заболяването и са определени като асимптомни носители (поради това те са маркирани със сив цвят на Фигура 6б). Това може да се дължи на факта, че симптомите на заболяването се изявяват на по-късна възраст, а към момента на изследването те бяха на 33 и 23 години.

Генетичният вариант с.5560-2A>C в *MYH7* гена не е откриван сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1). Въпреки, че вариантът не е публикуван преди в асоциация със заболявания, следните доказателства са в подкрепа на патогенната природа на варианта: 1) локализацията на варианта в консервативен регион на гена, 2) вероятният ефект на варианта върху правилния екзонен сплайсинг, което се потвърждава от *in silico* предиктора Human Splicing Finder 3.0, 3) отсъствието на варианта от контролните популации по проекта gnomAD, 4) съответствието на посочената клинична изява с автозомно-доминантния модел на унаследяване в семейството, 5) резултатите от сегрегационния анализ, които показват, че засегнатите родственици на пациентката са носители на варианта, а здравата ѝ майка не е носител на идентифицираната генетична находка, 6) сплайсинг варианти, засягащи същия регион на гена са докладвани преди, като патогенни и в асоциация с *MYH7*-свързани заболявания (Fiorillo *et al.*, 2016).

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

Чрез проведените изследвания, верифицирахме генетичната причина за наблюдаваната клинична симптоматика при таргетната пациентка и засеганата ѝ сестра. В хода на молекулярно-генетичната диагностика, установихме, че сестрата на пациентката е предала този генетичен дефект в поколението си. Това трудно е можело да се избегне, тъй

като заболяването е с късно начало. Стъпките, които трябва да се предприемат оттук нататък е провеждане на пренатална диагностика в семействата на засегнатите племенници на таргетната пациентка, за да се предотврати предаването на заболяването в поколението. Въпреки късното начало на изява на клиничните симптоми при засегнатите пациенти, трябва да се има предвид и това, че голяма част от невромускулните заболявания се характеризират с по-ранно начало и по-тежко изявена клиника във всяко следващо поколение. Поради тази причина не може да се определи дали всички носители на това *МУН7*-свързано заболяване биха изявявали клиничната симптоматика на по-късна възраст.

Увреждането на белтъчния продукт на гена *МУН7*, най-вероятно води до неправилно сглобяване на миозин тип II, което нарушава нормалната му функция в мускулните клетки, а именно мускулното съкращение. В резултат на това може да настъпва както сърдечно, така и скелетно-мускулно засягане, което се наблюдава и при представените от нас пациенти.

4.1.2.2. *TWNK*–свързани заболявания

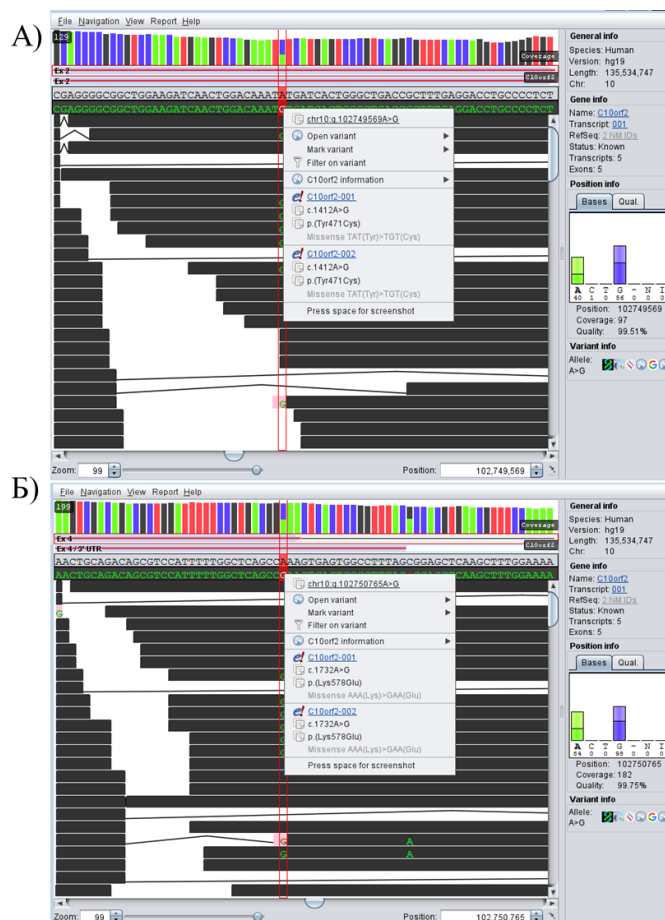
Клинична картина

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

Молекулярно-генетичен анализ

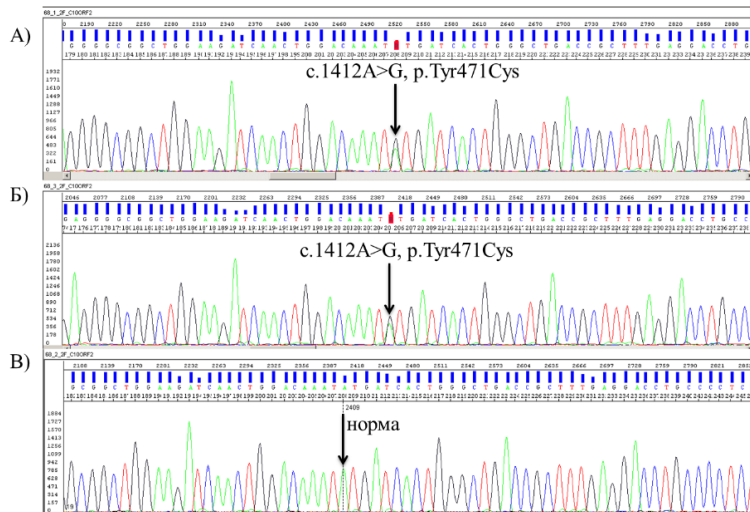
На база на клиничната симптоматика при пациентката е поставена диагноза „Спинална мускулна атрофия“, която не се потвърждава от направените молекулярно-генетични изследвания за качествена и количествена оценка на *SMN1* и *SMN2* гените. В резултат на това преминахме към секвениране от ново поколение с цел изясняване на генетичната причина, довела до наблюдаваните клинични характеристики при пациентката.

На база на извършените изследвания установихме два непубликувани, хетерозиготни missense варианта с.1412A>G, p.Tyr471Cys и с.1732A>G, p.Lys578Glu в *TWNK (C10orf2)* гена (NM_021830) (Фигура 67).

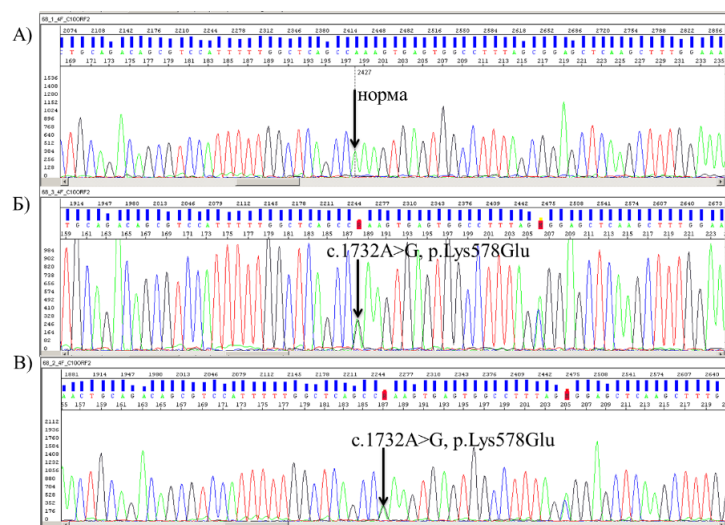


Фигура 67: Секвенционен NGS профил на вариантите c.1412A>G, p.Tyr471Cys и c.1732A>G, p.Lys578Glu в *TWNK (C10orf2)* гена. А). Секвенционен профил на варианта c.1412A>G, p.Tyr471Cys. Б). Секвенционен профил на варианта c.1732A>G, p.Lys578Glu.

За да проверим локализацията на вариантите при пациентката (дали са на един алел или на двата алела на гена), проведохме сегрегационен анализ в семейството, чрез който установихме, че генетичният вариант c.1412A>G е унаследен от майката на пациентката, докато вариантът c.1732A>G е унаследен от бащата (Фигура 68 и Фигура 69). Това потвърждава автозомно-рецесивен модел на унаследяване.



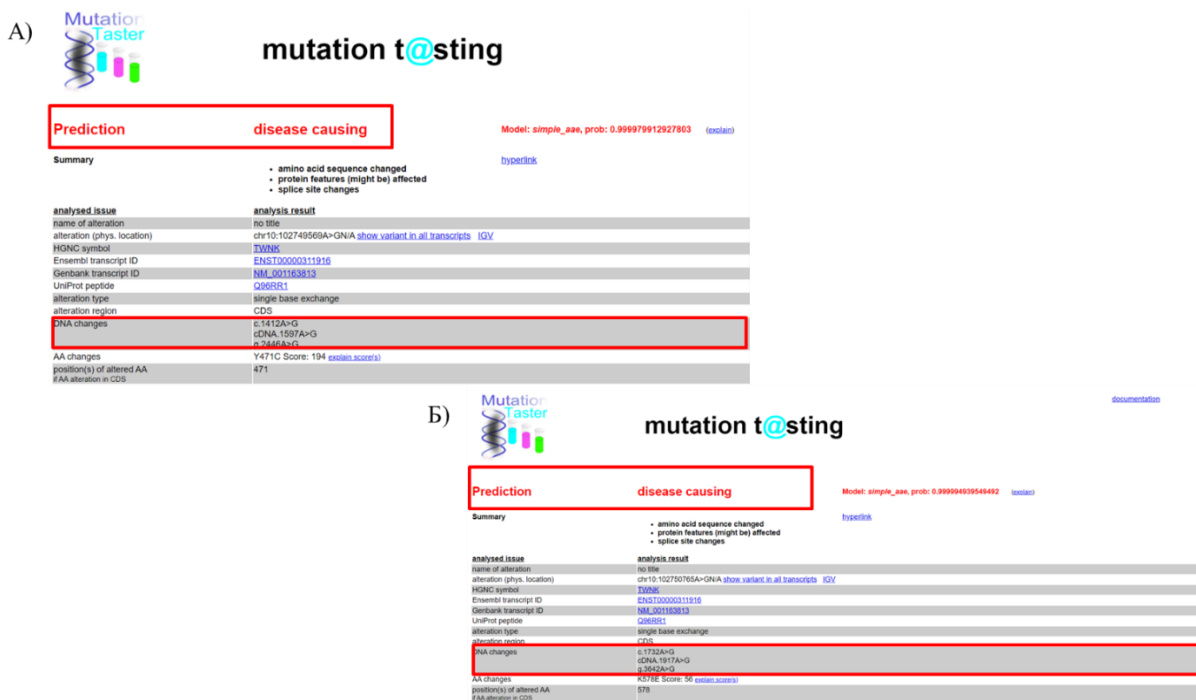
Фигура 68: Секвенционен профил на варианта c.1412A>G, p.Tyr471Cys в *TWNK* (*C10orf2*) гена. А). Секвенционен профил на майката, хетерозиготен носител на варианта. Б). Секвенционен профил на таргетната пациентка, хетерозиготен носител на варианта. В).Секвенционен профил на бащата с нормален генотип.



Фигура 69: Секвенционен профил на варианта c.1732A>G, p.Lys578Glu в *TWNK* (*C10orf2*) гена. А). Секвенционен профил на майката с нормален генотип. Б). Секвенционен профил на таргетната пациентка, хетерозиготен носител на варианта. В).Секвенционен профил на бащата, хетерозиготен носител на варианта.

Генетичните варианти c.1412A>G, p.Tyr471Cys и c.1732A>G, p.Lys578Glu в *TWNK* гена не са откривани сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1), което потвърждава това, че са изключително рядко срещани в общата популация. Въпреки че идентифицираните от нас генетични находки не са описвани преди като патогенни, в подкрепа на патогенната им природа са следните доказателства: 1) отсъствието на вариантите от контролните популации по проекта gnomAD, 2) резултатите от *in silico*

предиктор MutationTaster, който потвърждава патогенната природа на вариантите (Фигура 70), 3) резултатите от сегрегационния анализ, които потвърждават автозомно-рецесивен модел на унаследяване и 4) съответствието на клиничната картина, наблюдавана при пациентката с описаните към момента *TWINK*-свързани заболявания.



Фигура 70: Резултати от *in silico* предиктор MutationTaster. А). Оценка на варианта c.1412A>G – вариант причиняващ заболяване. Б). Оценка на варианта c.1732A>G – вариант причиняващ заболяване.

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

Както споменахме в глава „Литературен обзор“, белтъчният продукт на *TWINK* гена е митохондриална ДНК хеликаза, която участва в репликацията на митохондриалната ДНК. Патогенни варианти в *TWINK* гена водят до нарушение в репликационния процес на мтДНК в различни клетки (напр. мускулните клетки), в резултат на което се губят копия от нея. Нарушената митохондриална функция, особено в нервната система, която изисква голямо количество енергия, води до неврологична дисфункция и други увреждания. Именно на това се дължи и наблюдаваната клинична симптоматика при *TWINK*-свързаните заболявания към които попада и описаният от нас случай.

Получените генетични резултати подпомогнаха медико-генетичната консултация на родителите на пациентката с цел семейно планиране. Тъй като всеки един от тях е носител на генетичен вариант в *TWNK* гена, рискът за предаване на засегнатия алел в поколението за всеки родител е 50%. При следваща бременност ще се извърши пренатална диагностика с цел предотвратяване на поява на заболяването отново в семейството. В допълнение родственици на пациентката по бащина и майчина линия също имат риск за носителство на някой от идентифицираните варианти в *TWNK* гена. Поради тази причина се препоръчва изследване на родственици по майчина и бащина линия с цел определяне на носителския им статус. В случай на установено носителство, трябва да се проведе таргетен секвенционен анализ на *TWNK* гена при партньора, за да се изчисли риска от поява на *TWNK*-свързаното заболяване в поколението на засегнатите родственици.

4.1.2.3. *UNC80*-свързани заболявания

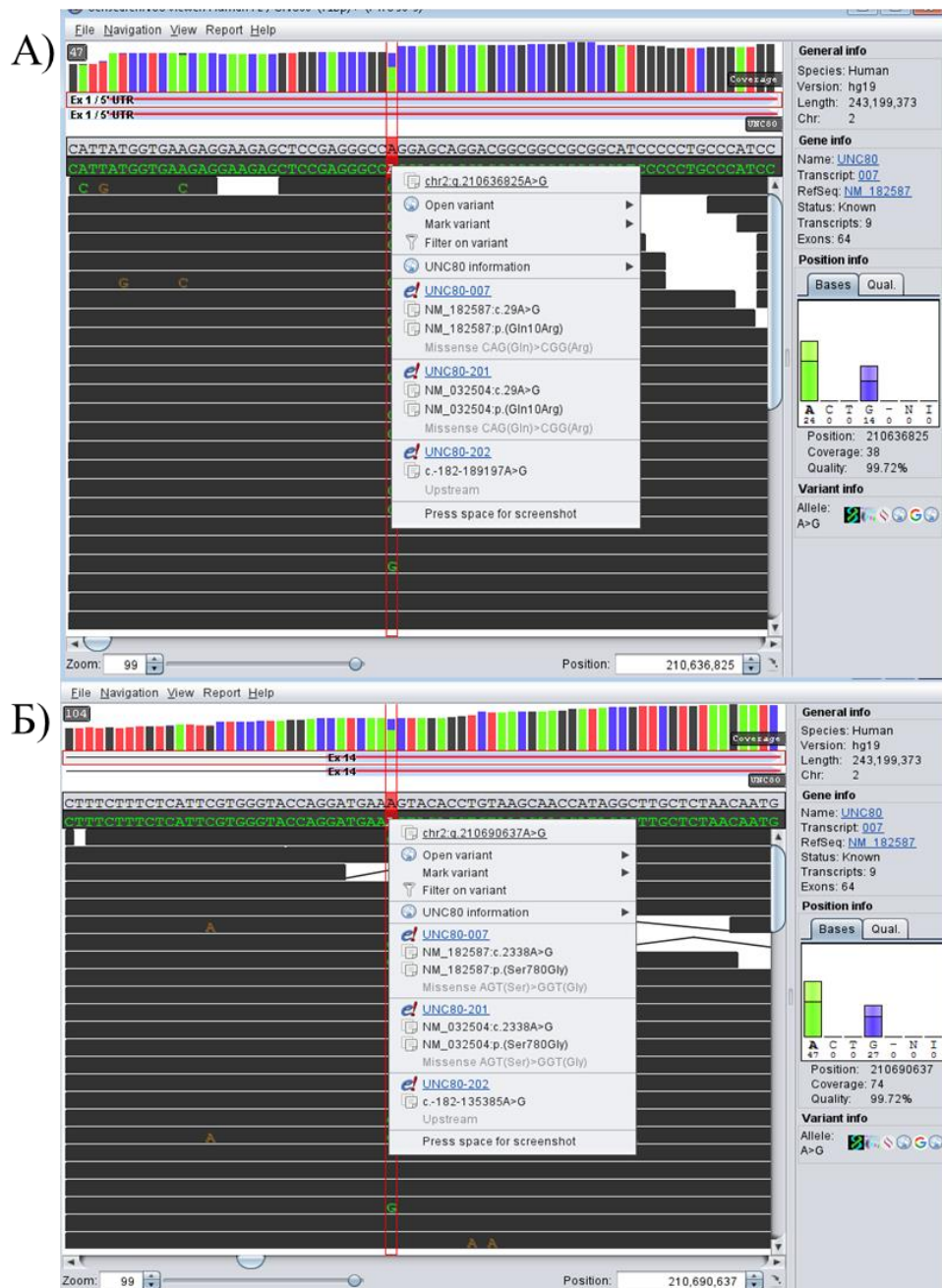
Клинична картина

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

Молекулярно-генетичен анализ

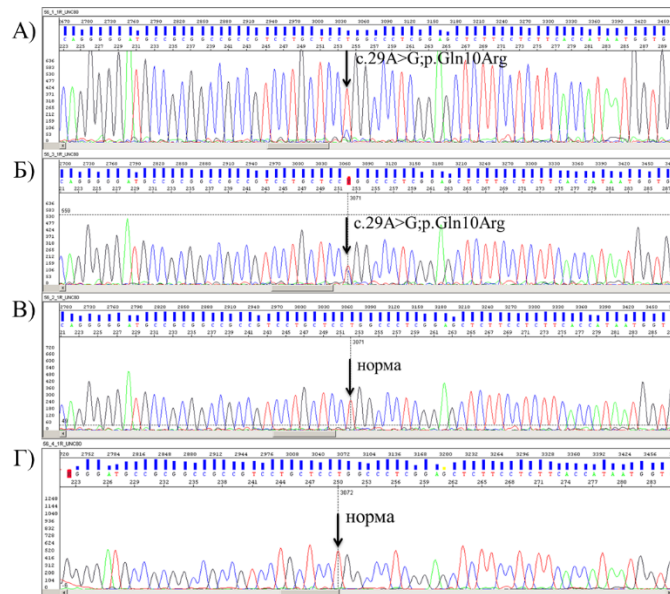
Първоначално поставената диагноза при пациента беше синдром на Prader-Willi. Проведените молекулярно-генетични изследвания не потвърдиха тази диагноза. Като следваща стъпка предприехме провеждането на цялостно екзомно секвениране с цел генетично верифициране на диагнозата.

На база на проведените изследвания открихме два хетерозиготни непубликувани варианта с.29A>G, p.Gln10Arg и с.2338A>G, p.Ser780Gly в *UNC80* гена (NM_032504) (Фигура 71).

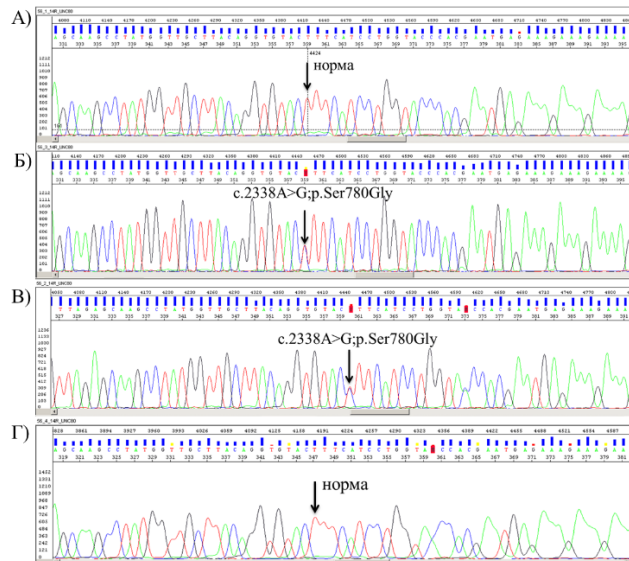


Фигура 71: Секвенционен NGS профил на вариантите c.29A>G, p.Gln10Arg и c.2338A>G, p.Ser780Gly в *UNC80* гена. А). Секвенционен профил на варианта c.29A>G, p.Gln10Arg. Б). Секвенционен профил на варианта c.2338A>G, p.Ser780Gly.

Сегрегационният анализ в семейството показва, че вариантът c.29A>G е унаследен от майката на пациента, докато вариантът c.2338A>G е унаследен от бащата. Здравата сестра на пациента не е носителка на нито една от идентифицираните генетични находки (Фигура 72 и Фигура 73).



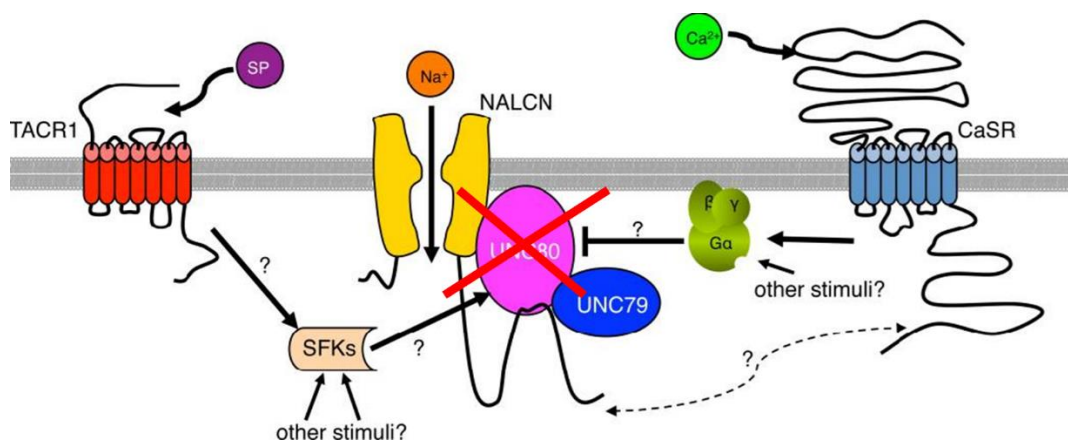
Фигура 72: Секвенционен профил на варианта c.29A>G, p.Gln10Arg в гена *UNC80*. А). Секвенционен профил на майката, хетерозиготен носител на варианта. Б). Секвенционен профил на таргетния пациент, хетерозиготен носител на варианта. В). Секвенционен профил на бащата, който показва нормален генотип. Г). Секвенционен профил на здравата сестра, който показва нормален генотип.



Фигура 73: Секвенционен профил на варианта c.2338A>G, p.Ser780Gly в *UNC80* гена. А). Секвенционен профил на майката, който показва нормален генотип. Б). Секвенционен профил на таргетния пациент, хетерозиготен носител на варианта. В). Секвенционен профил на бащата, хетерозиготен носител на варианта. Г). Секвенционен профил на здравата сестра, който показва нормален генотип.

Получените резултати от сегрегационния анализ потвърждават автозомно-рецесивен модел на унаследяване.

Идентифицираните генетични варианти не са откривани сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1). Към момента в световната литература има много малко описани пациенти с *UNC80* мутации, което е индикация, че *UNC80*-свързаните заболявания все още не са добре проучени в световен мащаб. Откритите от нас генетични находки не са съобщавани преди при пациенти със заболявания от спектъра на *UNC80*. Въпреки това следните доказателства са в подкрепа на патогенната им природа: 1) отсъствието на вариантите от контролните популации по проекта gnomAD, което показва, че вариантите са с много ниска честота в общата популация, 2) резултатите от сегрегационния анализ, които потвърждават автозомно-рецесивен модел на унаследяване и 3) съответствието на клиниката, наблюдавана при пациента с описаните към момента *UNC80*-свързани заболявания. Както вече споменахме в глава „Литературен обзор“ патогенните варианти в гена *UNC80*, водят до липса на белтък или до експресия на белтък с нарушена функция. В нашия случай не може да заключим категорично до какво биха довели идентифицираните генетични находки, тъй като не са провеждани функционални проучвания в това направление. Въпреки това, липсата на *UNC80* белтък или експресията на такъв с увредена структура и/или функция най-вероятно се отразява върху стабилността и функционалността на NALCN каналния комплекс (Фигура 74), който се експресира основно в централната нервна система и е отговорен за пропускливостта на натриевия канал по отношение Na^+ в покой и контролира невронната възбудимост.



Фигура 74: NALCN канален комплекс. Нарушената функция на *UNC80* най-вероятно води до дестабилизиране и неправилно функциониране на NALCN каналния комплекс (Ren, 2011 с модификации).

Именно на нарушение в стабилността и функцията на NALCN каналния комплекс може да се дължи наблюдаваната неврологична симптоматика при нашия пациент. На база на стандартите и препоръките на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицирахме идентифицираните в *UNC80* гена варианти като варианти с неясно клинично значение.

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

Установяването на генетичната причина за наблюдаваните симптоми при таргетния пациент беше от изключително значение за семейството, тъй като родителите имаха и друго дете. Сегрегационният анализ показва, че родителите са хетерозиготни носители на варианти в *UNC80* гена. Следователно семейството има 25% риск за засеганто дете с *UNC80*-свързано заболяване, в който процент попада таргетният ни пациент, 25% риск за здраво дете, което не е носител на нито един вариант в *UNC80* гена и 50% риск да имат здраво дете, носител на един вариант. Проведеният таргетен анализ при сестрата на пациента показва, че тя не е носител на идентифицираните генетични варианти в *UNC80*. С представения случай отново демонстрирахме необходимостта от генетично верифициране на диагнозата в засегантите семейства с цел превенция на заболяването.

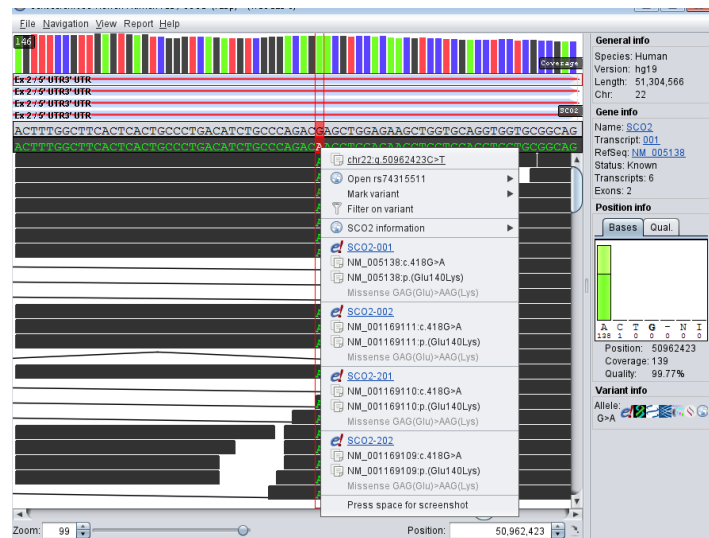
4.1.2.4. *SCO2*-свързани заболявания

Клинична картина

Индексният пациент е момче на 10 месеца (към момента на генетичното изследване) с регрес в нервно-психическото развитие от 5-месечна възраст. Установен е повишен мускулен тонус, тремор на главата и хипереклексия. Постепенно спряло да се обръща и да стои самостоятелно. Наблюдава се и гърчова симптоматика и повишени стойности на лактат. Глава с брахицефална конфигурация, триъгълно лице, ретрогнатия и хипотелоризъм. Абнормна ехокардиография – нарастване на мускулната маса на лява камера.

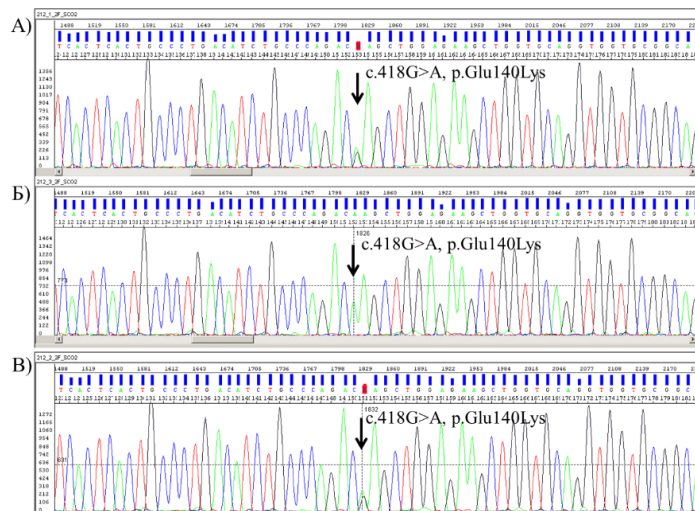
Молекулярно-генетичен анализ

Отново преминахме към цялостно екзомно секвениране поради липса на ясен генетичен таргет за анализ. На база на проведените молекулярно-генетични изследвания установихме наличието на хомозиготен missense вариант c.418G>A, p.Glu140Lys в *SCO2* гена (NM_001169111) (Фигура 75).



Фигура 75: Секвенционен NGS профил на варианта c.418G>A в *SCO2* гена при таргетния пациент.

Сегрегационният анализ в семейството показва, че вариантът е унаследен от здравите родители, които са хетерозиготни носители (Фигура 76).

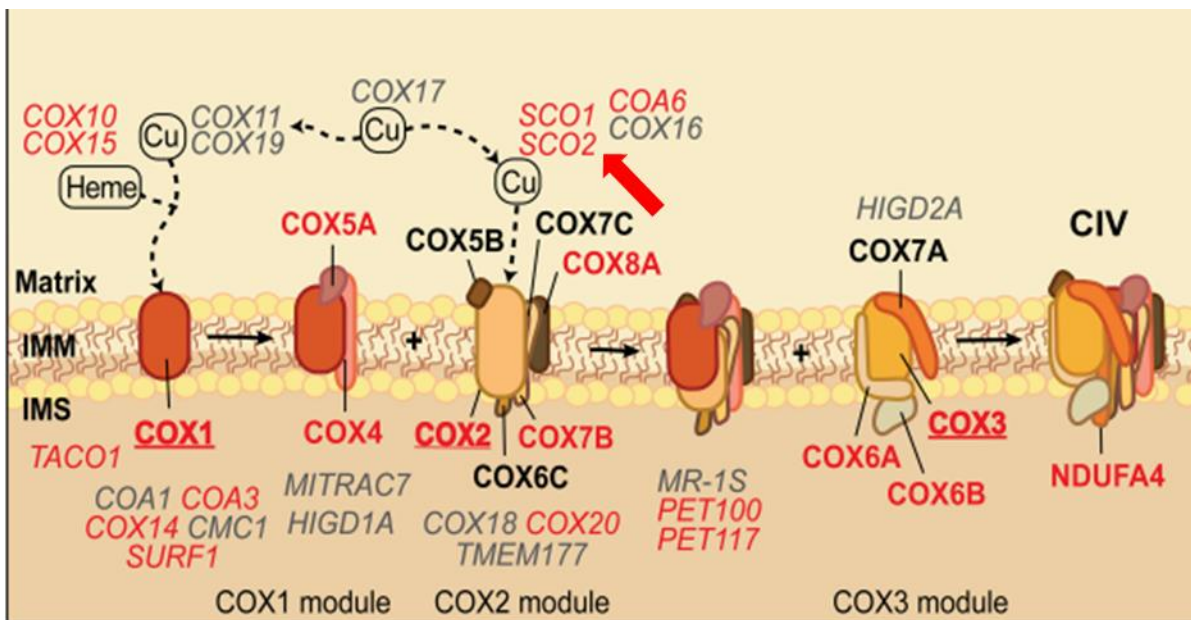


Фигура 76: Секвенционен профил на варианта c.418G>A в *SCO2* гена. А). Секвенционен профил на майката, хетерозиготен носител на варианта. Б). Секвенционен профил на таргетния пациент, хомозиготен носител на варианта. В).Секвенционен профил на бащата, хетерозиготен носител на варианта.

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

Както коментирахме в глава „Литературен обзор“, генетичният вариант с.418G>A, p.Glu140Lys е един от най-честите дефекти, срещани при пациентите със *SCO2*-свързани заболявания. Клиничната симптоматика при таргетния ни пациент датира от 5-месечна възраст, което е в подкрепа на теорията на Verdijk *et al.*, 2008 и Jaksch *et al.*, 2001, според която хомозиготните носители на тази мутация изявяват симптомите с по-късно начало в сравнение с двойните хетерозиготи, които освен варианта p.Glu140Lys, носят и друг генетичен дефект в *SCO2* гена (Jaksch *et al.*, 2001; Verdijk *et al.*, 2008). При двойните хетерозиготни носители симптомите са тежки и се изявяват малко след раждането, като засегнатите пациенти загиват през първата година от живота си. При хомозиготните носители на варианта се наблюдава по-лек фенотип, по-късно начало на заболяването и по-бавна прогресия на симптомите (Sacconi *et al.*, 2003). Missense вариантът p.Glu140Lys е локализиран в $\alpha 1$ спиралата на протеина *SCO2*. Счита се, че p.Glu140Lys води до разрушаване на солевия мост, в резултат на което следват множество структурни промени в протеина, които най-вероятно засягат мед-свързващите свойства на цистеина (локализиран в позиция 137) и по този начин може да се доведе до промени в протеиновата стабилност (Verdijk *et al.*, 2008).

Полученият абнормален или нефункционален белтък води до нарушено сглобяване на цитохром-с-оксидазата (Фигура 77) и до наблюдаваните клинични състояния, характерни за *SCO2*-свързаните заболявания.



Фигура 77: Схематично представяне на сглобяването на комплекс IV. *SCO2* генът е маркиран с червена стрелка (Hock *et al.*, 2020 с модификации).

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

Установяването на генетичната причина за поставената диагноза в голям процент от случаите допринася само за превенция на заболяването в семейството, тъй като за повечето от генетичните заболявания няма доказано ефективно лечение. В тези случаи при засегнатите пациенти може да се прилагат поддържащи терапии, в зависимост от клиничната изява на конкретното заболяване. Трябва да отбележим и това, че разработването на генни терапии набира все по-голяма скорост. Въпреки това, за да започне да се прилага дадена терапия, трябва да минат серии от клинични изпитвания, за да се определи дали тя би била безопасна и ефективна за пациентите.

След молекулярно-генетичното потвърждаване на *SCO2*-свързаното заболяване в семейството, родителите започнаха да търсят вариант за терапия при детето. Международни учени създадоха векторен конструкт на базата на адено-асоцииран вирус, внасящ увредения ген, за евентуалното лечение на детето. Тази терапия не беше клинично изпитана и утвърдено безопасна, поради тази причина не можеше да се приложи за лечение на таргетния пациент, който загина скоро след поставяне на генетичната диагноза.

В хода на медико-генетичната консултация в семейството беше препоръчано извършване на пренатална диагностика при следваща бременност, за да се определи носителския статус на фетуса с цел превенция на заболяването в семейството. В момента има нова бременност в семейството, която предстои да бъде изследвана пренатално.

От групата на неврологичните заболявания с невромускулно засягане, изследвахме 11 пациенти, като при 5 от тях (45%) верифицирахме генетичната причина за клиничната им изява. С представените генетично верифицирани невромускулни заболявания демонстрирахме необходимостта от провеждане на молекулярно-генетични изследвания с цел семейно планиране.

4.2. Офталмологични заболявания

В рамките на настоящия дисертационен труд бяха изследвани 7 таргетни пациента с офталмологични заболявания и 7 родственика. При 4-ма от пациентите (57%) установихме генетичната причина за наблюдаваната клинична симптоматика. В таблица 10 са представени всички генетично верифицирани пациенти с офталмологични заболявания, които бяха обект на настоящото проучване.

Таблица 10: Молекулярно-генетични данни на пациенти с офталмологични заболявания, обект на настоящата дисертация.

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

Чрез секвениране от ново поколение изяснихме генетична причина при 3-ма от изследваните таргетни пациенти. При тях използвахме и секвениране по Sanger с цел потвърждаване на всички открити генетични находки от NGS, както и сегрегационен анализ в семействата.

Класическото секвениране по Sanger беше основен метод за анализ при 1 от пациентите, както и при незасегнатите родственици от семейството му.

Следва детайлно представяне на генетично потвърдените офталмологични заболявания.

4.2.1. *CRB1*-свързани заболявания

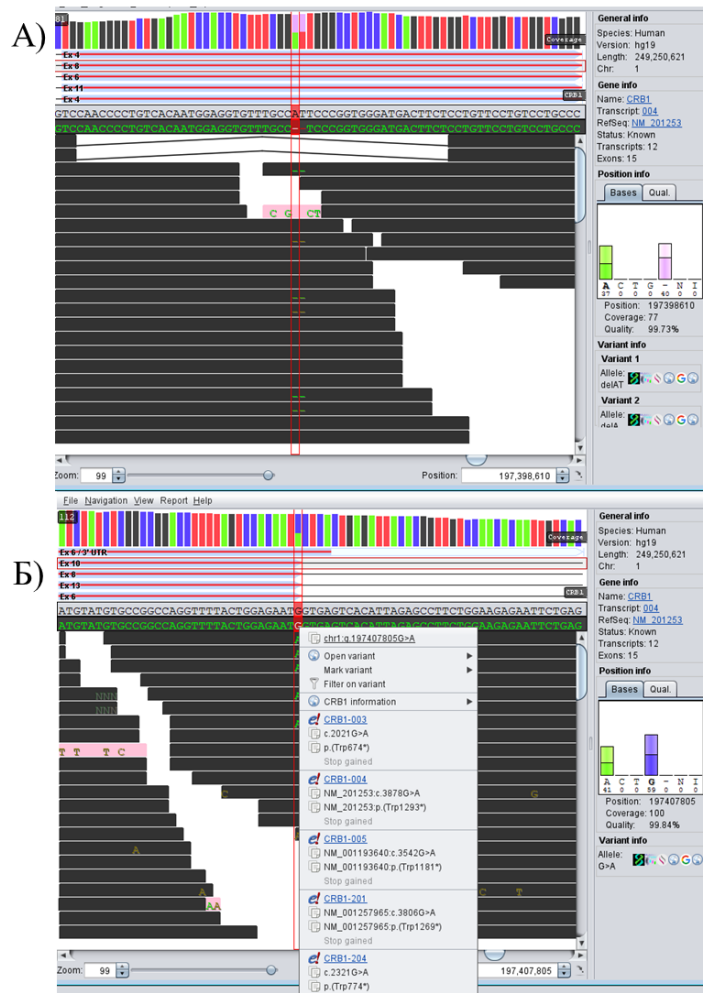
Клинична картина

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

Молекулярно-генетичен анализ

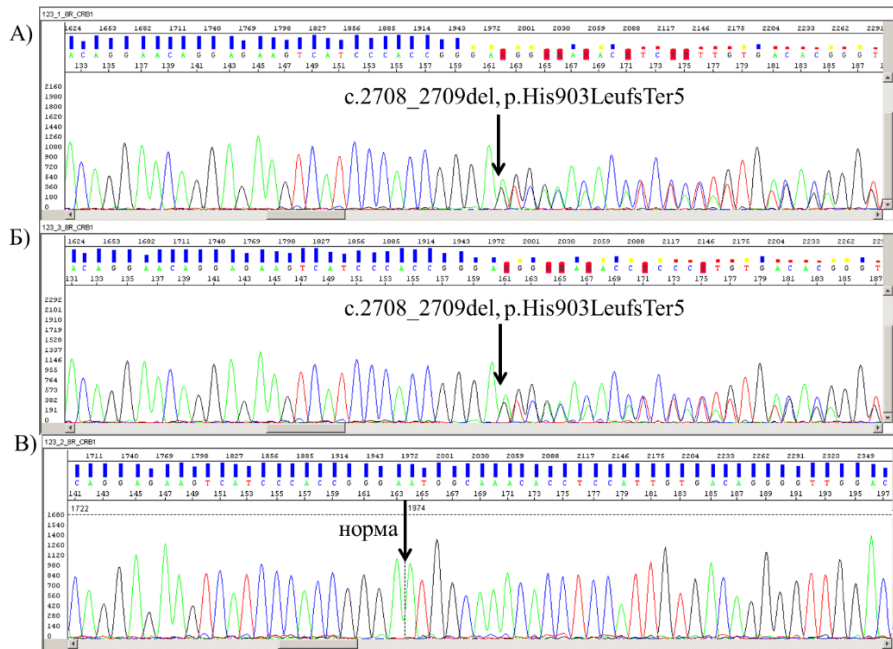
Пациентът беше насочен за молекулярно-генетичен анализ (цялостно екзомно секвениране) с цел генетично верифициране на диагнозата.

На база на проведения молекулярно-генетичен анализ установихме наличието на два хетерозиготни варианта c.2708_2709del, p.His903LeufsTer5 и c.3878G>A, p.Trp1293Ter в *CRB1* гена (NM_201253) (Фигура 78).

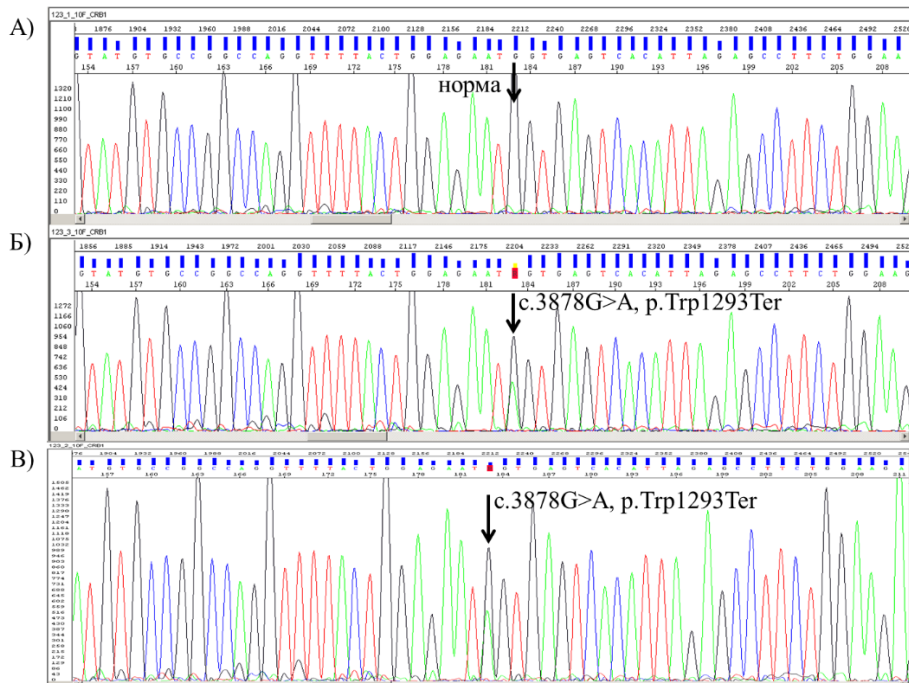


Фигура 78: Секвенционен NGS профил на вариантите c.2708_2709del, p.His903LeufsTer5 и c.3878G>A, p.Trp1293Ter в *CRB1* гена при таргетния пациент. А). Секвенционен профил на варианта c.2708_2709del, p.His903LeufsTer5. Б). Секвенционен профил на варианта c.3878G>A, p.Trp1293Ter.

Проведеният сегрегационен анализ в семейството идентифицира, че майката на пациента е носител на варианта c.2708_2709del, p.His903LeufsTer5, докато бащата на пациента е носител на варианта c.3878G>A, p.Trp1293Ter. Това показва, че при таргетния пациент вариантът c.2708_2709del е локализиран на единия алел на гена (майчиния), а вариантът c.3878G>A на другия алел на гена (бащиния), което потвърждава автозомно-рецесивен модел на унаследяване (Фигура 79 и Фигура 80).



Фигура 79: Секвенционен профил на варианта c.2708_2709del, p.His903LeufsTer5 в *CRB1* гена. А). Секвенционен профил на майката, хетерозиготен носител на варианта. Б). Секвенционен профил на таргетния пациент, хетерозиготен носител на варианта. В). Секвенционен профил на бащата, който показва нормален генотип.



Фигура 80: Секвенционен профил на варианта c.3878G>A, p.Trp1293Ter в *CRB1* гена. А). Секвенционен профил на майката, който показва нормален генотип. Б). Секвенционен профил на таргетния пациент, хетерозиготен носител на варианта. В). Секвенционен профил на бащата, хетерозиготен носител на варианта.

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

Както казахме в глава „Литературен обзор“, генът *CRB1* съдържа 12 транскрипта, като транскрипт *CRB1-A* се експресира основно по време на развитието на ретината, докато транскрипт *CRB1-B* е преобладаващ в ретината на възрастните (Mairot *et al.*, 2021). Откритите от нас генетични варианти попадат и в двата транскрипта. Именно на засягането и на двата транскрипта (*CRB1-A* и *CRB1-B*) може да се дължи и наблюдаваната клинична симптоматика при таргетния пациент. Генетичният вариант с.2708_2709del, p.His903LeufsTer5 води предварително възникнал стоп кодон преди предпоследния/последния екзон на гена и в двата транскрипта, което най-вероятно активира механизмите на NMD, в резултат на което получените иРНК се подлагат на разграждане. Другата генетична находка (с.3878G>A, p.Trp1293Ter), която води до предварително възникнал стоп кодон, е локализирана в предпоследния екзон на транскрипта *CRB1-B* (в рамките на 50-55 нуклеотида от екзон/екзонната граница). В резултат на това иРНК най-вероятно не се разпознава от механизмите на NMD, което води до синтез на скъсен протеин с вероятно увредена структура и/или функция. В транскрипта *CRB1-A* вариантът с.3878G>A е локализиран преди предпоследния/последния екзон на гена, което най-вероятно води до активиране на NMD и разграждане на получената иРНК. Ако изказаната от нас хипотеза е правилна, това би означавало, че се експресира само иРНК (от транскрипт *CRB1-B*), носеща предварително възникнал стоп кодон в резултат на замяната с.3878G>A. Полученият белтък е скъсен и най-вероятно има увредена структура и/или функция.

Както споменахме в глава „Литературен обзор“, белтъчният продукт на *CRB1* гена се експресира в ретината. Белтъкът *CRB1* е част от *CRB* комплекса, изграждащ клетъчните връзки и действа като регулатор на клетъчната полярност. В допълнение белтъкът *CRB1* има ключова роля по време на развитието на ретината, като участва във формирането на връзки между различни клетки в ретината. Нарушената функция на *CRB1* протеина води до

прогресивна дегенерация на фоторецепторите, тежко увреждане на клетките на Müller, както и макулна дистрофия в зависимост от транскрипта, който се засяга. Мутациите в гена *CRBI* са свързани с вариабилни тежки дистрофии на ретината, вариращи от вродена амавроза на Leber до Rod-cone дистрофия (наричана още retinitis pigmentosa) (Bujakowska *et al.*, 2012), което съответства на клиничната картина, наблюдавана при нашия пациент.

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

Тъй като заболяването е с автозомно-рецесивен модел на унаследяване, проведената медико-генетична консултация в семейството беше фокусирана не само към родителите на пациента, но и към други негови родственици, поради факта, че може някой от тях да е носител на идентифицираните *CRBI* варианти. В този случай се препоръчва таргетно секвениране на родственици на пациента по майчина и бащина линия с цел определяне на носителски статус и семейно планиране.

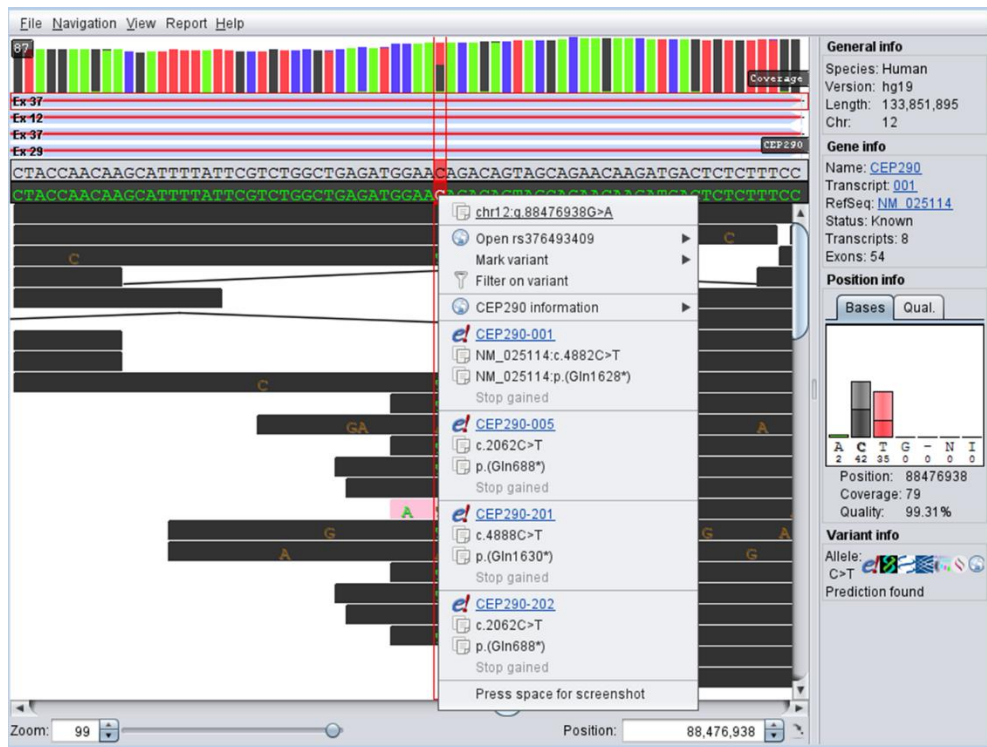
4.2.2. CEP290-свързани заболявания

Клинична картина

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

Молекулярно-генетичен анализ

Индексният пациент беше насочен за молекулярно-генетичен анализ (клинично екзомно секвениране) с таргетен анализ на гени, патогенни варианти в които са причина за поставената клинична диагноза. На база на проведеното молекулярно-генетично изследване открихме хетерозиготен патогенен nonsense вариант с.4882C>T, p.Gln1628Ter в *CEP290* гена (NM_025114) (Фигура 81).



Фигура 81: Секвенционен NGS профил на варианта c.4882C>T, p.Gln1628Ter в *CEP290* при таргетния пациент.

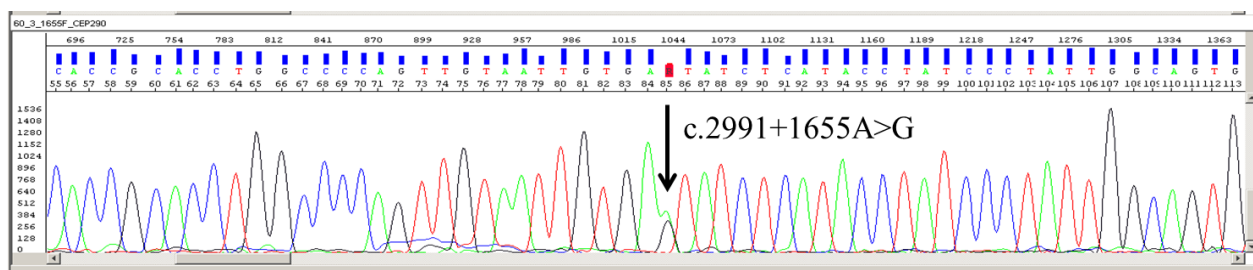
Откритият генетичен вариант е докладван в базата данни ClinVar като патогенен при редица пациенти с *CEP290*-свързани заболявания, в това число и такива с диагноза „Вродена амавроза на Leber” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/217635/>). Вариантът е откриван сред контролните популации по проекта gnomAD, като неговата популационна честота е оценена на 0.007% (няма докладвани хомозиготни носители). Освен това Wiszniewski W *et al.*, 2011 и Perrault *et al.*, 2007 са идентифицирали варианта c.4882C>T при пациенти с Вродена амавроза на Leber от (Perrault *et al.*, 2007; Wiszniewski W *et al.*, 2011).

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

вариант води до неправилен сплайсинг на *CEP290* гена, като инсерира 128bp „скрит“ (cryptic) екзон (между екзони 26 и 27), който кодира предварителен стоп кодон в *CEP290* иРНК (Gerard *et al.*, 2012; Garanto, Duijkers and Collin, 2015).

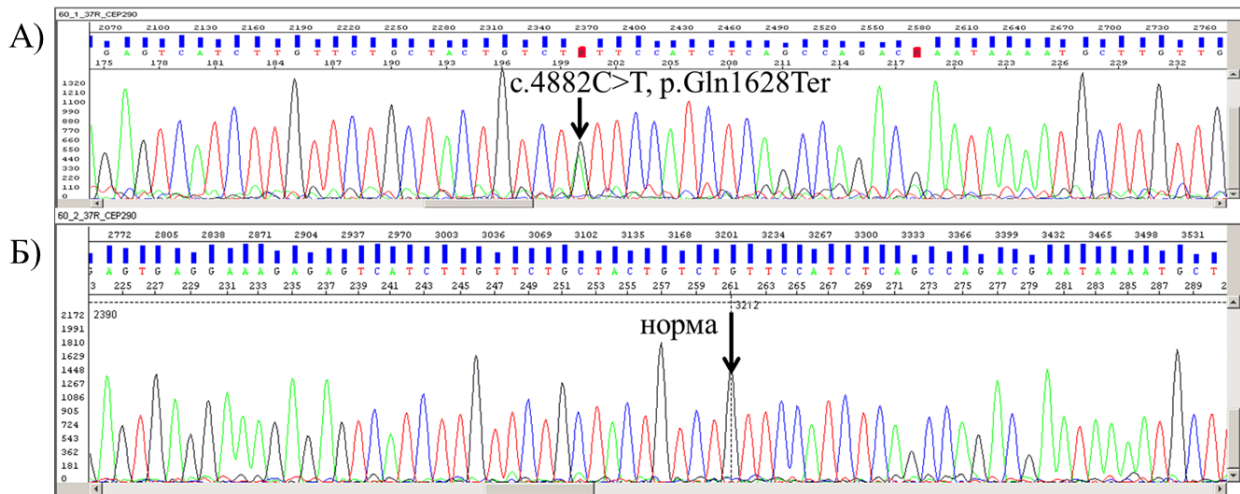
Въпреки предимствата на използваното клинично екзомно секвениране (напр. възможността да бъдат анализирани няколко гена едновременно), то има и своите ограничения. Чрез него може да детектираме само генетични варианти, които са локализирани в кодиращите региони на гените (екзоните) и такива, които са локализирани в близост до екзон-интронната граница. Следователно дълбоко интронни варианти не биха могли да се идентифицират с този тест.

За да проверим дали нашият пациент е носител на c.2991+1655A>G в *CEP290* гена, проведохме таргетно секвениране по Sanger на регион от гена, в който попада описаният генетичен вариант. Проведеният молекулярно-генетичен анализ показва, че индексният пациент е хетерозиготен носител на интронния вариант c.2991+1655A>G в *CEP290* гена (Фигура 82).

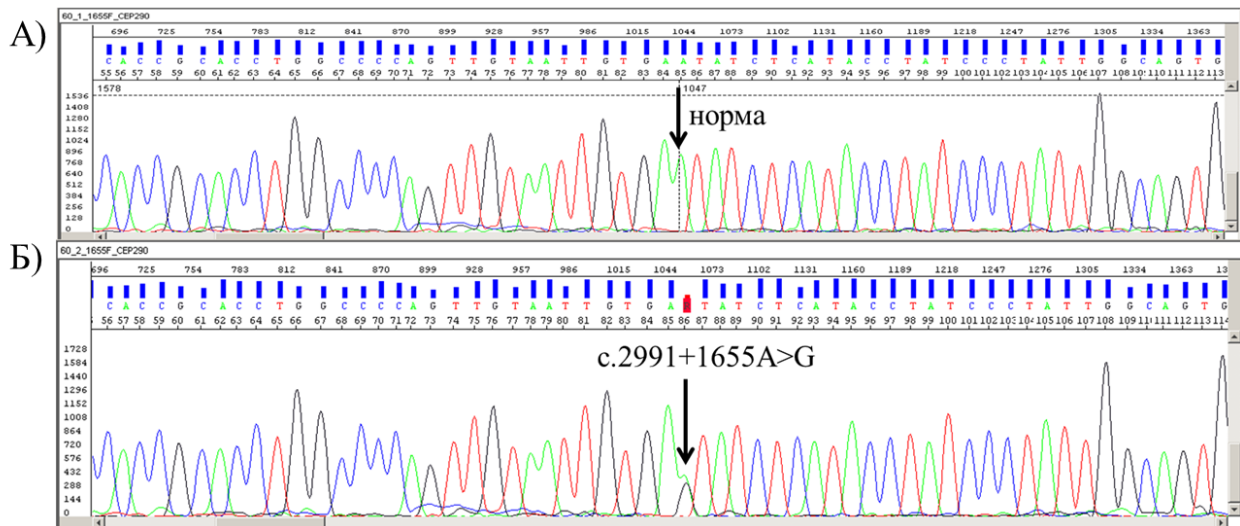


Фигура 82: Секвенционен профил на варианта c.2991+1655A>G в *CEP290* гена при таргетния пациент.

След като при пациента доказахме наличието на два патогенни хетерозиготни варианта в *CEP290* гена проведохме сегрегационен анализ в семейството, с който установихме, че генетичният вариант c.4882C>T е унаследен от майката на пациента, докато вариантът c.2991+1655A>G е унаследен от бащата. Това потвърждава автозомно-рецесивния модел на унаследяване на заболяването при таргетния пациент (Фигура 83 и Фигура 84).



Фигура 83: Секвенционен профил на варианта c.4882C>T, p.Gln1628Ter в *CEP290* гена. А). Секвенционен профил на майката, хетерозиготен носител на варианта. Б). Секвенционен профил бащата, който показва нормален генотип.



Фигура 84: Секвенционен профил на варианта c.2991+1655A>G в *CEP290* гена. А). Секвенционен профил на майката, който показва нормален генотип. Б). Секвенционен профил бащата, хетерозиготен носител на варианта.

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

Нарушаване на нормалната функция на *CEP290* белтъка може да води до вариабилна фенотипна изява, тъй като белтъчният продукт на гена е центрозомен протеин, който се експресира в ресничести клетки в цялото тяло. Той има ключова роля в образуването на реснички и транспорта на белтъците, нужни за изграждането им (Corpieters *et al.*, 2010; Burnight *et al.*, 2014). Ресничките участват в движението на клетките, както и в различни

химични сигнални пътища. Освен това те са необходими за възприемането на сетивна информация, свързана със зрението, слуха и мириса. В резултат на нарушена функция на SERP290 белтъка се наблюдава засягане в развитието на ретината, като се уврежда функцията на фоторецепторите, които в състава си включват реснички, необходими за нормалното зрение. Засягането на тези реснички води до тежко и ранно зрително увреждане, което е характерно и за описаният от нас пациент.

С представения случай показахме, че не винаги може да се приложи само един метод за анализ с цел генетично верифициране на диагнозата. За своевременно установяване на генетичната причина за клиничната симптоматика при засегнатите пациенти може да е необходимо комплексното прилагане на няколко молекулярно-генетични методи за анализ.

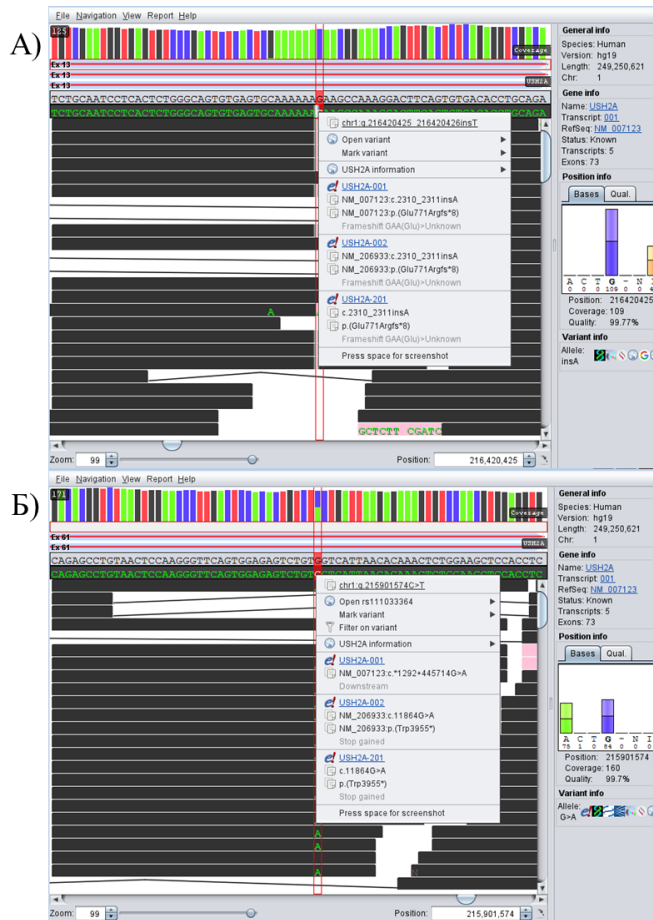
4.2.3. *USH2A*-свързани заболявания

Клинична картина

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

Молекулярно-генетичен анализ

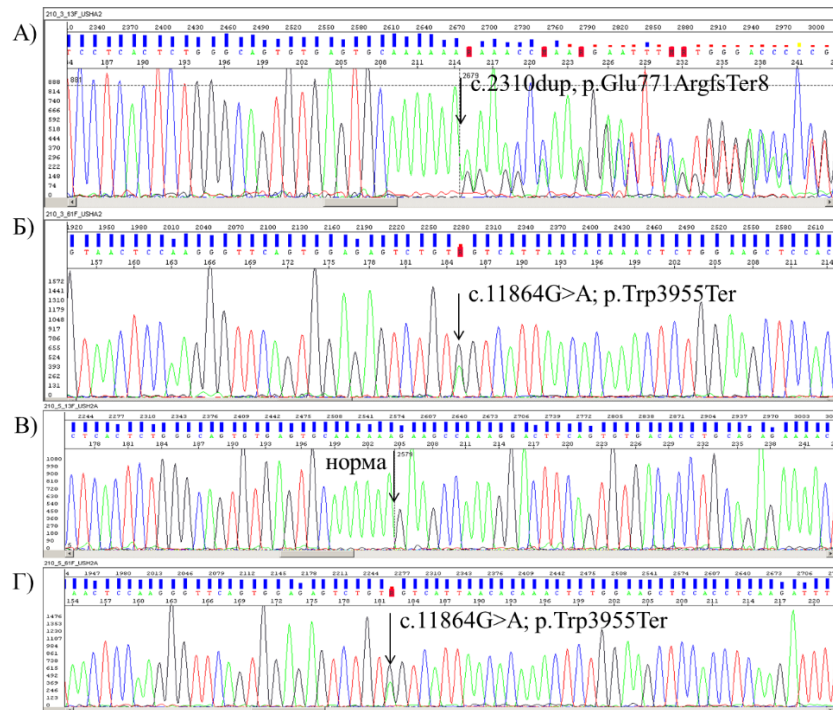
Поради големия брой гени, мутации в които могат да бъдат причина за синдром на Usher, директно преминахме към цялостно екзомно секвениране с цел генетично верифициране на диагнозата. На база на проведения молекулярно-генетичен анализ, установихме наличието на два хетерозиготни генетични варианта с.2310dup, p.Glu771ArgfsTer8 и с.11864G>A, p.Trp3955Ter в *USH2A* гена (NM_206933) (Фигура 85).



Фигура 85: Секвенционен NGS профил на вариантите c.2310dup, p.Glu771ArgfsTer8 и c.11864G>A, p.Trp3955Ter в *USH2A* гена. А). Секвенционен профил на варианта c.2310dup, p.Glu771ArgfsTer8. Б). Секвенционен профил на варианта c.11864G>A, p.Trp3955Ter.

Тъй като родителите на пациента не бяха налични за молекулярно-генетични изследвания не успяхме директно чрез изследване на родителите да докажем локализацията на вариантите върху алелите на гена *USH2A*. Това което направихме в случая беше да изследваме детето на таргетния пациент за носителство на вариантите c.2310dup, p.Glu771ArgfsTer8 и c.11864G>A, p.Trp3955Ter чрез секвениране по Sanger. Резултатите от молекулярно-генетичния анализ ни дадоха яснота за локализацията на вариантите върху алелите на *USH2A* гена при индексния пациент. На база на проведените изследвания установихме, че детето на пациента е хетерозиготен носител само на варианта c.11864G>A, p.Trp3955Ter. По този начин доказахме, че при индексния пациент вариантът c.2310dup, p.Glu771ArgfsTer8 е локализиран на единия алел, докато вариантът c.11864G>A,

p.Trp3955Ter на другия алел на *USH2A* гена, което съответства на автозомно-рецесивен модел на унаследяване (Фигура 86).



Фигура 86: Секвенционен профил на вариантите c.2310dup, p.Glu771ArgfsTer8 и c.11864G>A, p.Trp3955Ter в *USH2A* гените. А). Секвенционен профил на таргетния пациент, хетерозиготен носител на варианта c.2310dup. Б). Секвенционен профил на таргетния пациент, хетерозиготен носител на варианта c.11864G>A. В). Секвенционен профил на детето на пациента, показващ нормален генотип за варианта c.2310dup. Г). Секвенционен профил на детето на пациента, хетерозиготен носител на варианта c.11864G>A.

Генетичният вариант c.2310dup не е откриван сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1). Въпреки че той не е съобщаван досега в асоциация с *USH2A*-свързани заболявания, следните доказателства са в подкрепа на неговата патогенност: 1) отсъствието на варианта от контролните популации по проекта gnomAD, 2) вариантът е публикуван в базата данни LOVD под номер 00401126 като вероятно патогенен, 3) съответствието на *USH2A*-свързаните заболявания с клиничната картина при пациента.

Към момента в базата данни ClinVar са публикувани широк набор от патогенни/вероятно патогенни варианти в *USH2A* гена (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=ush2a%5Bgene%5D&redir=gene>). Между тях се срещат всякакъв тип генетични дефекти – missense, nonsense, frameshift и splice site. Впечатление прави това, че най-голям процент от патогенните варианти са nonsense и

frameshift, което дава индикация за това, че варианти, водещи до загуба на функция (loss of function), какъвто е и детектираният от нас вариант, са силно застъпен патогенен механизъм при *USH2A*-свързаните заболявания. Базирайки се на казаното до тук и съгласно критериите на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицираме идентифицираната от нас находка с.2310dup като патогенна.

Генетичният вариант с.11864G>A, p.Trp3955Ter е откриван сред контролните популации по проекта gnomAD (v2.1.1), като неговата популационна честота е оценена на 0.01%. Сред контролните проби се детектира и един хомозиготен носител на варианта на възраст между 35-40 години. Това може да се дължи на факта, че симптомите на заболяването могат да се проявят и на по-късна възраст. Вариантът е съобщаван многократно като патогенен в ClinVar базата данни при пациенти с *USH2A*-свързани заболявания (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/2357/>). Редица проучвания доказват, че този генетичен вариант е един от най-честите варианти в *USH2A* гена, който се детектира при пациентите със синдром на Usher (Dzhemileva *et al.*, 2014; Neuhaus *et al.*, 2017; Zupan *et al.*, 2019). Zupan *et al.*, 2019 наблюдават и различия в тежестта на заболяването при отделните пациенти, хомозиготни носители на тази генетична находка, като предполагат че това се дължи на комбинация от други фактори извън *USH2A* гена. Съгласно критериите на ACMG/AMP за интерпретация на генетичните варианти, класифицираме варианта с.11864G>A като патогенен.

Както описахме в глава „Литературен обзор“, белтъчният продукт на гена *USH2A* е локализиран във вътрешното ухо и ретината. Той е важен компонент на базалните мембрани и участва в развитието и хомеостазата на вътрешното ухо и ретината (Bhattacharya *et al.*, 2002). Нарушената функция на *USH2A* белтъка най-вероятно засяга именно развитието и хомеостазата на вътрешното ухо и ретината. В зависимост от типа на генетичния дефект в комбинация с фактори на околната среда се проявява характерната клинична симптоматика за *USH2A*-свързаните заболявания, която се наблюдава и при таргетния пациент.

Установяването на генетичната причина за клиничната симптоматика при засегнатия пациент беше от особено значение за семейството, тъй като те вече имаха родено дете и искаха да проверят дали то може да развие заболяването. В допълнение семейството планираше втора бременност. След проведеният молекулярно-генетичен анализ при таргетния пациент, доказахме, че той със сигурност ще предаде един от генетичните

варианти в поколението си, тъй като при него и двата алела на *USH2A* гена са засегнати. За да се гарантира здраво поколение, се наложи да проведем секвенционен анализ на *USH2A* гена при партньорката на пациента, за да се определи дали тя е носител на патогенни генетични варианти по дължината на *USH2A* гена. На база на допълнителни молекулярно-генетични изследвания, установихме, че партньорката на пациента не е носител на патогенни варианти по дължината на *USH2A* гена. Проведената медико-генетична консултация в семейството беше фокусирана върху риска от поява на това заболяване в поколението, като се наблегна на това, че всички техни деца ще бъдат здрави носители на генетичен вариант в *USH2A* гена, тъй като бащата винаги ще предава засегнат алел в поколението си.

4.2.4. Наследствена оптична невропатия на Leber

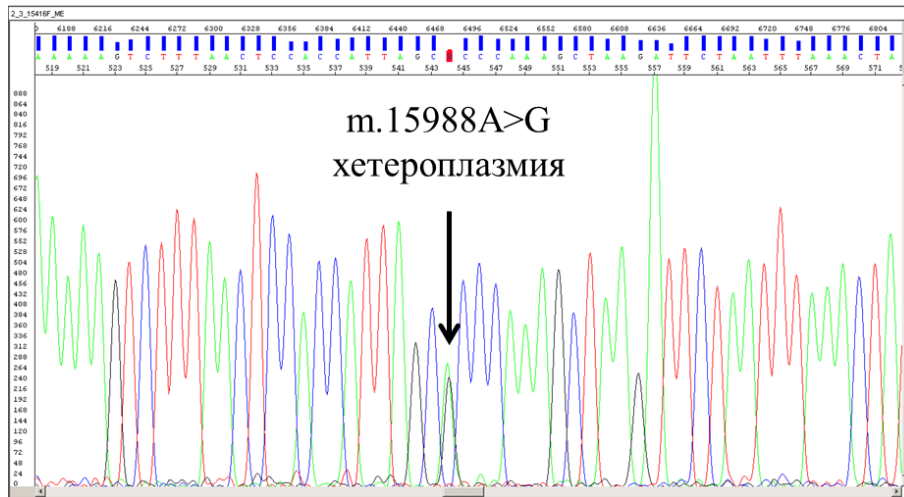
Клинична картина

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

Молекулярно-генетичен анализ

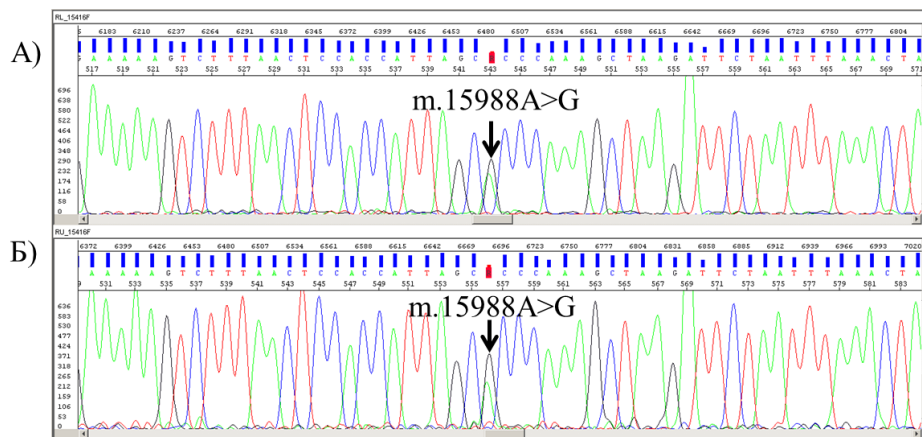
Патогенни варианти в митохондриалния геном са причина за появата на това заболяване. Поради тази причина проведохме таргетно секвениране по Sanger на митохондриалната ДНК с цел установяване на генетичната причина, довела до клиничните симптоми при таргетния пациент.

Проведеният молекулярно-генетичен анализ показва наличието на варианта m.15988A>G в гена *MT-TP*, който кодира митохондриалната транспортна РНК за пролин, във висока степен на хетероплазмия при таргетния пациент (Фигура 87).



Фигура 87: Секвенционен профил на варианта m.15988A>G в гена *MT-TP* при таргетния пациент.

Тъй като изходният материал за изследване беше венозна кръв, решихме да проверим степента на хетероплазмия на варианта m.15988A>G и в други тъкани от пациента. Проведохме таргетно секвениране по Sanger за варианта m.15988A>G върху ДНК материал, изолиран от букална лигавица и уринна проба на пациента (Фигура 88).

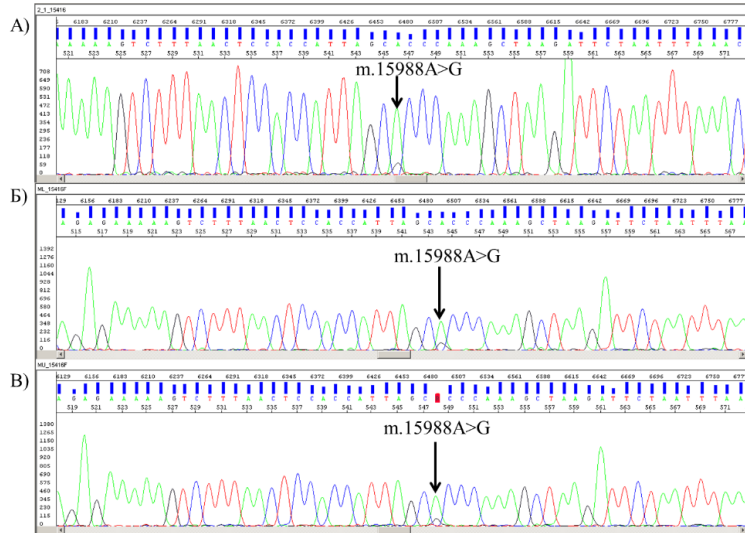


Фигура 88: Секвенционен профил на варианта m.15988A>G при таргетния пациент. А). Секвенционен профил на варианта m.15988A>G в ДНК, изолирана от букална лигавица на пациента. Б). Секвенционен профил на варианта m.15988A>G в ДНК, изолирана от урина на пациента.

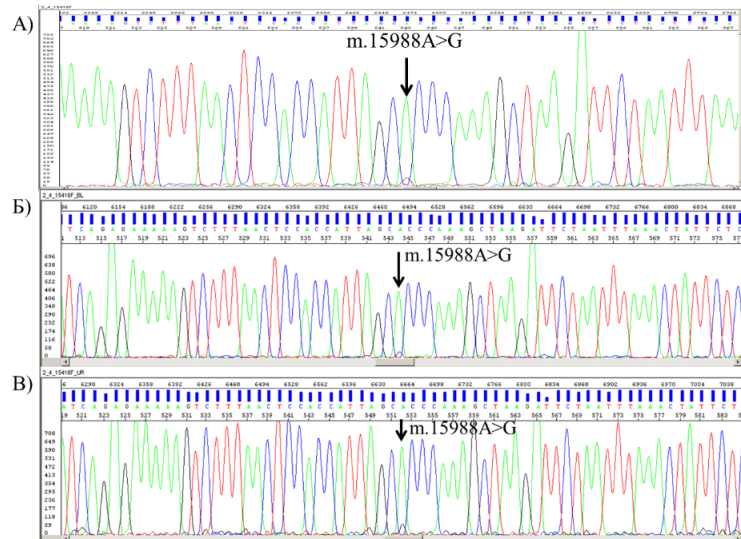
Получените резултати показаха носителството на варианта m.15988A>G във висока степен на хетероплазмия при всички изследвани ДНК проби от пациента.

За да потвърдим или отхвърлим патогенния ефект на варианта проведехме сегрегационен анализ в семейството. Изследвахме здравите майка и брат на пациента, за да проверим дали някой от тях носи генетичния вариант m.15988A>G. За целта таргетно изследвахме ДНК проби, изолирани от кръв, букална лигавица и урина от майката и брата

на пациента. Молекулярно-генетичният анализ показва, че майката и братът на пациента също са носители на варианта m.15988A>G, но в много ниска степен на хетероплазмия (Фигура 89 и Фигура 90).



Фигура 89: Секвенционен профил на варианта m.15988A>G при майката на таргетния пациент. А). Секвенционен профил на варианта m.15988A>G в ДНК, изолирана от венозна кръв, показващ носителство на варианта в ниска степен на хетероплазмия. Б). Секвенционен профил на варианта m.15988A>G в ДНК, изолирана от букална лигавица, показващ носителство на варианта в ниска степен на хетероплазмия. В) Секвенционен профил на варианта m.15988A>G в ДНК, изолирана от урина, показващ носителство на варианта в ниска степен на хетероплазмия.



Фигура 90: Секвенционен профил на варианта m.15988A>G при брата на таргетния пациент. А). Секвенционен профил на варианта m.15988A>G в ДНК, изолирана от венозна кръв, показващ носителство на варианта в ниска степен на хетероплазмия. Б). Секвенционен профил на варианта m.15988A>G в ДНК, изолирана от букална лигавица, показващ носителство на варианта в ниска степен на хетероплазмия. В) Секвенционен профил на варианта m.15988A>G в ДНК, изолирана от урина, показващ носителство на варианта в ниска степен на хетероплазмия.

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

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

В допълнение трябва да имаме предвид, че патогенни митохондриални варианти, свързани с LHON, могат да се изявят на различна възраст и с различна тежест при носителите в рамките дори на едно семейство (Yu-Wai-Man P, 2000). Това ни дава основание да смятаме, че макар и да са описани случаи на носителство на варианта m.15988A>G в базата данни MITOMAP, те са много малко на брой и на база на тези данни

не може категорично да заключим, дали вариантът е с непатогенен ефект, тъй като докладваните носители може да не са изявили заболяването все още.

В подкрепа на патогенната природа на варианта m.15988A>G е и това, че в близост до него е локализиран друг патогенен вариант (m.15990G>A), което от своя страна определя значимостта на региона, в който попада. На база на казаното до тук класифицираме открития от нас вариант m.15988A>G като вариант с неясно клинично значение.

Генетичният вариант засяга гена *MT-TP*, който кодира митохондриалната транспортна РНК за пролин. В резултат на увредена функция на белтъчния продукт на гена *MT-TP*, се нарушава и нормалната митохондриална белтъчна синтеза, което води до увреждане на функцията на митохондриите. Вероятно такива митохондриални нарушения са свързани с наблюдаваната клинична симптоматика при таргетния пациент.

Установяването на генетичната причина за наблюдаваното заболяване е от основно значение за таргетните пациенти, тъй като в момента се разработват и прилагат различни терапии за лечение на LHON. Генетично верифицираният от нас пациент беше включен в клинично изпитване на медикамент за терапия при пациенти с наследствена оптична невропатия на Leber. Приложеното лечение доведе до подобряване на състоянието на пациента, което за пореден път доказва необходимостта от своевременно генетично потвърждаване на диагнозата с цел бързо включване на пациентите към нововъведените терапии за лечение. Навременната терапия е от изключително значение за забавяне на прогресията на заболяването, което от своя страна би довело до подобряване на начина на живот на засегнатите пациенти.

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

От групата на офталмологичните заболявания генетично верифицирахме 4-ма (57%) от пациентите. Изборът на подходящ метод за молекулярно-генетична диагностика се определяше от таргетната диагноза. Секвениране от ново поколение се прилага масово при заболявания, които могат да се дължат на патогенни варианти в различни гени. Секвениране по Sanger е подходящ метод за диагностика, когато имаме ясен генетичен таргет (напр. митохондриалния геном). Въпреки това в някои случаи е необходимо комплексното

използване на повече от един метод за анализ с цел потвърждаване на диагнозата на молекулно ниво. Това демонстриранхме нагледно с представения пациент с *CEP290*-свързано заболяване.

4.3. Обобщение на резултатите и заключение

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

5. ИЗВОДИ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6. ПРИНОСИ

Приноси с научно-приложен характер:

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

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

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

7. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

7.1. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

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

Импакт фактор (2020): 4.296

Забелязани цитирания: 1

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

Забелязани цитирания: 1

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

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

ОБЩ ИМПАКТ ФАКТОР: 4.296

7.2. НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

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

7. **Atemin S**, Todorov T, Ivanova M, Kathom H, Avdjieva D, Mitev V, Todorova A. First genetically proven Arginase deficiency case of Bulgarian Roma origin due to a novel pathogenic splice site variant in the ARG1 gene. ESHG Conference, June 15–18, 2019, Gothenburg, Sweden (E-P06.03)

8. **Atemin S**, Todorov T, Sleptsova M, Mitev V, Todorova A. NARS1-related epilepsy in a Bulgarian patient. ESHG Conference, June 11-14, 2022, Vienna, Austria (EP10.053)

8. БИБЛИОГРАФИЈА

8.1. Чуждоезична литература

1. Abramovici, S. and Bagić, A. (2016) 'Epidemiology of epilepsy', *Handbook of Clinical Neurology*, 138(6), pp. 159–171. doi: 10.1016/B978-0-12-802973-2.00010-0.
2. Achilli, A. *et al.* (2012) 'Rare primary mitochondrial DNA mutations and probable synergistic variants in leber's hereditary optic neuropathy', *PLoS ONE*, 7(8). doi: 10.1371/journal.pone.0042242.
3. Aguib, Y. *et al.* (2021) 'New Variant with a Previously Unrecognized Mechanism of Pathogenicity in Hypertrophic Cardiomyopathy', *Circulation*, pp. 754–757. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.048295.
4. Allegri, G. *et al.* (2010) 'Fumaric aciduria: An overview and the first Brazilian case report', *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33(4), pp. 411–419. doi: 10.1007/s10545-010-9134-2.
5. Aller, E. *et al.* (2004) 'Genetic analysis of 2299delG and C759F mutations (USH2A) in patients with visual and/or auditory impairments', *European Journal of Human Genetics*, 12(5), pp. 407–410. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201138.
6. Angela Sun, Eric A Crombez, and D. W. (2021) 'Arginase Deficiency Summary Genetic counseling Diagnosis Suggestive Findings', *GeneReviews*, pp. 1–20.
7. Angural, A. *et al.* (2021) 'Missense Variation in TPP1 Gene causes Neuronal Ceroid Lipofuscinosis Type 2 in a Family from Jammu and Kashmir-India', (July). doi: 10.20944/preprints202107.0661.v1.
8. Ash, D. E. *et al.* (1998) 'Molecular basis of hyperargininemia: Structure-function consequences of mutations in human liver arginase', *Molecular Genetics and Metabolism*, 64(4), pp. 243–249. doi: 10.1006/mgme.1998.2677.
9. Behjati, S. and Tarpey, P. S. (2013) 'What is next generation sequencing?', *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition*, 98(6), pp. 236–238. doi: 10.1136/archdischild-2013-304340.
10. Bhattacharya, G. *et al.* (2002) 'Localization and expression of usherin: A novel basement membrane protein defective in people with Usher's syndrome type IIa', *Hearing Research*, 163(1–2), pp. 1–11. doi: 10.1016/S0378-5955(01)00344-6.
11. Bi, R. *et al.* (2012) 'Complete mitochondrial DNA genome sequence variation of Chinese families with mutation m.3635G>A and Leber hereditary optic neuropathy', *Molecular Vision*, 18(June), pp. 3087–3094.
12. Blair, E. *et al.* (2002) 'Mutations of the light meromyosin domain of the β -myosin heavy chain rod in hypertrophic cardiomyopathy', *Circulation Research*, 90(3), pp. 263–269. doi: 10.1161/hh0302.104532.
13. Blanco-Kelly, F. *et al.* (2015) 'Clinical aspects of usher syndrome and the USH2A gene in a cohort of 433 patients', *JAMA Ophthalmology*, 133(2), pp. 157–164. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2014.4498.
14. Bohlega, S. *et al.* (2004) 'Mutation of the slow myosin heavy chain rod domain underlies hyaline body myopathy', *Neurology*, 62(9), pp. 1518–1521. doi: 10.1212/01.WNL.0000123255.92062.37.

15. Braverman, N. E., D'Agostino, M. D. and MacLean, G. E. (2013) 'Peroxisome biogenesis disorders: Biological, clinical and pathophysiological perspectives', *Developmental Disabilities Research Reviews*, 17(3), pp. 187–196. doi: 10.1002/ddrr.1113.
16. Bujakowska, K. *et al.* (2012) 'CRB1 mutations in inherited retinal dystrophies', *Human Mutation*, 33(2), pp. 306–315. doi: 10.1002/humu.21653.
17. Burnight, E. R. *et al.* (2014) 'CEP290 gene transfer rescues Leber congenital amaurosis cellular phenotype', *Gene Therapy*, 21(7), pp. 662–672. doi: 10.1038/gt.2014.39.
18. Collin, R. W. *et al.* (2012) 'Antisense oligonucleotide (AON)-based therapy for leber congenital amaurosis caused by a frequent mutation in CEP290', *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 1(3), p. e14. doi: 10.1038/mtna.2012.3.
19. Collins, C. S. and Gould, S. J. (1999) 'Identification of a common PEX1 mutation in Zellweger syndrome', *Human Mutation*, 14(1), pp. 45–53. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(1999)14:1<45::AID-HUMU6>3.0.CO;2-J.
20. Coman D, Kranc KR, C. J. (2006) 'Fumarate Hydratase Deficiency', *GeneReviews® [Internet]*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>.
21. Coppieters, F. *et al.* (2010) 'CEP290, a gene with many faces: Mutation overview and presentation of CEP290base', *Human Mutation*, 31(10), pp. 1097–1108. doi: 10.1002/humu.21337.
22. Crane, D. I., Maxwell, M. A. and Paton, B. C. (2005) 'PEX1 mutations in the Zellweger spectrum of the peroxisome biogenesis disorders', *Human Mutation*, 26(3), pp. 167–175. doi: 10.1002/humu.20211.
23. Desmet, F. O. *et al.* (2009) 'Human Splicing Finder: An online bioinformatics tool to predict splicing signals', *Nucleic Acids Research*, 37(9), pp. 1–14. doi: 10.1093/nar/gkp215.
24. Diez-Fernandez, C. *et al.* (2018) 'Mutations and common variants in the human arginase 1 (ARG1) gene: Impact on patients, diagnostics, and protein structure considerations', *Human Mutation*, 39(8), pp. 1029–1050. doi: 10.1002/humu.23545.
25. Duijkers, L. *et al.* (2018) 'Antisense oligonucleotide-based splicing correction in individuals with leber congenital amaurosis due to compound heterozygosity for the c.2991+1655A>G mutation in CEP290', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), pp. 1–12. doi: 10.3390/ijms19030753.
26. DuPont, M. *et al.* (2018) 'Investigating the disease association of USH2A p.C759F variant by leveraging large retinitis pigmentosa cohort data', *Ophthalmic Genetics*, 39(2), pp. 291–292. doi: 10.1080/13816810.2017.1418388.
27. Dy, M. E., Sims, K. B. and Friedman, J. (2015) 'TPP1 deficiency: Rare cause of isolated childhood-onset progressive ataxia', *Neurology*, 85(14), pp. 1259–1261. doi: 10.1212/WNL.0000000000001876.
28. Dzhemileva, L. *et al.* (2014) 'Prevalence Of Mutation C.11864g >a (p. Trp3955x) In The USH2A Gene In Patients With Usher Syndrome From Volga-ural Region Of Russia', *Archives of Disease in Childhood*, 99(Suppl 2), p. A475.1-A475. doi: 10.1136/archdischild-2014-307384.1316.
29. Ebberink, M. S. *et al.* (2010) 'Spectrum of PEX6 mutations in Zellweger syndrome spectrum patients', *Human Mutation*, 31(1), pp. 1058–1070. doi: 10.1002/humu.21153.

30. Elsayed, L. E. O. *et al.* (2020) ‘Novel Homozygous Missense Mutation in the ARG1 Gene in a Large Sudanese Family’, *Frontiers in Neurology*, 11(October), pp. 1–7. doi: 10.3389/fneur.2020.569996.
31. Evans, R. *et al.* (2021) ‘Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer’, *bioRxiv*, p. 2021.10.04.463034. doi: 10.1101/2021.10.04.463034.
32. Faghihi, M. A., Mottagui-Tabar, S., & Wahlestedt, C. (2004) ‘Genetics of neurological disorders’, *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 4(3), pp. 317–332. doi: 10.1586/14737159.4.3.317.
33. Fiorillo, C. *et al.* (2016) ‘MYH7-related myopathies: Clinical, histopathological and imaging findings in a cohort of Italian patients’, *Orphanet Journal of Rare Diseases*. Orphanet Journal of Rare Diseases, 11(1). doi: 10.1186/s13023-016-0476-1.
34. Fraser, J. A., Biousse, V. and Newman, N. J. (2010) ‘The Neuro-ophthalmology of Mitochondrial Disease’, *Survey of Ophthalmology*, 55(4), pp. 299–334. doi: 10.1016/j.survophthal.2009.10.002.
35. Garanto, A., Duijkers, L. and Collin, R. W. J. (2015) ‘Species-dependent splice recognition of a cryptic exon resulting from a recurrent intronic CEP290 mutation that causes congenital blindness’, *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), pp. 5285–5298. doi: 10.3390/ijms16035285.
36. Gardner, E. *et al.* (2019) ‘Mutation update: Review of TPP1 gene variants associated with neuronal ceroid lipofuscinosis CLN2 disease’, *Human Mutation*, 40(11), pp. 1924–1938. doi: 10.1002/humu.23860.
37. Gerard, X. *et al.* (2012) ‘AON-mediated exon skipping restores ciliation in fibroblasts harboring the common leber congenital amaurosis CEP290 mutation’, *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 1(6), p. e29. doi: 10.1038/mtna.2012.21.
38. Golabek, A. A. *et al.* (2003) ‘Biosynthesis, glycosylation, and enzymatic processing in vivo of human tripeptidyl-peptidase I’, *Journal of Biological Chemistry*. © 2003 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 278(9), pp. 7135–7145. doi: 10.1074/jbc.M211872200.
39. Golabek, A. A. *et al.* (2005) ‘Glycosaminoglycans modulate activation, activity, and stability of tripeptidyl-peptidase I in vitro and in vivo’, *Journal of Biological Chemistry*. © 2005 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 280(9), pp. 7550–7561. doi: 10.1074/jbc.M412047200.
40. Hartley, J. N. *et al.* (2012) ‘Novel Autosomal Recessive c10orf2 Mutations Causing Infantile-Onset Spinocerebellar Ataxia’, *Case Reports in Pediatrics*, 2012, pp. 1–4. doi: 10.1155/2012/303096.
41. Hock, D. H., Robinson, D. R. L. and Stroud, D. A. (2020) ‘Blackout in the powerhouse: Clinical phenotypes associated with defects in the assembly of OXPHOS complexes and the mitoribosome’, *Biochemical Journal*, 477(21), pp. 4085–4132. doi: 10.1042/BCJ20190767.
42. Den Hollander, A. I. *et al.* (1999) ‘Mutations in a human homologue of Drosophila crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12)’, *Nature Genetics*, 23(2), pp. 217–221. doi: 10.1038/13848.
43. Iyer, R. *et al.* (1998) ‘The human arginases and arginase deficiency’, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 21(SUPPL. 1), pp. 86–100. doi:

- 10.1023/A:1005313809037.
44. Jaenicke, T. *et al.* (1990) ‘The complete sequence of the human β -myosin heavy chain gene and a comparative analysis of its product’, *Genomics*, 8(2), pp. 194–206. doi: 10.1016/0888-7543(90)90272-V.
 45. Jain-Ghai, S. *et al.* (2011) ‘Arginase I deficiency: Severe infantile presentation with hyperammonemia: More common than reported?’, *Molecular Genetics and Metabolism*, 104(1), pp. 107–111. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.06.025>.
 46. Jaksch, M. *et al.* (2000) ‘Mutations in SCO2 are associated with a distinct form of hypertrophic cardiomyopathy and cytochrome c oxidase deficiency’, *Human Molecular Genetics*, 9(5), pp. 795–801. doi: 10.1093/hmg/9.5.795.
 47. Jaksch, M. *et al.* (2001) ‘Homozygosity (E140K) in SCO2 causes delayed infantile onset of cardiomyopathy and neuropathy’, *Neurology*, 57(8), pp. 1440–1446. doi: 10.1212/WNL.57.8.1440.
 48. Jasinge, E. *et al.* (2022) ‘Corrigendum to: Urine Organic Acid Analysis: Key Diagnostic Test for Fumaric Aciduria in a Sri Lankan Child’, *Laboratory medicine*, 53(3), p. e62. doi: 10.1093/labmed/lmab107.
 49. Jumper, J. *et al.* (2021) ‘Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold’, *Nature*. Springer US, 596(7873), pp. 583–589. doi: 10.1038/s41586-021-03819-2.
 50. Karczewski, K. J. *et al.* (2020) ‘The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans’, *Nature*, 581(7809), pp. 434–443. doi: 10.1038/s41586-020-2308-7.
 51. Klouwer, F. C. C. *et al.* (2015) ‘Zellweger spectrum disorders: Clinical overview and management approach Inherited metabolic diseases’, *Orphanet Journal of Rare Diseases*. Orphanet Journal of Rare Diseases, 10(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s13023-015-0368-9.
 52. Kurosaki, T., Popp, M. W. and Maquat, L. E. (2019) ‘Quality and quantity control of gene expression by nonsense-mediated mRNA decay’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(7), pp. 406–420. doi: 10.1038/s41580-019-0126-2.
 53. Laing, N. G. (2012) ‘Genetics of neuromuscular disorders’, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 49(2), pp. 33–48. doi: 10.3109/10408363.2012.658906.
 54. Lu B, Zhang Q, Wang H, Wang Y, Nakayama M, R. D. (2010) ‘Extracellular calcium controls background current and neuronal excitability via an UNC79-UNC80-NALCN cation channel complex’, *Neuron*, pp. 488–99. doi: 10.1016/j.neuron.2010.09.014.
 55. Lu, B. *et al.* (2007) ‘The Neuronal Channel NALCN Contributes Resting Sodium Permeability and Is Required for Normal Respiratory Rhythm’, *Cell*, 129(2), pp. 371–383. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.041.
 56. Ma, L. *et al.* (2021) ‘Generation of pathogenic TPP1 mutations in human stem cells as a model for neuronal ceroid lipofuscinosis type 2 disease’, *Stem Cell Research*, 53. doi: 10.1016/j.scr.2021.102323.
 57. Mairrot, K. *et al.* (2021) ‘Crb1-related retinal dystrophies in a cohort of 50 patients: A reappraisal in the light of specific müller cell and photoreceptor crb1 isoforms’, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). doi: 10.3390/ijms222312642.

58. Manole, A. *et al.* (2020) 'De Novo and Bi-allelic Pathogenic Variants in NARS1 Cause Neurodevelopmental Delay Due to Toxic Gain-of-Function and Partial Loss-of-Function Effects', *American Journal of Human Genetics*, 107(2), pp. 311–324. doi: 10.1016/j.ajhg.2020.06.016.
59. Marcogliese, P. C. *et al.* (2018) 'IRF2BPL Is Associated with Neurological Phenotypes', *American Journal of Human Genetics*, 103(2), pp. 245–260. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.07.006.
60. Massimo Pandolfo (2011) 'Genetics of epilepsy', *Seminars in Neurology*, 31, pp. 506–18. doi: 10.1055/s-0031-1299789.
61. Mole, S. E. *et al.* (2021) 'Guidelines on the diagnosis, clinical assessments, treatment and management for CLN2 disease patients', *Orphanet Journal of Rare Diseases*. BioMed Central, 16(1), pp. 1–19. doi: 10.1186/s13023-021-01813-5.
62. Nagy, E. and Maquat, L. E. (1998) 'A rule for termination-codon position within intron-containing genes: When nonsense affects RNA abundance', *Trends in Biochemical Sciences*, 23(6), pp. 198–199. doi: 10.1016/S0968-0004(98)01208-0.
63. Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2009) *Lehninger Principles of Biochemistry (Sixth edition)*, W.H. Freeman.
64. Neuhaus, C. *et al.* (2017) 'Next-generation sequencing reveals the mutational landscape of clinically diagnosed Usher syndrome: copy number variations, phenocopies, a predominant target for translational read-through, and PEX26 mutated in Heimler syndrome', *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, 5(5), pp. 531–552. doi: 10.1002/mgg3.312.
65. Oh, C. Y. and Bainbridge, J. (2012) 'Lowering the seizure threshold associated with antidepressants, stimulants, antipsychotics, and others', *Mental Health Clinician*, 2(5), pp. 127–128. doi: 10.9740/mhc.n127568.
66. Ouyang, X. M. *et al.* (2004) 'Mutational spectrum in Usher syndrome type II', *Clinical Genetics*, 65(4), pp. 288–293. doi: 10.1046/j.1399-0004.2004.00216.x.
67. Pajusalu, S. *et al.* (2016) 'De novo exonic mutation in MYH7 gene leading to exon skipping in a patient with early onset muscular weakness and fiber-type disproportion', *Neuromuscular Disorders*. Elsevier B.V., 26(3), pp. 236–239. doi: 10.1016/j.nmd.2015.11.011.
68. Papadopoulou, L. C. *et al.* (1999) 'Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene', *Nature Genetics*, 23(3), pp. 333–337. doi: 10.1038/15513.
69. Pecina, P. *et al.* (2004) 'Genetic Defects of Cytochrome c Oxidase Assembly', *Physiological Research*, 53(SUPPL. 1).
70. Perales-Clemente, E. *et al.* (2010) 'Five Entry Points of the Mitochondrially Encoded Subunits in Mammalian Complex I Assembly', *Molecular and Cellular Biology*, 30(12), pp. 3038–3047. doi: 10.1128/mcb.00025-10.
71. Perrault, I. *et al.* (2007) 'Spectrum of NPHP6/CEP290 mutations in Leber congenital amaurosis and delineation of the associated phenotype.', *Human mutation*, 28(4), p. 416. doi: 10.1002/humu.9485.
72. Quiat, D. *et al.* (2011) 'Concerted regulation of myofiber-specific gene expression and muscle performance by the transcriptional repressor Sox6', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(25), pp. 10196–10201. doi: 10.1073/pnas.1107413108.

73. Ren, D. (2011) 'Sodium leak channels in neuronal excitability and rhythmic behaviors', *Neuron*, 72(6), pp. 899–911. doi: 10.1016/j.neuron.2011.12.007.
74. Richards, S. *et al.* (2015) 'Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology', *Genetics in Medicine*, 17(5), pp. 405–424. doi: 10.1038/gim.2015.30.
75. Sacconi, S. *et al.* (2003) 'Mutation Screening in Patients With Isolated Cytochrome c Oxidase Deficiency', *Pediatric Research*, 53(2), pp. 224–230. doi: 10.1203/01.pdr.0000048100.91730.6a.
76. Scaglia, F. and Lee, B. (2006) 'Clinical, biochemical, and molecular spectrum of hyperargininemia due to arginase I deficiency', *American Journal of Medical Genetics - Seminars in Medical Genetics*, 142 C(2), pp. 113–120. doi: 10.1002/ajmg.c.30091.
77. Shamseldin, H. E. *et al.* (2016) 'Mutations in UNC80, Encoding Part of the UNC79-UNC80-NALCN Channel Complex, Cause Autosomal-Recessive Severe Infantile Encephalopathy', *American Journal of Human Genetics*. The American Society of Human Genetics, 98(1), pp. 210–215. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.11.013.
78. Sheth, J. *et al.* (2018) 'Batten disease: Biochemical and molecular characterization revealing novel PPT1 and TPP1 gene mutations in Indian patients', *BMC Neurology*. BMC Neurology, 18(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s12883-018-1206-1.
79. Sin, Y. Y. *et al.* (2015) 'Arginase-1 deficiency', *Journal of Molecular Medicine*, 93(12), pp. 1287–1296. doi: 10.1007/s00109-015-1354-3.
80. Sohn, R. L. *et al.* (1997) 'A 29 residue region of the sarcomeric myosin rod is necessary for filament formation', *Journal of Molecular Biology*, 266(2), pp. 317–330. doi: 10.1006/jmbi.1996.0790.
81. Steinberg, S. J. *et al.* (2006) 'Peroxisome biogenesis disorders', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1763(12), pp. 1733–1748. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.09.010.
82. Stray-Pedersen, A. *et al.* (2016) 'Biallelic Mutations in UNC80 Cause Persistent Hypotonia, Encephalopathy, Growth Retardation, and Severe Intellectual Disability', *American Journal of Human Genetics*, 98(1), pp. 202–209. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.11.004.
83. Sun, Y. *et al.* (2013) 'Autosomal Recessive Spinocerebellar Ataxia 7 (SCAR7) is Caused by Variants in TPP1, The Gene Involved in Classic Late-Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis 2 Disease (CLN2 Disease)', *Human Mutation*, 34(5), pp. 706–713. doi: 10.1002/humu.22292.
84. Todorova, A. *et al.* (1999) 'C283Y mutation and other C-terminal nucleotide changes in the γ - sarcoglycan gene in the Bulgarian Gypsy population', *Human Mutation*, 14(1), pp. 40–44. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(1999)14:1<40::AID-HUMU5>3.0.CO;2-R.
85. Tran Mau-Them, F. *et al.* (2019) 'De novo truncating variants in the intronless IRF2BPL are responsible for developmental epileptic encephalopathy', *Genetics in Medicine*, 21(4), pp. 1008–1014. doi: 10.1038/s41436-018-0143-0.
86. Valkenburg, D. *et al.* (2018) 'Clinical characterization of 66 patients with congenital retinal disease due to the deep-intronic c.2991+1655A>G mutation in CEP290', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 59(11), pp. 4384–4391. doi:

- 10.1167/iovs.18-24817.
87. Verdijk, R. M. *et al.* (2008) ‘Phenotypic consequences of a novel SCO2 gene mutation’, *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 146(21), pp. 2822–2827. doi: 10.1002/ajmg.a.32523.
 88. Villegas-Ruiz, V. *et al.* (2015) ‘Characterization and mRNA expression analysis of a novel ARG1 splicing mutation causing hyperargininemia’, *Clinical Biochemistry*. The Canadian Society of Clinical Chemists, 48(18), pp. 1273–1276. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2015.07.015.
 89. Walsh, R. *et al.* (2009) ‘Cardiomyopathy: A systematic review of disease-causing mutations in myosin heavy chain 7 and their phenotypic manifestations’, *Cardiology*, 115(1), pp. 49–60. doi: 10.1159/000252808.
 90. Wang, J. *et al.* (2017) ‘Epilepsy-associated genes’, *Seizure*, 44, pp. 11–20. doi: 10.1016/j.seizure.2016.11.030.
 91. Wang, L. *et al.* (2020) ‘Loss of NARS1 impairs progenitor proliferation in cortical brain organoids and leads to microcephaly’, *Nature Communications*. Springer US, 11(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41467-020-17454-4.
 92. Wangler, M. F. *et al.* (2018) ‘A metabolomic map of Zellweger spectrum disorders reveals novel disease biomarkers’, *Genetics in Medicine*. Elsevier Masson SAS, 20(10), pp. 1274–1283. doi: 10.1038/gim.2017.262.
 93. Waterham, H. R. and Ebberink, M. S. (2012) ‘Genetics and molecular basis of human peroxisome biogenesis disorders’, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier B.V., 1822(9), pp. 1430–1441. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.04.006.
 94. Wiszniewski W *et al.* (2011) ‘Potential involvement of more than one locus in trait manifestation for individuals with Leber congenital amaurosis’, *Hum Genet*. doi: doi:10.1007/s00439-010-0928-y.
 95. Yu-Wai-Man, P. *et al.* (2009) ‘Inherited mitochondrial optic neuropathies’, *Journal of Medical Genetics*, 46(3), pp. 145–158. doi: 10.1136/jmg.2007.054270.
 96. Yu-Wai-Man P, C. P. (2000) ‘Leber hereditary optic neuropathy’, *GeneReviews® [Internet]*.
 97. Zatz, M., Passos-Bueno, M. R. and Vainzof, M. (2016) ‘Neuromuscular disorders: genes, genetic counseling and therapeutic trials’, *Genetics and Molecular Biology*, 39(3), pp. 339–348. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0019.
 98. Zupan, A. *et al.* (2019) ‘Clinical and haplotypic variability of Slovenian USH2A patients homozygous for the c. 11864G>A nonsense mutation’, *Genes*, 10(12). doi: 10.3390/genes10121015.

8.2. Електронни източници

1. ClinVar database <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>
2. GeneCards: The Human Gene Database <https://www.genecards.org/>
3. Leiden Open Variation Database <https://www.lovd.nl/>
4. OMIM <https://www.omim.org/>
5. MedlinePlus <https://medlineplus.gov/>
6. Bitesizebio <https://bitesizebio.com/>
7. UCSC Genome Browser <https://genome.ucsc.edu/>
8. MITOMAP <https://www.mitomap.org/MITOMAP>
9. GenBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
10. MedLinkNeurology <https://www.medlink.com/>
11. School of Biomedical Sciences Wiki <https://teaching.ncl.ac.uk/bms/wiki/>