

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

\*\*\*\*\*

**МАРИЯ ЦАНЕВА ГЛУШКОВА**

**МОЛЕКУЛНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ФАКОМАТОЗИ В БЪЛГАРИЯ:  
НЕВРОФИБРОМАТОЗА ТИП 1 И ТИП 2, КОМПЛЕКС ТУБЕРОЗНА  
СКЛЕРОЗА ТИП 1 И ТИП 2 И СИНДРОМ НА VON HIPPEL-LINDAU**

# **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 генетика**

**НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:**

**Акад. Ваньо Иванов Митев, дм, дбн**

**Проф. Албена Първанова Годорова – Георгиева, дбн**

**София, 2018**

Дисертационният труд съдържа 151 страници, 52 фигури и 35 таблици.

Цитирани са 193 литературни източника и 15 електронни източника.

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

Включените в дисертацията изследвания са извършени в:

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

Настоящите изследвания са финансирани частично от Съвета по медицинска наука на Медицински Университет – София по договори: № Д-131/2017, № 1-Д/2016 и № 2-С/2015

**СЪДЪРЖАНИЕ**

Използвани съкращения .....	1
Резюме .....	3
Summary .....	5
Въведение.....	7
1. Литературен обзор .....	11
1.1. Факоматози .....	11
1.2. Неврофиброматози.....	12
1.2.1. Неврофиброматоза тип 1 .....	13
1.2.1.1. Клинична картина.....	13
1.2.1.2. Генетична основа на заболяването и засегнат белтъчен продукт.....	16
1.2.1.3. Диагностика на заболяването .....	20
1.2.1.4. Диференциална диагностика .....	21
1.2.1.5. Терапия на заболяването.....	23
1.2.1.6. Прогноза на заболяването .....	24
1.2.2. Неврофиброматоза тип 2 .....	25
1.2.2.1. Клинична картина.....	25
1.2.2.2. Генетична основа на заболяването и засегнат белтъчен продукт.....	27
1.2.2.3. Диагностика на заболяването .....	30
1.2.2.4. Диференциална диагностика .....	31
1.2.2.5. Терапия на заболяването.....	32
1.2.2.6. Прогноза на заболяването .....	33
1.3. Комплекс туберозна склероза .....	34
1.3.1. Клинична картина .....	34
1.3.2. Генетична основа на заболяването и засегнат белтъчен продукт .....	37
1.3.3. Диагностика на заболяването.....	40
1.3.4. Диференциална диагностика.....	42
1.3.5. Терапия на заболяването .....	43
1.3.6. Прогноза на заболяването .....	44
1.4. Синдром на von Hippel-Lindau.....	46
1.4.1. Клинична картина .....	46

---

1.4.2.	Генетична основа на заболяването и засегнат белтъчен продукт .....	48
1.4.3.	Диагностика на заболяването.....	51
1.4.4.	Диференциална диагностика.....	52
1.4.5.	Терапия на заболяването .....	54
1.4.6.	Прогноза на заболяването .....	54
1.5.	Обобщение на литературните данни.....	55
2.	Цел и Задачи .....	56
2.1.	Цел.....	56
2.2.	Задачи.....	56
3.	Материали и методи .....	57
3.1.	Материали.....	57
3.1.1.	Клиничен материал .....	57
3.1.2.	Биологичен материал .....	58
3.2.	Методи .....	58
3.2.1.	Преданалитична обработка на материала.....	58
3.2.1.1.	Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв по солеви метод.....	58
3.2.1.2.	Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна или капилярна кръв по фенол-хлороформен метод.....	60
3.2.2.	Аналитична обработка на материала .....	61
3.2.2.1.	Полимеразна верижна реакция; ПВР (Polymerase chain Reaction; PCR).....	61
3.2.2.2.	Електрофореза в агарозен гел.....	70
3.2.2.3.	Директно секвениране по Sanger с флуоресцентно белязани дидезокси нуклеотиди .....	71
3.2.2.4.	Мултиплексна лигазно зависима амплификация (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification, MLPA) .....	74
3.2.3.	Литературни бази данни, използвани в проучването .....	78
4.	Резултати и обсъждане .....	79
4.1.	Неврофиброматоза.....	79
4.1.1.	Неврофиброматоза тип 1 .....	79
4.1.1.1.	Изследвана група пациенти .....	79
4.1.1.2.	Резултати от молекулно-генетичен анализ .....	83

---

4.1.1.3.	Дискусия.....	90
4.1.1.4.	Обобщение на резултатите от NF1 .....	99
4.1.2.	Неврофиброматоза тип 2 .....	100
4.1.2.1.	Изследвана група пациенти .....	100
4.1.2.2.	Резултати от молекулно-генетичен анализ .....	101
4.1.2.3.	Дискусия.....	101
4.1.2.4.	Обобщение на резултатите от NF2 .....	104
4.2.	Комплекс туберозна склероза.....	105
4.2.1.	Изследвана група пациенти.....	105
4.2.2.	Резултати от молекулно-генетичен анализ.....	108
4.2.3.	Дискусия.....	111
4.2.4.	Обобщение на резултатите от NF2.....	119
4.3.	Синдром на von Hippel-Lindau.....	120
4.3.1.	Изследвана група пациенти.....	120
4.3.2.	Резултати от молекулно-генетичен анализ.....	122
4.3.3.	Дискусия.....	126
4.3.4.	Обобщение на резултатите от VHL.....	133
4.4.	Обобщение на резултатите и заключение .....	134
5.	Изводи .....	137
6.	Библиография .....	139
6.1.	Чуждоезична литература.....	139
6.2.	Българска литература .....	148
6.3.	Електронни източници .....	148
7.	Публикации и научни прояви във връзка с дисертационния труд.....	149
7.1.	Публикации във връзка с дисертационния труд.....	149
7.2.	Научни прояви във връзка с дисертационния труд .....	150
8.	Приноси.....	151

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ЦНС - централна нервна система

NF1 - Неврофиброматоза тип 1

NF2 - Неврофиброматоза тип 2

TSC - Tuberosus sclerosis complex (Комплекс туберкулозна склероза)

VHL - синдром на von Hippel-Lindau

NF - Неврофиброматози

SNF - сегментна NF

CAL - café-au-lait („кафе с мляко“)

ПНС - периферната нервна система

НИН - National Institute of Health (Националния институт по здравеопазване)

ПН - плексиформен неврофибром

г.в. - годишна възраст

MPNSTs - malignant peripheral nerve sheath tumors (злокачествени тумори на периферната нервна обвивка)

НСО - Неидентифицирани светли обекти (Unidentified bright objects)

ЯМР - Ядрено-Магнитен Резонанс

ГТКП - генерализирани тонично-клонични пристъпи

ГТФ/GTP - гуанозин трифосфат/guanosine triphosphate

ПКА - протеин киназа А

ПКС - протеин киназа С

CSRД - cysteine/serine rich domain (цистеин/серин богат домен)

TBD - tubulin binding domain (тубулин свързващ домен)

GRD - GTPase-activating protein (GAP)-related domain или Ras/GAP домен (домен за свързване с RAS и ГТФ)

SEC14-PH - липид свързващ домен

ФАК - focal adhesion kinase-interacting domain (домен отговорен за свързване с кинази)

NLS - nuclear localization signals ( последователност подпомагаща транспорта на белтъка през ядрените пори)

цАМФ - цикличен Аденозин монофосфат

МАРК - RAS/mitogen-activated protein kinase (сигналият път на митоген-активирана протеин киназа)

РТК - рецепторни тирозин кинази

PI3K - фосфатидилинозитол 3-киназа

ERK - extracellular signal-regulated kinases (извънклетъчните сигнални регулаторни кинази)  
RSK - рибозомна S6 киназа  
КТ - компютърна томография  
ПЕТ - Позитронно-емисионната томография  
PCR/ПВР - Polymerase Chain Reaction (Полимеразна верижна реакция)  
MLPA - Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification  
БВШ - билатерални вестибуларни шваноми  
УВШ - унилатерален вестибуларен шваном  
ВШ - вестибуларни шваноми  
ч.м.н. - черепномозъчен нерв  
ERM - ezrin-radixin-moesin (езрин-радиксин-моезин)  
mTOR - mammalian target of rapamycin/ mechanistic target of rapamycin  
ХП - хипопигментни петна  
СЕГА - Субепендимен гигантоклетъчен астроцитом  
ЛАМ - Лимфангиоматоза  
ССD - coiled-coil домен  
ТАD - транскрипционно активиращ домен  
CaMD - домен за калмодулин-свързващо място  
mTORC1 - mammalian target of rapamycin complex 1/mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTOR комплекс 1)  
IQ - Intelligence Quotient (коефициентът на интелигентност)  
IQ/DQ - intelligence and developmental quotient (коефициент на интелигентност и развитите)  
ТСНР - TSC свързано нервно-психично разстройство  
ЕЕГ - електроенцефалограма  
ХБ - хемангиобластом; цХБ – ХБ на ЦНС; рХБ – ХБ на ретината  
БКК - бъбречен клетъчен карцином  
Фео - феохромоцитом  
HIF-1 $\alpha$  - Hypoxia-inducible factor 1-alpha (Хипоксия-индуцируем фактор 1-алфа)  
VEGFA - Vascular endothelial growth factor A (васкуларен ендотелен фактор А)  
ДНК - Дезоксирибонуклеинова киселина  
ЕДТА - етилен диамин тетраацетат – натриева сол

## РЕЗЮМЕ

Настоящият дисертационен труд е насочен към молекулното охарактеризиране на заболявания от групата на Факоматози. Към тях спада Неврофиброматоза тип 1 (NF1), която се дължи на мутации в *NF1* гена [Abramowicz and Gos, 2014]. Следва Неврофиброматоза тип 2 (NF2), при което е засегнат *NF2* гена [Rouleau *et al.*, 1993, Troffater *et al.*, 1993]. Друг представител от тази група е Комплекс туберозна склероза (TSC). Заболяването може да се развие като резултат от мутации в *TSC2* гена или *TSC1* гена [Henske *et al.*, 1996; Slegtenhorst *et al.*, 1997]. Синдромът на von Hippel-Lindau е последния представител от тази група, обект на настоящия дисертационен труд. Причинява се от мутации във *VHL* гена [Latif *et al.*, 1993]. Тези заболявания се унаследяват по автозомно доминантен механизъм.

С помощта на модерни молекулни методики за първи път в България бяха генетично верифицирани случаи на NF1, NF2, TSC и VHL. При двадесет и пет от тридесет и пет изследвани семейства или общо при 71% от прицелната група с клинична диагноза NF1 бяха открити мутации в *NF1* гена. Пет от откритите 25 генетични варианти са нови за световната литература: две мутации засягащи сплайсинга, малка делеция на пет нуклеотида и дупликация на един нуклеотид. Петият нов вариант беше открит след провеждането на допълнителен анализ на 20 дълбоко интронни варианти в *NF1* гена. Бяха открити и две големи делеции: едната герминативна делеция на екзони 37-58 в ДНК изолирана от венозна кръв, а другата соматична делеция на екзони 1-12 в ДНК изолирана от свежа биопсия от неврофибром, като при този пациент беше доказана друга форма на NF1, наречена сегментна NF1 (SNF1). Случаят на соматична мутация е интересен тъй като е единствен по рода си за България и е генетично верифицирана SNF1 в хода на настоящия дисертационен труд.

По отношение на NF2, клинично поставената диагноза беше потвърдена при три от шест изследвани семейства или общо при 50% от случаите. Бяха открити две *nonsense* мутациите и една нова за световната литература мутация, представляваща *in-frame* делеция локализирана в домен на белтъка мерлин, в който мутационните събития са изключителна рядкост.

Настоящото проучване представлява и първата стъпка по посока на молекулно-генетично охарактеризиране на Комплекс туберозна склероза при български пациенти.

Диагнозата беше потвърдена при 94% от анализираната прицелна група. При четирима пациенти бяха открити нови непубликувани *TSC2* мутации в световната литература, от които две *frameshift*, една *nonsense* и една голяма делеция на 16 екзона. В *TSC1* гена бяха открити две непубликувани мутации, една *nonsense* и една *frameshift*. В допълнение, бяха открити и 13 описвани в литературата, патогенни варианти в двата гена, от които седем в *TSC2* гена и шест в *TSC1* гена.

В рамките на настоящия труд бяха изследвани и 12 пациента с клинична диагноза VHL. В анализираната група бяха открити пет мутации във *VHL* гена, като една от тях е нова за световната литература, представляваща първото комплексно мутационно събитие в този ген. Останалите четири мутации открити при изследваните български пациенти са добре известни и описани в световната литература, свързани с типичната клинична картина на заболяването. Диагнозата беше потвърдена при 42% от изследваните пациенти.

В хода на настоящия дисертационен труд бяха проведени молекулно-генетични изследвания върху общо 146 лица, като общо 50% от засегнатите семейства бяха генетично верифицирани, генетично консултирани и са подготвени за пренатална диагностика.

Молекулно-генетичният анализ на *NF1*, *NF2*, *TSC2*, *TSC1* и *VHL* гените ще даде възможност българските пациенти да бъдат рано и прецизно диагностицирани на ДНК ниво, което е от изключително значение за генетично верифициране на диагнозата и назначаване на адекватна терапия при заболявания с припокриваща се фенотипна изява, каквито са Факоматозите. Идентифицирането на генетичния вариант, причиняващ патологията в семейството е ключов момент и за изясняване на носителския статус на родствениците, които имат риск да развият и/или да предадат съответния генетичен дефект в поколението си. Това е важна предпоставка за адекватно семейно планиране и генетично консултиране на засегнатите семейства.

## SUMMARY

The present doctoral thesis is focused on the molecular characterization of diseases from the group of Phakomatosis. They include Neurofibromatosis type 1 (NF1), caused by mutations in the *NF1* gene [Abramowicz and Gos, 2014]. The second target is Neurofibromatosis type 2 (NF2) which affects *NF2* gene [Rouleau *et al.*, 1993, Troffater *et al.*, 1993]. Another representative of this group is Complex Tuberculous Sclerosis (TSC). The disease may develop as a result of mutations in the *TSC2* gene or the *TSC1* gene [Henske *et al.*, 1996; Slegtenhorst *et al.*, 1997]. Von Hippel-Lindau's syndrome is the final subject of the study. It is caused by mutations in the *VHL* gene [Latif *et al.*, 1993]. These diseases are inherited by autosomal dominant mechanism.

By means of the latest molecular technologies, different cases NF1, NF2, TSC and VHL were genetically verified for the first time in Bulgaria. In 25 out of 35 investigated families or a total of 71% of the target group with clinical diagnosis NF1 mutations were found in the *NF1* gene. Five of the 25 genetic variants in this gene are novel for the literature: two mutations affect splicing, a small deletion of five nucleotides, and duplication of one nucleotide. The fifth novel variant was discovered by additional testing for 20 deep intronic variants in the *NF1* gene. In addition, two large deletions were also found: one germinative deletion of exons 37-58 in DNA isolated from venous blood, and the other somatic deletion of exons 1-12 in DNA isolated from a fresh neurofibroma biopsy. In the last patient another form of NF1 was proven, called segmental NF1 (SNF1). This case with somatic mutation is interesting because it is unique for Bulgaria and SNF1 was genetically-verified in the course of the present study.

Regarding NF2, the clinical diagnosis was confirmed in three out of six investigated families, 50% of the cases. Two nonsense mutations and one novel mutation were found. The novel mutation is in-frame deletion localized in a domain of the merlin protein where mutational events are extremely rare.

The present study was the first one focused on the molecular-genetic characterization of Complex Tuberculous Sclerosis in Bulgarian patients. The diagnosis was confirmed in 94% of the patients from the analyzed group. In four patients novel TSC2 mutations were found: two frameshift, one nonsense mutation and one large deletion of exons 1-16. Two novel mutations

were found in the *TSC1* gene: one nonsense and one frameshift. In addition, 13 pathogenic variants were found in both genes, seven in the *TSC2* gene and six in the *TSC1* gene, all of them are known in the literature.

We also examined 12 patients with the clinical diagnosis of VHL. Five mutations were found in the VHL studied group; one of them is novel and represents the first complex mutation event in this gene. The remaining four mutations found in the Bulgarian group are well known and described in the literature in relation to the typical clinical picture of the disease. The diagnosis was confirmed in 42% of the investigated patients.

Within the course of the present study a total of 146 patients were genetically tested and 50% of the affected families were genetically verified; they were offered genetic counseling and they were prepared for prenatal diagnosis.

Molecular genetic analysis of *NF1*, *NF2*, *TSC2*, *TSC1* and *VHL* genes will allow the Bulgarian patients to be diagnosed early and accurately at the DNA level, which is extremely important for genetic verification of the diagnosis and for adequate therapy of such diseases with overlapping phenotypic manifestations, like Phakomatosis. The identification of the genetic variant causing the pathology in the family is a key point for the clarification of the carrier status in relatives who are at risk to develop the disease and to transmit the genetic variant in their offspring. This is an important prerequisite for adequate family planning and genetic counseling in the affected families.

„Човек е винаги далеч от разрешаването на проблема, докато не намери отговора.”

(“One is always a long way from solving a problem until one actually has the answer.”)

Стивън Хокинг

## ВЪВЕДЕНИЕ

Съществуват повече от сто различни заболявания, които засягат растежа на различни тъкани и са асоциирани с динамична променлива прогноза, което ги отнася към така наречените ракови заболявания. Преди появата на съвременната молекулярна биология общото между тези заболявания е било нарушената регулация на тъканен растеж, водеща до образуване на тумори и последващото им разпространение в други тъкани [Vogelstein and Kinzler, 1993; Bishop, 1995; Weinberg, 1996]. Клетъчният растеж в раковите клетки включва не само по-бързото им делене в сравнение с нормалните клетки, но и нарушена регулация в растежа на засегнатия тъкан. Туморните клетки игнорират сигналите извън тях и стимулират развитието на собствена съдова система, с която да функционират независимо от тъканта, от която са се развили [Vogelstein and Kinzler, 1993; Bishop, 1995; Weinberg, 1996]. Вече е известно, че процесът на образуване на тумор започва в резултат на нарушена регулация на единична прогениторна клетка. Туморите биха били клонални ако не е тенденцията да се различават генетично, поради високата скорост на мутиране на ДНК и склонност за генериране на големи хромозомни реанжировки. Различните ракови заболявания се характеризират с огромно многообразие, което е свързано с разнообразни причини за нарушена регулация на клетъчния цикъл. От друга страна се установява общ набор от генетични промени, които са в основата на почти всички известни ракови заболявания. Тези изменения включват два големи класа от гени: единият включва гени, кодиращи молекули, които участват и стимулират клетката към растеж, докато другият клас включва гени кодиращи белтъци, които инхибират клетъчния растеж. Въпреки че туморният растеж зависи от натрупването на мутации в много гени, промените в тези два класа гени е необходимо и важно условие за туморогенеза [Vogelstein and Kinzler, 1993; Bishop, 1995; Weinberg, 1996]. Тумор-супресорните гени действат като инхибират клетъчния растеж. Някои генни продукти, като например белтъчният продукт на гена *SMAD4*, улавят сигнали от извънклетъчния матрикс, докато други белтъчни продукти като p53 детектират различни сигнали (хромозомни ДНК реанжировки или нарушена

регулация в клетъчната сигнализация), предизвикващи клетъчен арест. Протоонкогените функционират в пътища, които стимулират клетъчния растеж, но под строга регулация, до появата на функционална мутация (или сръхекспресия на протоонкогена), което предизвиква увеличен растеж. Такъв пример е RAS-онкогенът, участващ в повече от 25% от всички ракови заболявания, чиято деактивация се наблюдава при различните типове рак. Генетичните промени в тумор-супресорните гени и протоонкогените заемат централна роля в туморогенезата.

В контекста на човешката, и по-специално на медицинската онкогенетика, разпространението и честотата на мутации в различните гени водещи до развитието на туморни образувания сред деца и възрастни все още обаче не са напълно изяснени на молекулно ниво. Познаването на такива мутации може да подобри разбирането на процеса туморогенеза, да даде възможност за правилна генетична консултация на пациентите и техните семейства както и преценка за правилна придружаваща индивидуална терапия (напр. химиотерапия) за всеки пациент. В бъдеще се очаква и все по-широко приложение на генна терапия, при която лечението да се насочва индивидуално към инсуфициентните гени на конкретния индивид. След проучване от месец ноември 2015 година като част от проект на St. Jude–Washington University Pediatric Cancer Genome Project (PCGP; [www.ebi.ac.uk/ega/search/site/PCGP](http://www.ebi.ac.uk/ega/search/site/PCGP)) става ясна и честотата на типовете туморни образувания сред деца до 20 годишна възраст. От тях 21,9% засягат централната нервна система (ЦНС) [Zhang J *et al.*, 2015].

Факоматози (от Английски език *Phakomatoses*) е общ термин обединяващ група от наследствени мултисистемни заболявания, които се характеризират с развитие на туморни образувания засягащи както ЦНС, така също и кожа, очи, вътрешни органи и кости. Към тази група спадат и следните автозомно доминантни наследствени заболявания, които са обект на разглеждане в настоящия дисертационен труд, а именно: Неврофиброматози тип 1 (NF1) и тип 2 (NF2), Комплекс туберозна склероза (TSC) и синдром на von Hippel-Lindau (VHL). При тези заболявания освен, че спадат към една обща група, друг обединяващ фактор е това, че се развиват в резултат на засягане на тумор-супресорни гени.

Исторически NF1, NF2 и шваноматози се означават с общия термин – Неврофиброматози. Това е група от заболявания, които предразполагат към развитие на тумори в ЦНС и абнормална кожна пигментация. Всеки тип се определя от наличие/отсъствие на петна „кафе с мляко“, лунички, от типа на развитие на тумор по

периферните нерви (неврофибром или шваном) и други специфични характеристики засягащи очите. Неврофиброматозите предразполагат към образуване на множество тумори и по периферната нервна система (ПНС) и често се считат за класически тумор-супресорни заболявания. Необходима е навременна грижа при засегнатите индивиди с цел ранното откриване на дефектните гени и симптоматично лечение на усложненията, които могат да възникнат [Huson, 2008]. Молекулният механизъм на тези заболявания не е напълно изяснен, но през последните десетилетия на миналия век, съвременните молекулно-генетични анализи показаха, че NF имат различни клинични и генетични характеристики [Yohay, 2006]. Тип 1 NF се причинява от мутации в *NF1* гена, като честота на това заболяване е 1:4000, докато тип 2 NF се причинява от мутации в *NF2* гена и се среща много по-рядко, с честота 1:40 000.

TSC е едно от най-често срещаните генетични заболявания с честота приблизително 1:6000 [Roach *et al.*, 1998]. Дефект в един от двата тумор-супресорни гени *TSC2* или *TSC1* причинява заболяването. Широкото разнообразие от клинични прояви и различните имена на заболяването го правят непознато за хората. TSC е комплексно наследствено заболяване, характеризиращо се с широк спектър от клинични характеристики. Обща черта е развитието на доброкачествени тумори (хамартоми) локализиращи в различни тъкани. Основата на наименованието туберозна склероза се дава от наличието на кортикални тубери, открити в мозъка. Други типични прояви включват пигментни нарушения по кожата, лицеви ангиофиброми, бъбречни ангиомиолиптоми и кисти, сърдечни рабдомиоми и други. Тежестта на изява на заболяването е изключително променлива в зависимост от тъканите, които са засегнати. Скалата варира от кожно засягане до тежки симптоми включващи епилепсия, поведенчески разстройства и умствено изоставане, както и множество бъбречни лезии водещи до тежка бъбречна недостатъчност [Roach *et al.*, 1998].

Синдромът на von Hippel-Lindau е пример за заболяване развиващо се в резултат на инактивиране на *VHL* гена, което причинява невъзможност за инхибиране на клетъчния растеж и последващо развитието на злокачествено заболяване [Maher *et al.*, 1990]. При него се наблюдава развитие на множество тумори и кисти в различни органи на човешкото тяло, които могат да бъдат доброкачествени и/или злокачествени. VHL се характеризира с развитие на хемангиобластоми в мозъка, костния мозък и ретината, бъбречни кисти и бъбречен клетъчен карцином (хипернефрома), феохромоцитом и

параганглиом, панкреатични кисти и панкреатични невроендокринни тумори, тумори на ендолимфатичния сак, цистаденоми на надсеменника [Maher et al., 2011]. Честота на заболяването е 1:36 000. Инактивирането на *VHL* гена, както и фактът, че са необходими още допълнителни проучвания по отношение на биохимията на белтъка, го прави интересен за бъдещи структурни проучвания.

Настоящият дисертационен труд е фокусиран върху молекулните характеристики на вече споменатите заболявания NF1, NF2, TSC и VHL. Интересът към заболяванията от този тип е породен от възможността да бъде открит молекулният дефект в семейството колкото може по-рано, за да бъде назначена правилна терапия при засегнатия индивид. С помощта на модерни молекулни методики за първи път в България бяха генетично верифицирани случаи на NF1, NF2, TSC и VHL, като беше открито първото комплексно мутационно събитие във *VHL* гена при пациент от български произход. Генетичното верифициране на клинично поставената диагноза е от съществено значение от една страна, за да бъде назначена адекватна терапия при редки болести с припокриващи се фенотипни изяви, каквито са Факоматозите. От друга страна идентификацията на генетичния вариант, причиняващ патологията, е необходима предпоставка за изясняване на носителския статус и идентифициране на рисковите родственици. Познаването на генетичната причина за дадено заболяване във фамилията е от съществено значение за семейно планиране и генетично консултиране на пациентите и техните близки.

## 1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

### 1.1. Факоматози

**Факоматози** (от Английски език *Phakomatoses*) е общ термин обединяващ група от наследствени мултисистемни заболявания, които се характеризират с развитие на туморни образувания засягащи централна нервна система (ЦНС), кожа, очи, вътрешни органи и кости [Burns *et al.*, 2004; Barbagallo *et al.*, 2002; Neau *et al.*, 2014]. В резултат на мултисистемното засягане, факоматозите са известни още като неврокутанни заболявания (от англ. език *neuro-oculo-cutaneous syndromes, neurocutaneous disorders*) [Carol Shields and Jerry Shields, 2013].

Етимологията на термина „Факоматоза“ идващ от Гръцки език „*φακός*“ означава: *phako* – lens, spot (петно), *oma* - тумор, *osis* – състояние. Терминът е формулиран още в началото на XX век от офталмолога Ян ван дер Хоув (Jan van der Hoeve), за да покаже характерните находки при хора още преди да бъде известна генетичната причина за развитието на тази група от заболявания [Hoeve, 1932; Carol Shields and Jerry Shields, 2013]. По това време към Факоматозите са били класифицирани заболявания като: Синдром на von Hippel-Lindau (ретинална и церебеларна хемангиоматоза), Неврофиброматоза (Синдром на von Recklinghausen) и Комплекс туберозна склероза (синдром на Бърневил). По-късно са били включени и други заболявания като: Синдром на Sturge-Weber (encephalofacial hemangiomas), Синдром на Wyburn-Mason (racemose angiomas) и други [Carol Shields and Jerry Shields, 2013].

По настоящем към Факоматозите се причисляват заболявания като:

- Атаксия телангиектазия (Ataxia telangiectasia);
- Инконтиненция пигменти (Incontinentia pigmenti);
- Неврофиброматози (Neurofibromatoses);
- Синдром на Gorlin (Nevoid basal cell carcinoma syndrome);
- Синдром на Sturge-Weber (Sturge-Weber syndrome);
- Комплекс туберозна склероза (Tuberous sclerosis complex);
- Синдром на Wyburn-Mason (Wyburn-Mason syndrome) (Bonnet–Dechaume–Blanc syndrome);
- Синдром на von Hippel-Lindau [Yanoff M and Duker JS, 2009].

Кожата и мозъкът имат ектодермален тъканен произход, поради което тези тъкани са засегнати, било то в резултат на различни генетични заболявания или на различни придобити състояния причисляващи се към групата на Факоматозите [Neau, 2014]. При някои заболявания като Синдром на von Hippel Lindau ектодермалното засягане е минимално [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010].

Всяко едно от заболяванията причисляващо се към групата на Факоматозите има прогресираща патология, която се проявява и развива през целия живот. Най-често тази патология се състои в развитие на тумори като неврофиброми при Неврофиброматоза тип 1 (NF1), шваноми при Неврофиброматоза тип 2 (NF2), ангиомиолиптоми при Комплекс туберкулозна склероза (TSC) и хемангиобластоми при синдром на von Hippel-Lindau (VHL). В някои случаи може да са налице вродени прояви като церебрални хамартоми при TSC или скелетна дисплазия при NF1, като по-голямата част от тежестта на тези заболявания идва поради прогресия в развитието на появилите се туморни образувания [Korf, 2005].

Факоматозите се причисляват към автозомно доминантните наследствени заболявания, с променлива експресия и висока пенетрантност. Клиничните изяви могат да варират както между различни семейства, така и в рамките на едно семейство, при хора носещи мутация обикновено клиничната проява включва наличие на няколко клинични симптома [Korf, 2005].

## 1.2. Неврофиброматози

Неврофиброматози (NF) спадат към групата на Факоматозите. Според съвременната класификация се разграничават три основни форми: неврофиброматоза тип 1 (NF1, von Recklinghausen's disease), неврофиброматоза тип 2 (NF2, bilateral acoustic neuroma) и всички останали NF включващи атипични форми на заболяването, като сегментна NF (NF5 или SNF) [Huson, 2008]. NF са група от заболявания, които са свързани с развитие на тумори в ЦНС и с необичайна кожна пигментация. Всеки тип се определя от присъствието/отсъствието на кожни петна наречени „кафе с мляко“ (café-au-lait, CAL), лунички, от типа на тумора, който се развива по периферните нерви (неврофибром или шваном), от специфичното засягане на очите при всяка форма, както и по други критерии [Williams *et al.*, 2009]. NF предразполагащи към множество тумори на периферната нервна система (ПНС) често се считат за класически тумор-супресорни заболявания. Ранното разпознаване на тези специфични заболявания има за

цел навременна терапия и симптоматично лечение на усложненията, които се появяват [Huson, 2008].

Молекулярният механизъм на тези заболявания не е напълно изяснен, но през последните десетилетия на миналия век, съвременните молекулярно-генетични анализи показваха, че NF имат различни клинични и генетични характеристики [Yohay, 2006]. В последните години бяха дефинирани и подтиповете NF. Рикарди (Ricardi) първи осъзнава важността от ясното разграничаване на различните типове NF и предлага числена класификация въз основа на наличието/отсъствието на CAL, неврофиброми/шваноми и нодули на Lisch (Таблица 1), като тази класификация е основа за днешните признати класификационни и диагностични критерии разработени през 1988 година от Националния институт по здравеопазване (National Institute of Health, NIH) [NIH Consensus Development Conference, 1988; Sheela *et al.*, 1990].

**Таблица 1. Неврофиброматози по класификацията на Ricardi от 1982**  
[Ricardi, 1982]

<b>Неврофиброматоза тип 1</b>	<b>Von Recklinghausen</b>
<b>Неврофиброматоза тип 2</b>	<b>Билатерална акустична неврофиброматоза</b>
<b>Неврофиброматоза тип 3</b>	Смесена неврофиброматоза
<b>Неврофиброматоза тип 4</b>	Вариантна неврофиброматоза
<b>Неврофиброматоза тип 5</b>	<b>Сегментна неврофиброматоза</b>
<b>Неврофиброматоза тип 6</b>	Само CALs
<b>Неврофиброматоза тип 7</b>	С късно начало
Други	други

### 1.2.1. Неврофиброматоза тип 1

#### 1.2.1.1. Клинична картина

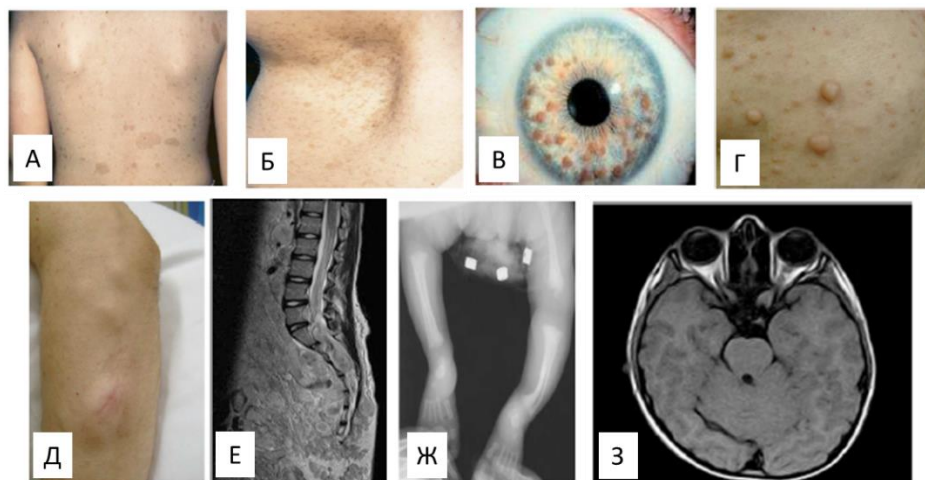
Неврофиброматоза тип 1 (NF1, MIM #162200) е хетерогенно наследствено заболяване характеризиращо се с клинични находки като промени в пигментацията на кожата, развитие на различен брой CAL, лунички, нодули на Lisch, оптични глиоми, специфични костни лезии и висок риск за развитие на злокачествени тумори [Williams *et al.*, 2009]. Наблюдава се вариабилност в клиниката от леки безсимптомни форми до много тежки прояви, които са животозастрашаващи.

Диагнозата NF1 се поставя при установяване на най-малко два от изброените клинични симптоми (NIH, 1988)[www.nih.gov]:

- шест или повече CAL петна с размери >1,5см след пубертета и >0,5см преди тази възраст
- два или повече кожни неврофиброми от различни видове или един плексиформен неврофибром (ПН)
- лунички в аксиларните или ингвиналните региони
- два или повече нодули на Lisch
- оптичен глиом
- дисплазия (sphenoid wing dysplasia (дисплазия на сфеноидна кост)) или изтъняване на кортекса на дългите кости
- първа степен на родство със засегнат от NF1 [NIH, 1998]

Cafe'-au-lait петна (CAL) се срещат при почти всички засегнати индивиди и често се наблюдават още при раждането, като броят им се увеличава по време на първите няколко години от живота (Фигура 1А). Луничките се появява при около 90% от пациентите, обикновено до 7-годишна възраст (г.в.)(Фигура 1Б). Lisch нодулите са безвредни ирисови хамартоми. Те се наблюдават още при раждането но могат да се открият при >90% от пациентите на възраст от 16 години и нагоре (Фигура 1В). Неврофиброми или плексиформен неврофибром са доброкачествени тумори на обвивката на периферните нерви, които са смес от Шванови клетки, фибробласти и мастоцити. При пациенти с NF1 Швановите клетки могат да са абнормни и да имат ангиогенни и инвазивни свойства при ПН [Sheela *et al.*, 1990]. Кожните неврофиброми се състоят от меки, месести доброкачествени туморни образувания по кожата, които не се свързват с повишен риск за развитие на злокачествена трансформация, те обаче често са голям козметичен проблем на повечето засегнати (Фигура 1Г) [Lott and Richardson, 1981; Jett and Friedman, 2010]. Плексиформени неврофиброми растат около нервите или около вътрешни нервни възли и могат да бъдат много големи по размери. Има два различни вида ПНи, дълбоко нодуларен неврофибром и дифузен ПН (Фигура 1 Д, Е). И двата вида могат да се превърнат в злокачествени тумори на периферната нервна обвивка (malignant peripheral nerve sheath tumors, MPNSTs) [Jett and Friedman, 2010]. Оптичен глиом е най-честият мозъчен тумор при деца с NF1. Приблизително 15% от пациентите преди 6 г.в. го развиват, но повечето от тях остават безсимптомни. Глиомите могат да възникнат навсякъде и да прогресират бавно (Фигура 13) [Shamji and Benoit 2007]. Глиоми на мозъчния ствол или малкия мозък при хора с NF1 могат да бъдат по-малко агресивни в сравнение с тези появяващи се при пациентите без NF1. Вторичен глиом на ЦНС възниква при 20% от случаите на NF1, които са имали оптичен глиом диагностициран в детска възраст [Ullrich *et al.*, 2007; Rosser and Packer, 2002]. Костни аномалии при NF1 включват псевдоартроза и костна дисплазия, както и

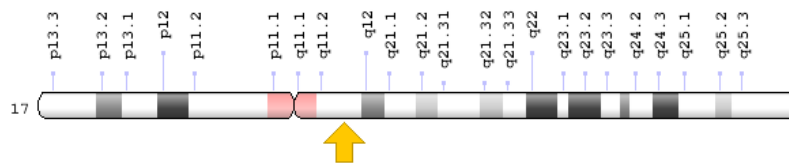
нисък ръст, сколиоза и остеопороза. Сколиозата е наблюдавана при 10% до 26% от засегнатите индивиди, докато дисплазия на дългите кости (тибия) се среща при 1% до 4% от децата с NF1 (Фигура 1Ж) [Jett and Friedman, 2010]. Невро-поведенчески аномалии: Неврологичните аномалии включват когнитивни дефицити и умствени увреждания. Макроцефалията е често срещана. Хидроцефалия или припадъци се наблюдават от време на време. Повечето хора с NF1 имат нормален интелект. В 30% от случаите на NF1 се наблюдават клинични симптоми от аутистичния спектър [Jett and Friedman, 2010]. Неидентифицирани светли обекти, НСО (Unidentified bright objects, UBO), които понякога се наричат "T2 хиперинтензни" или „фокални зони с интензивност на сигнала" при T2- ядрено-магнитен резонанс (ЯМР) на мозъка се наблюдават при най-малко 60% от децата с NF1 [Lopes *et al.*, 2008]. Злокачествени тумори на периферната нервна обвивка (MPNSTs) са най-често срещаните злокачествени неоплазми, свързани с NF1 до 10% от засегнатите хора. Пациенти с делеция на целия *NF1* ген, при които се наблюдават подкожни неврофиброми или доброкачествени ПНи имат по-висок риск да развият MPNSTs, в сравнение с NF1 пациенти при, които те не са налице. При 2-3% от хората с NF1 се развива дифузна полиневропатия, която може да бъде свързана с множество неврофиброми по нервните корени и висок риск от развитите на MPNSTs. Тези злокачествени образувания се появяват в много ранна възраст и имат по-лоша прогноза за оцеляване при хора с NF1. Високо диференцирани MPNST обикновено възникват при пациенти с NF1 на 20 или 30 г.в. [Evans *et al.*, 2002].



**Фигура 1. Типични признаци на NF1:** А) Café-au-lait петна; Б) Лунички; В) Нодули на Lisch; Г) Кожни неврофиброми; Д) Подкожни неврофиброми; Е) Плексиформени неврофиброми; Ж) Тибиална дисплазия; З) Оптичен глиом (вляво) [Ferner, 2010].

### 1.2.1.2. Генетична основа на заболяването и засегнат белтъчен продукт

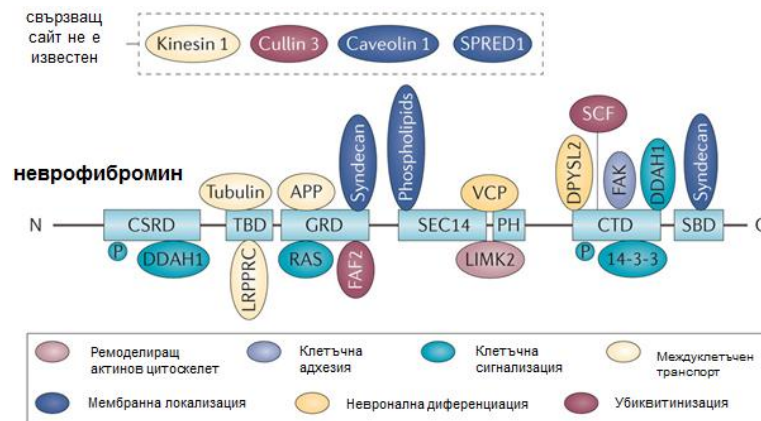
За първи път през 1882 година немският патолог Фридрих Даниел фон Реклингхаузен описва точната клинична и патологична характеристика на NF1, след което в негова чест този синдром е наречен синдром на Реклингхаузен (von Recklinghausen синдром) [Recklinghausen, 1882]. NF1 се причинява от мутации в *NF1* гена (MIM\* 613113), локализиран на дългото рамо на 17-та хромозома (17q12) (Фигура 2).



**Фигура 2. Локализация на NF1 гена на хромозома 17**  
[<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/NF1#location>].

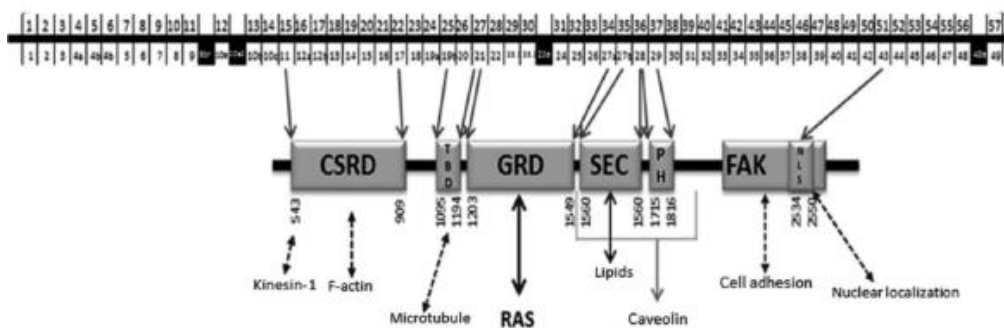
Генът *NF1* е тумор-супресорен ген и е един от най-големите в човешкия геном (58 екзона, 280kDa), кодира белтък наречен неврофибромин (neurofibromin). Най-честият транскрипт, който кодира гена изгражда белтъчен продукт съставен от 2818 аминокиселини [Abramowicz and Gos, 2014; DeClue *et al.*, 1991; Gutmann and Collins, 1993]. Той е най-разпространен в ендоплазматичния ретикулум на невроните, Швановите клетки и олигодендроцитите. Нивата му са важни за развитието, диференциацията и функцията на меланоцитите. Загубата на едно от копията на гена увеличава меланоцит-специфичната експресия, което води до нарушена пигментация на кожата [Deo *et al.*, 2013]. Неврофиброминът може да засегне контрола на диференциацията и функцията на костните клетки и по специално остеокластите и остеобластите [Abramowicz and Gos, 2014]. Неврофиброминът е негативен регулатор на Ras гуанозин трифосфат (Ras guanosine triphosphate, GTP) белтъците. Проучвания при гръбначни животни показват, че се експресира по време на органогенезата до средата от етапа на развитие на ембриона, докато във възрастния организъм се експресира предимно в невроналните мозъчни клетки, както и в Швановите клетки, астроцитите, олигодендроцитите и левкоцитите [Gutmann and Collins, 1993]. Различни биохимични проучвания са били използвани, за да се идентифицират други взаимодействия с белтъци различни от Ras. Те включват тубулин, кинезин-1, протеин киназа А (ПКА) и С (ПКС), синдекан, кавеолин и амилоид прекурсорен протеин (Фигура 3) [Ratner *et al.*,

2015]. Известно е, че неврофиброминът взаимодейства с тубулин, при което заедно съставят комплекс с ниска ГТФазна активност, което би повлияло Ras регулацията [Ratner *et al.*, 2015]. Различни региони на неврофибромина участват в тези белтък-белтъчни взаимодействия, но ролята им все още остава неизяснена.



**Фигура 3. Белтък-белтъчни взаимодействия на неврофибромин** [Ratner *et al.*, 2015].

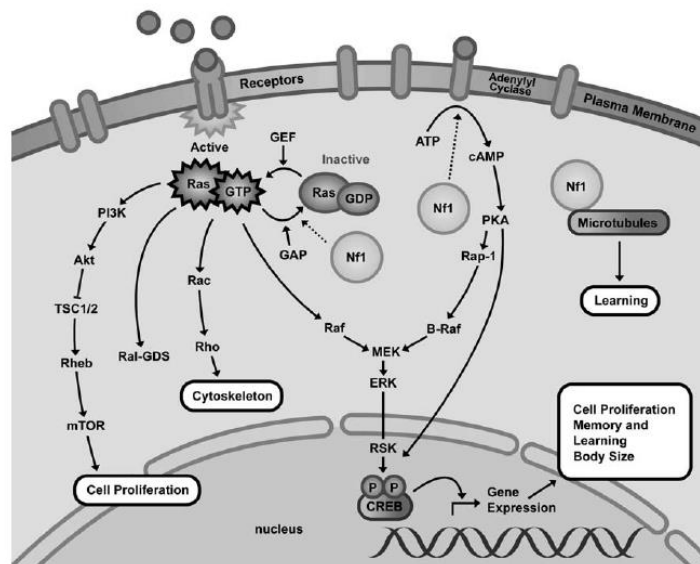
Известно е, че неврофиброминът е изграден от няколко функционални домени: цистеин/серин богат домен (cysteine/serine rich domain, CSRD), тубулин свързващ домен (tubulin binding domain, TBD), домен за свързване с RAS и гуанозин трифосфат (ГТФ) (GTPase-activating protein (GAP)-related domain, GRD или Ras/GAP домен), липид свързващ домен (SEC14-PH), домен отговорен за свързване с кинази (focal adhesion kinase-interacting domain, FAK) и последователност подпомагаща транспорта на белтъка през ядрените пори (nuclear localization signals, NLS) (Фигура 4) [Williams *et al.*, 2009; Abramowicz & Gos, 2014; Trovó-Marqui & Tajara, 2006; Luo *et al.*, 2014].



**Фигура 4. Доменна организация на неврофибромин и кодиращите ги екзони от NF1 гена** [Williams *et al.*, 2009].

Проучвания при *Drosophila* разкриват ролята на неврофибромина при действието на цикличен Аденозин монофосфат (цАМФ), независимо от Ras-сигналния път. В Швановите клетки при липса на NF1 може да се индуцира количеството на цАМФ, ихибирайки ГТФазен протеин участващ в клетъчната адехзия и синаптогенеза (Фигура 5) [Kim *et al.*, 2001]. Други проучвания показват, че инхибирането на цАМФ/ГТФазния път чрез Rho-RAC и абнормната организация на цитоскелета са в основата на неврокогнитивните проблеми при пациенти с NF1 (Фигура 5) [Dasgupta *et al.*, 2003]. CSRD съдържа редица цАМФ-зависим ПКА свързващи места, което показва възможната роля в цАМФ сигнализация.

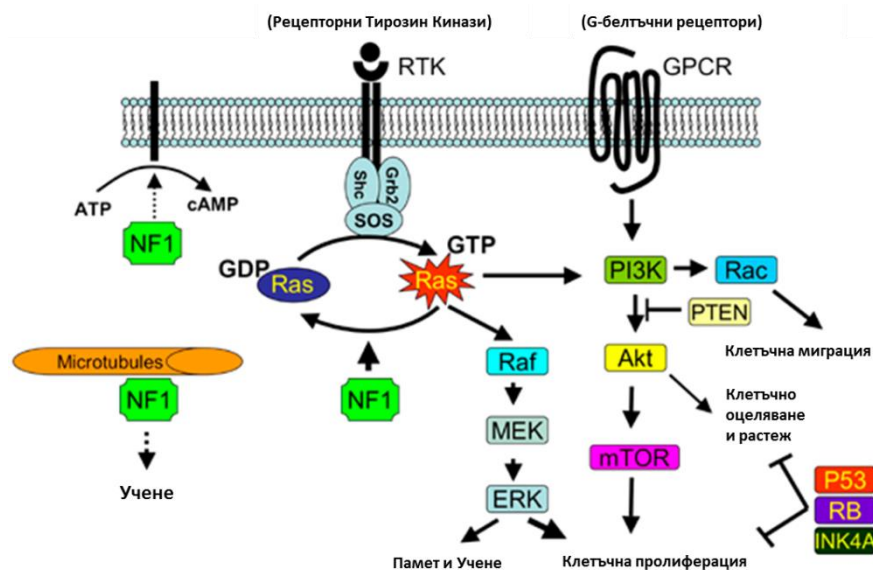
Един от най-важните домени на неврофибромина е GRD домена, кодиран от екзони 21 до 27 на *NF1* гена. Този домен е хомоложен на подобни домени в други GAP белтъци, например p120. Протеините имащи GAP домен поддържат RAS онкогена в неактивна ГДФ форма. *NF1* генът е важен негативен регулатор на RAS. Мутациите в гена нарушават структурата на кодирания белтък и го инактивират, повишават активността на RAS и значително ускоряват пролиферацията на определени клетки, като ги тласкат към туморогенеза. На фигура 5 е представена схема на сигнални пътища и тяхната връзка с белтъка неврофибромин.



**Фигура 5.** Сигнални пътища включващи участието на NF1 [Trovó-Marqui and Tajara, 2006].

Един от тези пътища е сигналят път на митоген-активирана протеин киназа (RAS/mitogen-activated protein kinase, MAPK), играещ ключова роля в клетъчната регулация.

RAS онкогенът е част от мултигенното семейство, което включва HRAS, NRAS и KRAS. RAS протеините са малки гуанозин-нуклеотид свързващи ГТФази, които функционират като ключов сигнален център в клетката. Те се активират посредством растежни фактори, свързващи се с рецепторни тирозин кинази (RTK), с G-протеинови двойки рецептори, цитокинови рецептори и извънклетъчни рецептори. Активирането на рецепторите задейства формиране на комплекс съдържащ адапторен белтък Grb2 и Ras фактор - Sos, които се свързват към мястото на активиране на тирозин киназия рецептор. Тогава Ras се превръща в активна форма на ГТФ, която след това се свързва и активира Raf киназа и фосфатидилинозитол 3-киназа (PI3K), която задейства последваща каскада от кинази водещи до активирането на MAPK и PI3K сигналните пътища (Фигура 6).



**Фигура 6.** MAPK и PI3K сигнални пътища с участието на NF1 [Le and Parada, 2007].

Някои от тези сигнали се предават в ядрото, като по този начин се регулира експресията на гени контролиращи клетъчната пролиферация, смърт, диференциация и миграция (Фигура 5, 6). Установено е, че мутации в Ras са свързани с различни ракови заболявания, които възникват в резултат на постоянното стимулиране на тези сигнални каскади от Raf-MAPK и/или PI3K пътищата, които водят до неконтролирана клетъчна

пролиферация и избягване от апоптоза [Trovó-Marqui and Tajara, 2006; Le and Parada, 2007].

GAP-протеин ускорява хидролизата на p21ras–ГТФ до p21ras–ГДФ, като го превръща от активна в неактивна форма. Ras протеините са ковалентно свързани към плазмената мембрана чрез фарнезилните групи на гуаниновите нуклеотиди и както беше споменато по-горе се превръщат от активна (ГТФ) в неактивна (ГДФ) форма. Те имат ниска ГТФазна активност, която е увеличена 10 пъти с помоща на различни GAP протеини, като p120-GAP и неврофибромин. Неврофиброминът с неговия GRD домен взаимодейства директно с Ras и по този начин увеличава нивата на ГТФ хидролиза и функционира като тумор-супресор, който намалява активността на p21ras. От друга страна обратният път води до реактивиране на p21ras чрез превръщането на ГДФ в ГТФ. По време на формирането на p21ras-NF1 комплекса, активираният p21ras се свързва с централния каталитичен домен на NF1 посредством специфични региони на p21ras и аргининов пръстен на NF1, което оказва влияние върху GAP-стимулираната хидролиза на ГТФ. Аргининовият пръстен неутрализира негативните промени върху ГТФ по време на фосфорилирането. В активна форма p21ras взаимодейства с Raf серин/треонин киназа, която на свой ред фосфорилира и активира друга киназа наречена MAP киназа/ERK киназа (MEK), която активира член от семейството на извънклетъчните сигнални регулаторни кинази (ERK) чрез фосфорилиране на треонинови и тирозинови остатъци. Веднъж активирана ERK, фосфорилира различни таргетни молекули, включително други кинази, като рибозомна S6 киназа (RSK) и транскрипционни фактори като цАМФ, отговорен за свързването на различни елементи (cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element-binding protein, CREB), предаващи сигнали за контрол на експресията на гени включени в клетъчния цикъл, апоптозата, клетъчната диференциация и миграция. Онкогенните мутации в RAS гените и намаления или липсващ неврофибромин благоприятстват активния статус на p21ras, който непрекъснато стимулира Raf–MEK–ERK или MAPK сигналната каскада, която води до клетъчна пролиферация. Загубата на неврофибромин корелира с високи нива на p21ras–ГТФ при различни типове тумори (Фигура 5) [Trovó-Marqui and Tajara, 2006].

### 1.2.1.3. Диагностика на заболяването

С помоща на ЯМР е възможно да се оцени размера и степента на ПНи, както и растежа им с времето [Hirbe and Gutmann 2014 ]. ЯМР се използва и за

охарактеризиране на мозъчни тумори, структурни аномалии на мозъка, както и при симптоми на цереброваскуларно заболяване при хора с NF1 [Lin *et al.*, 2011]. Магнитно-резонансната ангиография е важна при оценка на NF1 васкулопатия [D'Arco *et al.*, 2014]. Конвенционални радиографски изследвания могат да покажат скелетните аномалии, които се появяват при хора с NF1 [Patel and Stacy, 2012], но е възможно да се наложи компютърно томографско (КТ) изобразяване или триизмерна КТ, когато се планира хирургично лечение на костни лезии. Позитронно-емисионната томография (ПЕТ) се използва за разграничаване на доброкачествени и злокачествени MPNS [Hirbe and Gutmann 2014], но окончателната диференциация може да се направи само чрез хистологично изследване на тумора.

Клиничната значимост на така наречените НСО, визуализирани с ЯМР на мозъка при повече от 60% от децата с NF1, е несигурна [Sabol *et al.*, 2011]. Тези T2-хиперинтензни лезии, могат да се появят в оптичния тракт, базалните ганглии, мозъчния ствол, малкия мозък или кортекса и обикновено не показват данни за масов ефект. НСО показват признаци на абнормна структура на миелина и съответстват патологично със зони на спонгиформна миелинопатия. Те могат да изчезнат с възрастта и са по-редки при възрастни, отколкото при деца с NF1 [Payne *et al.*, 2014]. Няма данни, че наличието на НСО се свързва с появата на припадъци при деца с NF1 [Hsieh *et al.*, 2011]. В някои изследвания се предполага, че наличието, броя, обема, местоположението или изчезването на НСО във времето, корелира с умствените увреждания при деца с NF1, но констатациите не са последователни в отделните проучвания [Payne *et al.*, 2014].

#### 1.2.1.4. Диференциална диагностика

NF1 е наследствено, автозомно доминантно заболяване. Рискът за предаване на мутантния алел в потомството е 50%. Честотата на заболяването е 1:3000 индивиди, което го прави едно от най-честите наследствени заболявания. При половината от засегнатите индивиди се откриват *de novo* мутации. Мутациите са изключително хетерогенни – *nonsense*, *missense*, *splice site* мутации (в 30% от случаите), делеции на отделни екзони или делеция на целия ген (в 4-5% от случаите), което води до по-тежка клиника на заболяването. Наблюдавани са и промени в броя на копията като дупликации и други структурни реаранжировки [Wimmer *et al.*, 2006; Sabbagh *et al.*, 2013; Valero *et al.*, 2011].

Молекулно-генетичната диагностика се базира основно на PCR-секвениране на целия ген като първа стъпка за търсене на точкови мутации и MLPA анализ като втора стъпка за откриване на големи делеции и дупликации. Молекулно-генетичният тест е показателен при пациенти с предполагаема диагноза NF1 в ранна детска възраст, които на този ранен етап от развитие на заболяването не покриват NIH критериите, защото при тях клиничните симптоми все още не са се проявили. Установено е, че с напредване на възрастта се появяват голяма част от характерните симптоми на заболяването [DeBella *et al.*, 2000]. Пациентите, отговарящи на критерия за фамилност се диагностицират в по-ранна детска възраст. На Фигура 7 е представена графика на поява на клиничните симптоми при NF1 [Ratner *et al.*, 2015].



**Фигура 7. Етапи от живота, в които се развиват типичните клинични симптоми на NF1 [Ratner *et al.*, 2015].**

Генетичното верифициране на диагнозата NF1 при деца с тежки мозъчни тумори е от съществено значение, за да може да бъде организиран бърз подход на лечение. Злокачествените MPNST са основната причина за смъртност при тежките случаи на пациенти с NF1 [Evans *et al.*, 2002].

NF1 трябва да се разграничава от другите форми на неврофиброматоза, от синдромите свързани със свръх растеж (*overgrowth*), както и от туморните образувания, които могат да бъдат объркани с неврофиброми и от състояния, при които се наблюдават промени в кожната пигментация. В Таблица 2 са описани редица заболявания свързани със сходна клиника на NF (Таблица 2) [Ferner and Gutmann, 2013].

Таблица 2. Диференциална диагностика на NF1 [Ferner and Gutmann, 2013]

<p><b><u>Алтернативни форми на NF1 и припокриващи се състояния</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Сегментна/мозаечна NF1</li> <li>● Неврофиброматоза тип 2 [Evans <i>et al.</i>, 1992] билатерални вестибуларни шваноми, краниален нерв, периферен спинален нерв, епендимома, глиома, ювенилна катаракта, CAL петна</li> <li>● Шваноматоза–INI-1 мутации, множество кожни, периферни нервни и спинални шваноми, без вестибуларни шваноми</li> <li>● Legius синдром</li> </ul> <p><b><u>Синдроми свързани със свръх растеж</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Klippel–Trenaunay–Weber синдром – кожни хемангиоми, хемихипертрофични вени</li> <li>● Proteus синдром – хиперостоза, хамартоматозен растеж, епидермални петна (epidermal nevi)</li> </ul> <p><b><u>Състояния със сходни кожни промени</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● McCune–Albright синдром – неправилни CAL, фиброзна дисплазия</li> <li>● LEOPARD синдром – множество лунички, хипертелоризъм, глухота, конгенитално сърдечно заболяване</li> </ul> <p><b><u>Състояния свързани с туморен растеж, които се бъркат с NF</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Множествена липома – автозомно доминантна, засягане на кости на ръцете и краката</li> <li>● Фиброматоза – множество мускулни, кожни, костни тумори и тумори по вътрешните органи</li> <li>● Множествена ендокринна неоплазия тип 2B – феохромоцитома, мукозна неврома, медуларен карцином на щитовидната жлеза, гастроинтестинална ганглионевроматоза, марфаноиден хабитус</li> <li>● Vannoy–Riley–Ruvacalba синдром – множество липоми, хемангиоми, макроцефалия, пигментирани петна по пениса</li> </ul> <p><b><u>Синдроми свързани с Mismatch репарация</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Хомозиготно състояние на един от гените свързан с наследствен неполипозен рак на дебелото черво – CAL, засегнати братя и сестри [Bandipalliam, 2005]</li> </ul>
---

### 1.2.1.5. Терапия на заболяването

При проучвания на различни лекарствени препарати таргетен е RAS пътят. Миши модели на ювенилна миеломоноцитна левкемия, оптичен глиом, ПН и MPNSTs се използват в предклиничните проучвания. Открива се, че мулти-рецепторният тирозин киназен инхибитор Imatinib или инхибитори на MEK могат да намалят ПНи при миши модели [Ratner *et al.*, 2015]. Ефектът на Rapamycin и Imatinib върху растежа на ПНи при NF1 е обект на проучвания и при хора в САЩ [Huson, 2008]. При проучване с Imatinib се наблюдава, че 6 от 36 пациенти, които са деца с малки ПНи, отговарят на лечението, таргетната киназа при тези пациенти обаче все още не е известна [Ratner *et al.*, 2015]. Във фаза 1 от клиничните проучвания на MEK инхибитора Selumetinib (представен през 2014 на среща на American Society of Clinical Oncology), 11 от 18 пациента с ПНи, някои по-големи от килограм, показват намаляване в размера  $\geq 20\%$  в отговор на терапията. Тези проучвания показват не само значението от използването на миши модели за клинични проучвания, но и наблягат на откритието, че доброкачествени тумори могат да отговарят на терапия с едно лекарство до 3 години без да показват резистентност към него [Ratner *et al.*, 2015].

При миши модели с нарушената функция на NF1, се наблюдава, че тя е свързана с увеличена RAS активност и повишено инхибиране на гамааминобутиринова киселинна. Било е наблюдавано и намаляване на RAS активността от Ловастатин чрез инхибиране на p21RAS/митоген-активирана протеин киназна активност. За момента се провеждат допълнителни клинични изпитвания.

За MPNSTs се препоръчва хирургично отстраняване. Известно е, че mTOR1 инхибиторът Rapamycin в комбинация с агенти намаляващи оксидативния стрес намаляват MPNSTs. Установено е, че MPNSTs при пациенти с NF1 са резистентни към химио- и радиотерапия. Проучванията показват, че няма ефект от този вид терапия и се наблюдава по-лоша прогноза при пациентите с NF1, отколкото при спорадичните случаи на MPNST [Ratner *et al.*, 2015]. За бъдеща терапия на NF1 тумори се обсъждат и инхибитори на  $\beta$ -катетиновият път [Ratner *et al.*, 2015].

Важно е пациентите да бъдат насочени към специалисти за лечение при усложнения на очите, ЦНС и ПНС, сърдечно-съдовата система, гръбначния стълб или дългите кости. Възможно е хирургично отстраняване на деформиращите и неудобни кожни или подкожни неврофиброми. Лечението на оптичните глиоми обикновено не е необходимо, тъй като те са асимптоматични и клинично стабилни. За дистрофична сколиоза често се налага хирургично лечение, докато недистрофичната сколиоза може да бъде лекувана.

#### **1.2.1.6. Прогноза на заболяването**

Средната продължителност на живот при хора с NF1 е с около 8 години по-малка в сравнение с тази в общата популация. Много от индивидите с NF1 развиват само кожно засягане или Lisch нодули, но с напредване на възрастта могат да се проявят и някои от по-тежките симптоми на заболяването [Wilding *et al.*, 2012]. Вариабилността в клиничната симптоматика на NF1 предполага, че случайни събития също влияят върху фенотипните характеристики на засегнатите индивиди. Появата на второ мутационно събитие или загуба на хетерозиготност в NF1 локуса са наблюдавани при някои неврофиброми, MPNSTs, феохромоцитомы, астроцитомы, гастроинтестинални стромални тумори и други. Клиничната вариабилност при NF1 е комбинация от генетични, негенетични и случайни фактори. Сложността и многообразието на патогенетични варианти при NF1 прави генотип-фенотипните корелации трудни за интерпретация.

## 1.2.2. Неврофиброматоза тип 2

### 1.2.2.1. Клинична картина

Неврофиброматоза тип 2 (NF2, MIM #101000) се характеризира с развитие на билатерални вестибуларни шваномии (БВШ) асоциирани със загуба на слуха и нарушен баланс. Възможно е да се наблюдава развитие на шваномии по черепните и периферните нерви, менингиоми и епендимомии. Първият симптом най-често е катаракта. Началото на заболяването е между 18 и 24 г.в, но има множество случаи на развитие на NF2 и в ранна детска възраст. БВШи обикновено се развиват на 30 г.в. [Baser *et al.*, 2005; Ruggieri *et al.*, 2005].

Диагнозата NF2 се поставя при един от изброените клинични симптоми [NIH]:

- БВШи
- Първа степен със засегнат родственик и унилатерален вестибуларен шваном (УВШ) или две от изброените: менингиом, шваном, глиом, неврофибром, задно субкапсуларно помътняване на лещата \*
- УВШ и две от изброените: менингиом, шваном, глиом, неврофибром и задно субкапсуларно помътняване на лещата \*
- Множество менингиоми и УВШ или две от изброените: шваном, глиом, неврофибром, катаракта \*

\* две от изброените = два отделни тумора или катаракта

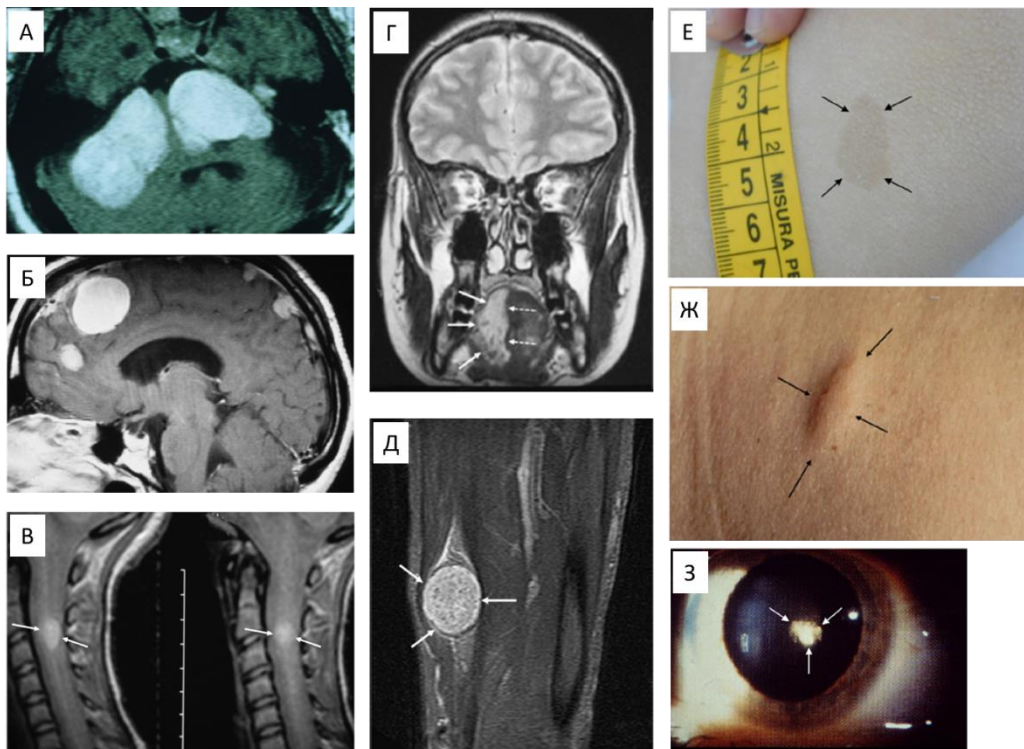
Вестибуларни шваномии (ВШ) Произлизат от вестибуларната част на VIII черепномозъчен нерв (ч.м.н.) във вътрешния слухов проход. При NF2 тези тумори могат да се представят с лобулирана структура на растеж, както при макроскопско така и при микроскопско изследване. Те са с тенденция за по-бърз растеж от спорадичните случаи, често съставени от обхванати нервни влакна на VIII ч.м.н.. Компресията на VII ч.м.н. във вътрешния слухов проход често причинява пареза на лицевия нерв. Първоначалните симптоми включват шум в ушите, загуба на слуха и дисфункция на равновесието. С течение на времето, ВШи се простират медиално в гръбначния мост и ако не се лекуват, причиняват компресия на мозъчния ствол и хидроцефалия (Фигура 8А). Шваномите могат да се развият и върху други краниални и периферни нерви, като сензорните нерви са по-често засегнати от моторните нерви. БВШи рядко растат едновременно и се различават по размер и структура на растеж. Слуховите нарушения рядко са симетрични [Ruggieri *et al.*, 2005].

Тумори по гръбначния мозък Най-малко две трети от лицата с NF2 развиват тези тумори, които най-често са опустошителни и трудни за лечение [Dow *et al.*, 2005; Slattery, 2015]. Най-често срещаните гръбначни тумори са шваномите, които обикновено произхождат от интравертебралния канал на дорзалния корен (Фигура 8Г). Интрамедуларните тумори на гръбначния мозък, като астроцитом и епендимом, се срещат при 5% до 33% от лицата с NF2 (Фигура 8В).

Менингиом Менингиомът е вторият най-често срещан интракраниален тумор при NF2, като приблизително половината от хората с NF2 го имат (Фигура 8Б) [Goutagny and Kalamarides, 2010]. Повечето са интракраниални, но възникват и спинални менингиоми. NF2 менингиомите се появяват по-рядко в черепната основа, отколкото супратенториално [Kros *et al.*, 2001]. Менингиомите в орбита могат да компресират оптичния нерв и да доведат до зрителна загуба. Тези в черепната основа могат да причинят черепна невропатия, компресия на мозъчния ствол и хидроцефалия. Менингиомът е характерен за пациентите с NF2, особено в детска възраст [Perry *et al.*, 2001].

Окулярно засягане Една трета от хората с NF2 имат намалена зрителна острота в едното или и двете очи. Катарактата е най-честата очна находка (Фигура 8З) [Feucht *et al.*, 2008]. Ювенилната катаракта е важен диагностичен белег, при наличието на който трябва да се обсъжда NF2. Ретинален хамартом и епиретинова мембрана се наблюдават при около една трета от засегнатите. Интракраниалните и интраорбиталните тумори могат да доведат до намалена зрителна острота и диплопия (двойно зрение).

Кожно засягане Първоначалната клинична изява при някои деца с NF2 включва наличието на CAL, но по-големи от тези при NF1, с неправилни очертания и по-пигментиран цвят (Фигура 8Е) или периферни нервни тумори (Фигура 8Ж), или и двете. При такива пациенти първоначалната диагноза е била NF1, след оперативно премахване и хистологично изследване става възможно различаването на неврофибром от шваном. Хистологично шваномите се различават по дискретни, добре очертани и леко повдигнати пигментирани кожни лезии [Ruggieri *et al.*, 2015].

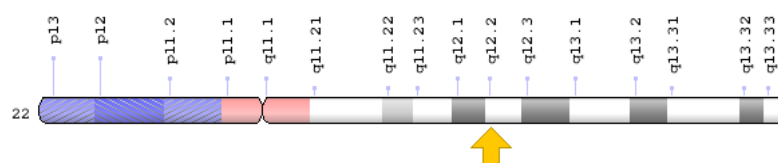


**Фигура 8. Клинична симптоматика при NF2:** А) Огромни билатерални вестибуларни шваномии; Б) Множество менингиоми; В) Епендимом; Г) Шваном на 12ти краниален нерв; Д) Шваном на периферен нерв; Е) CAL; Ж) NF2 плака-периферен нервен тумор; З) потъмняване на леща [Ruggieri *et al.*, 2015].

Моно- или полиневропатията, непряко свързана с туморните маси, е добре познат белег на NF2. Особено при детските невропатии често присъстват увреждания на VII или III ч.м.н. или парези на крак или ръка.

#### 1.2.2.2. Генетична основа на заболяването и засегнат белтъчен продукт

NF2 генът е изолиран през 1993 година, когато са били съобщени редица герминативни мутации при голяма серия за това време засегнати пациенти с NF2 [Rouleau *et al.*, 1993, Troffater *et al.*, 1993]. NF2 се причинява от мутации в NF2 гена (MIM \* 607379), който е тумор-супресорен ген. Той е локализиран на 22-ра хромозома (22q12.2) и включва 17 екзона.

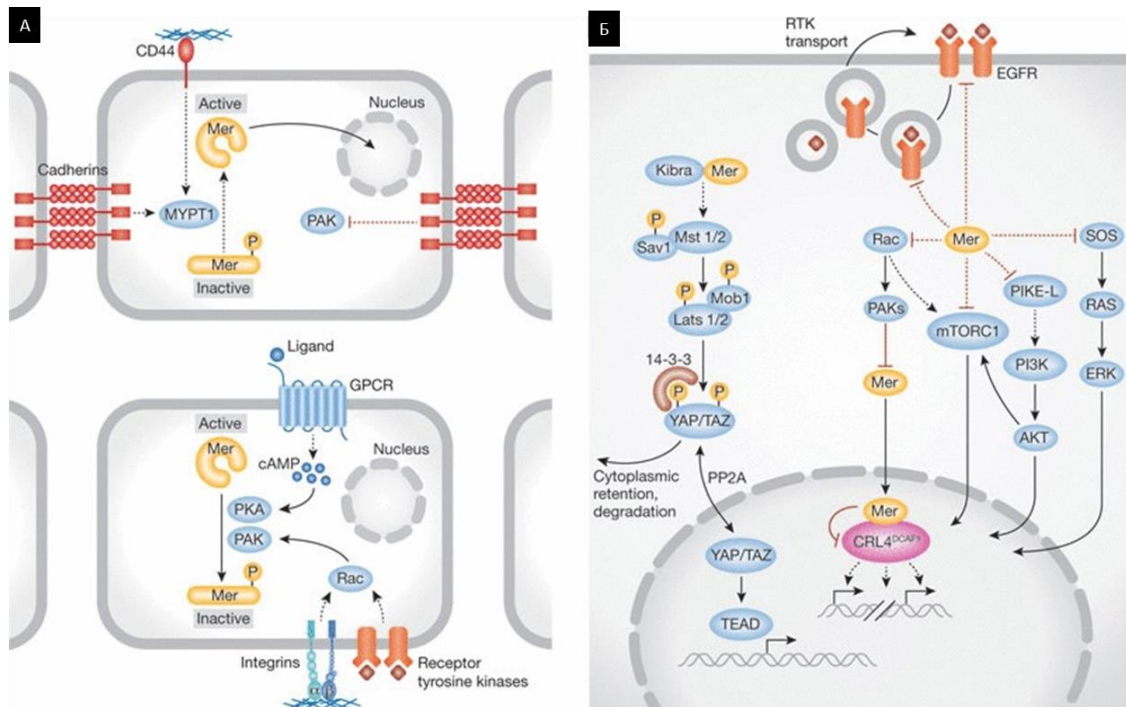


**Фигура 9. Локализация на NF2 гена на хромозома 22** [<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/NF2#location>].

Генът *NF2* кодира белтък наречен мерлин (merlin), който съдържа 595 аминокиселинни остатъка, и е от семейството на ezrin-radixin-moesin (ERM) белтъците (Фигура 9). Съдържа три функционални домена: amino терминален домен, хеликазен домен и  $\alpha$ -карбокси терминален домен. *NF2* кодони от 1 до 302 (екзони 1-9/10) съответстват на amino терминалния домен, кодони от 303 до 478 (екзони 10/11-13) са в състава на хеликазния домен и кодони от 479 до 595 (екзони 14-17) отговарят на  $\alpha$ -карбокси терминалния домен [Baser *et al.*, 2005; Cooper and Giancotti, 2014]. Мерлин свързва цитоскелета с клетъчната мембрана, като много проучвания демонстрират, че той действа като негативен регулатор на клетъчния растеж, на контакт-зависимо инхибиране на пролиферацията и функционира при адхезията между клетките, междумембранната сигнализация и актиновия цитоскелет, с което допринася за нормалната организация на цитоскелета. В допълнение този белтък моделира клетъчната подвижност, свързване, ремоделиране, разпространение и регулация на клетъчния растеж [Ruggieri *et al.*, 2015].

Генът *NF2* кодира две изоформи на мерлин. По-голямата, доминантна изоформа 1 (Мерлин-1) има удължена карбокситерминална опашка, кодирана от екзон 17. Изоформа 2 (Мерлин-2) от друга страна съдържа алтернативен сплайсван екзон 16, който завършва със стоп кодон, кодирайки 11 уникални остатъка последвани от 579 аминокиселини в сравнение с изоформа 1. В Мерлин-2 няма карбокситерминални остатъци необходими за вътрешно-молекулно свързване между N-терминалният FERM-домен и карбокси-терминалната опашка, което води до конститутивна отворена конформация. Последни проучвания демонстрират, че Мерлин-2 инхибира клетъчната пролиферация и намалява митогенното сигнализиране надолу по веригата в същата степен като Мерлин-1 [Cooper and Giancotti, 2014].

Мерлин регулира пролиферацията, действайки посредством различни кинази, включващи Hippo/Mst $\frac{1}{2}$  и Warts/Lats $\frac{1}{2}$  белтъци, които регулират комплексите Yorkie или Yap от една страна и от друга (RTK) RasGAP/Raf белтъците, които регулират MEK/ERK сигналният път и PI3K/AKT белтъците, които регулират mTOR сигналния път (mammalian target of rapamycin) (Фигура 10)[Curto and Clatchey, 2008; Li *et al.*, 2012].

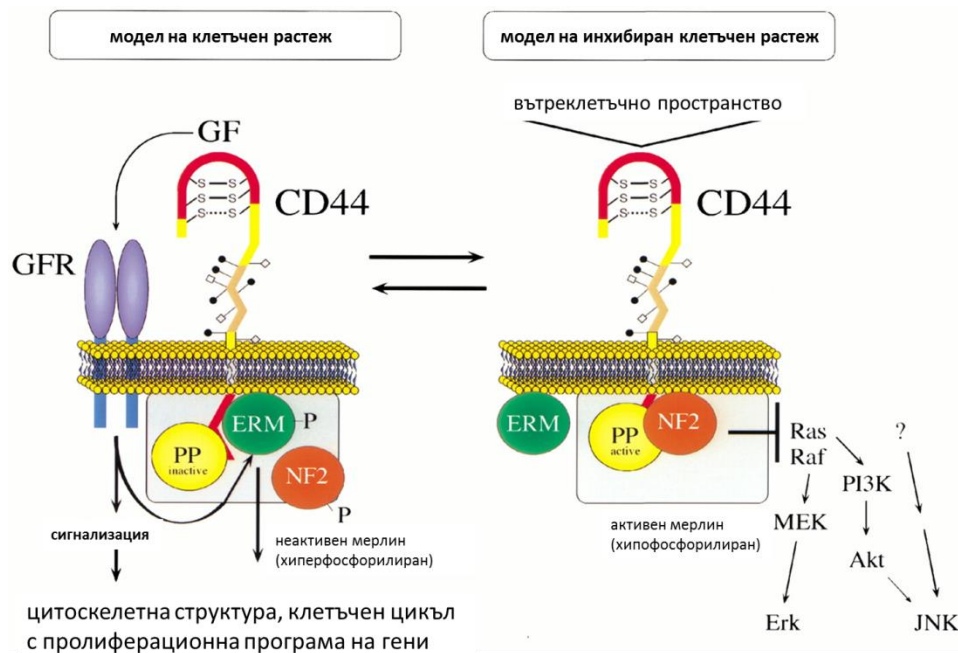


Фигура 10. Клетъчна сигнализация с участието на мерлин [Li *et al.*, 2012].

Въпреки общото действие на Ras/MEK/ERK и PI3K/AKT/mTOR сигналните пътища, мерлин не се намесва в неврологична симптоматика, свързана с процесите на учене и с паметта, както се наблюдава при неврофибромина, когато е засегнат генът *NF1*, а повлиява развитието на тумори и тяхната прогресия [Curto and Clatchey, 2008].

В химери от *Drosophila* е установено, че клетки, които не притежават функционален мерлин хиперпролиферират в сравнение със съседните клетки, които имат запазена функция на мерлин. Мишки с хомозиготна мутация в *NF2*, насочени към нервния гребен (от англ.език „neural crest“ - ембрионален ектодермален клетъчен слой от който се развиват разнообразни клетъчни линии, включващи меланоцити, хранопроводен хрущял и кости, гладки мускули, периферни неврони и глия) и Швановите клетки развиват шваноми, катаракта и костна метаплазия, докато хетерозиготни герминативни мутации в *NF2* мишки, развиват различни агресивни злокачествени заболявания нетипични за *NF2* пациентите. Тези данни показват, че мерлин е туморен и метастатичен супресор [Morrison *et al.*, 2001]. N- и C-терминалните краища на езрин, радиксин и мерлин могат да взаимодействат един с друг. При ERM белтъците, вътрешномолекулното N-терминално свързване към C-края, влияе отрицателно върху взаимодействието с други протеини. Доказано е, че междумолекулното взаимодействие между N- и C- краищата води до олигомеризация между ERM протеините и мерлин, като тези взаимодействия се контролират от

фосфорилиране, включително и при мерлин. Използвайки индуцируем промотор за повлияване експресията на мерлин в Шваномна клетъчна линия от плъх, е било открито, че мерлин играе важна роля в инхибирането на клетъчния растеж. В нормалните клетки той се активира и блокира пролиферацията. Функцията му на инхибиране на растежа е свързана с дефосфорилиране и зависи от взаимодействието с конкретен домен на цитоплазмената опашка на CD44 (Фигура 11). В логаритмично растящи клетъчни култури с ниска плътност CD44 сглобява комплекс от ERM белтъци, асоциирани с фосфорилиран мерлин. Екстрацелуларният CD44 лиганд HA и антитела, разпознаващи извънклетъчния домен на CD44 могат да индуцират бързото дефосфорилиране на мерлин и по този начин да спрат пролиферацията в тези култури, което имитира контактното инхибиране на растежа (Фигура 11) [Morrison *et al.*, 2001].



**Фигура 11. Модел на клетъчен растеж индуцирани от фосфорилиран и нефосфорилиран мерлин.** Модел на клетъчен растеж: При хиперфосфорилиран мерлин той е свързан с актин (неактивен мерлин – фосфорилиране в серин 518 увеличаващо междудоменното свързване на мерлин карбокси-терминалният домен и FERM-домена – затворена конформация) тогава MAPK път медиран от Rho и Rho-киназни протеини предизвиква взаимодействие между GFR и мембранни рецептори, MAPK пътят е активен и увеличава клетъчния растеж, оцеляване и подвижност. Модел на инхибиран клетъчен растеж: При хипофосфорилиран мерлин, в резултат на увеличено междумолекулно свързване, което е свързано с промяната на белтъчната молекула се прекъсва връзката с актин (активен мерлин – отворена конформация), MAPK път медиран от Rho или HA свързан с CD44, водят до инхибиране на MAPK пътят и намалена клетъчна пролиферация. [Morrison *et al.*, 2001]

### 1.2.2.3. Диагностика на заболяването

За поставяне на диагнозата NF2 е необходимо проследяване на цялата медицинска история включваща фокална неврологична симптоматика, кожни петна и

тумори, припадъци, главоболие, зрителни проблеми, проблеми с вестибуларния апарат, фамилна история. ЯМР на мозъка включва използването на гадолиний за идентифициране на ВШи. ЯМР на гръбначен мозък също допринася за правилното диагностициране на заболяването. Офталмологичните изследвания се използват за идентифициране на специфичните характерни очни лезии и ретинални хамартоми. Използва се и аудиология за диагностика и лечение на слуха и говора. Прилага се така нареченият слухов тест BAER-Brainstem auditory evoked response за дефекти свързани със загуба на слуха. Информацията от първоначалната диагноза ще помогне да се планира навременна хирургична интервенция. При деца с NF2, които са развили множество краниални, спинални тумори и тумори по нервите, в зависимост от тяхната локализация не винаги е възможно хирургично отстраняване. Въпреки това хирургичното отстраняване на ВШи остава стандартна терапия. Алтернативен метод за отстраняване на тумори е стереотактична радиационна терапия, но в много случаи увеличава риска от повторна поява, както и риска за по-бързо развитие на загуба на слуха [Ruggieri *et al.*, 2015]. В последните години се възлагат големи надежди в лечението и със самостоятелни терапевтици.

#### **1.2.2.4. Диференциална диагностика**

NF2 е автозомно доминантно заболяване, но се среща много по-рядко в сравнение с NF1. Честотата му е 1:33 000/40 000 индивида и в сравнение с NF1 е с много по-голям риск за живота още в ранна детска възраст [Baser *et al.*, 2005]. При диагноза NF2 в 50% от случаите мутациите са *de novo*, като 25-30% от тях са в мозаечен вариант. За мозайцизма се предполага, че се среща при индивиди с УВШ.

#### **Генотип-фенотипни корелации**

Герминативни мутации възникват обикновено в първите 15 екзона на гена и много по-рядко, почти никога в екзон 16 и 17. Най-често срещаните мутации са *nonsense* в CpG острови, но също така се наблюдават и големи мултиекзонни делеции и делеции на целия ген. Съществува относително строга генотип-фенотипна корелация в зависимост от типа и позицията на NF2 мутацията [Baser *et al.*, 2005; Selvanathan *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2011; Evans *et al.*, 1998; Hexter *et al.*, 2015]. При пациенти носители на мутации водещи до скъсен белтък (*nonsense* и *frameshift*) се наблюдава по-ранно начало в клиничната симптоматика, по-голям брой менигиоми, спинални тумори и смъртност в ранна възраст. Мутации в екзони 1 и 14/15 са свързани с по-лека клиника.

*Splice site* мутациите се свързват с по-лека клиника в сравнение с мутациите водещи до скъсен белтък [Evans *et al.*, 1998; Hexter *et al.*, 2015], а също така за *splice site* мутациите се знае, че тези в  $\alpha$ -карбокситерминалния домен са свързани с по-лека клиника в сравнение с тези в аминоксидтерминалния или хеликазния домен [Baser *et al.*, 2005]. Големи делеции и дупликации се нареждат след *missense* мутациите, които са свързани с по-лека клинична изява [Evans *et al.*, 1998; Hexter *et al.*, 2015].

Пенетрантността при NF2 е близо 100%. Почти всички пациенти носители на герминативен патогенен вариант, развиват заболяването на средна възраст. При заболяването се наблюдава и антиципация.

Молекулно-генетичните изследвания при диагноза NF2 включват секвениране на целия NF2 ген и MLPA анализ за търсене на големи делеции и дупликации. За потвърждаване или отхвърляне на диагнозата е необходимо да се изследва венозна кръв на пациент, който има фамилен обремененост (засегнат родител) или туморна ДНК от индивид, който не е фамилен обременен.

Ранното потвърждаване на диагнозата би дало възможност за подходящо наблюдение на засегнатия индивид, правилна терапия, поставяне на импланти при индивиди, при които се наблюдава загуба на слуха и лъчетерапия в зависимост от клиниката. При случаите с ВШи лечението е предимно хирургическо.

#### 1.2.2.5. Терапия на заболяването

Различни проучвания включващи стратегии с химиотерапевтици са фокусирани върху ефекта на каскадите, повлияни от липсата на активен и функционален мерлин. Такива са антагонисти на Her1-2 членовете на ErbB семейството на тирозин киназните рецептори (като Lapatinib), с които се наблюдава регресия на ВШи и подобрене в слуха [Karajannis *et al.*, 2012]. С инхибитори на mTOR пътя – Everolimus, за момента не се наблюдават успехи при терапия на шваноми [Karajannis *et al.*, 2014]. При използването на инхибитори на IGF1 рецептор/PDGF/Akt/MEK (Imatinib и Nilotinib), с Imatinib се установява стабилизиране на състоянието, но след 4 месеца се наблюдават странични ефекти [Lim and deSouza, 2013]. Моноклоналните антитела, анти-VEGFA (Anti-Vascular Endothelial Growth Factor антитела) (Bevacizumab/Avastin), действат като се свързват директно към растежния фактор и потискат васкулизацията на тумора (доза от 5mg/kg/2 седмици). За момента тези препарати показват най-обещаващи резултати поради стабилизиране на заболяването и подобрене в слуха [Plotkin *et al.*, 2009]. При терапия на 31 пациента подобрене в слуха имат 90% след първата година и 61% след

третата години, 88% от пациентите показват намаляване в размера на тумора 1 година след лечението и 54% три години след това [Plotkin *et al.*, 2009].

#### 1.2.2.6. Прогноза на заболяването

В зависимост от клиничното протичане, тежестта на NF2 варира от умерен (Gardner тип) до силно изразен (Wishart тип) фенотип. В ранните етапи вида на фенотипа е трудно предсказуем. Тежките случаи (Wishart тип) се характеризират с ранно начало (<20 години) и наличие на множество други тумори в допълнение на БВШи. Туморният растеж в повечето случаи е по-бърз при тези пациенти, а анатомична му локализация и размери са свързани със значителна заболеваемост и смъртност. Общоприето е, че възрастта на начало на заболяването е единствения определящ фактор за риск от смъртност при NF2. Пациенти развиващи единичен тумор в ЦНС с бавна прогресия след 20 години се причисляват към фенотип тип Gardner [Walter *et al.*, 2009].

Продължителността на живот е значително по-ниска от тази в общата популация. Средната преживяемост от поставянето на диагнозата /до смъртта/ се приема, че е само 15 години. Освен стереотактичната радиохирургия към днешна дата, единственият познат начин за лечение е хирургичното екстирпирание на клинично проявените тумори. При веднъж поставена и потвърдена диагноза, е необходимо доживотно проследяване на пациента от мултидисциплинарен екип с пълни познания и добро разбиране на диагнозата NF2. Обикновено екипът включва невролози, неврохирурзи, отоневролози, офталмолози, радиолози, генетици, психолози и други специалисти, участващи в поставянето на диагнозата NF2 и лечението на заболяването. Целта на проследяването е да осигури на засегнатите индивиди оптимално индивидуално поведение за по-добро качество на живот. В специализираните клиники по неврофиброматоза, които сега съществуват в повечето европейски държави, се усъвършенстват микрохирургичните техники, като наличното модерно оборудване, води до значително намаляване на оперативната смъртност и следоперативната заболеваемост. Многообразието на туморите, тяхното различно разположение в нервната система (neraxis), големият вариетет в размерите изискват индивидуален подход в лечението на всеки пациент. Дългото проследяване на болелите /клинично и с невроизобразяващи изследвания/ от екип специалисти, дава възможност да се отчита нивото на нарастване на съществуващите тумори, както и откриване на нови формации в по-ранен етап. В зависимост от размера, разположението и нивото на

растеж трябва да се обсъди отстраняването на нарастващите тумори преди да се достигне до развитие на неврологична симптоматика.

При пациенти с идентифициран патогенен вариант в семейството и при тези, при които генетичната причина не може да бъде изяснена чрез молекулно-генетично изследване се препоръчва: ЯМР между десет и 12 г.в., като може да се отложи във времето в семействата, за които е известно, че заболяването е с късно начало [Evans *et al.*, 2005a]. ЯМР се провежда ежегодно до поне четвъртото десетилетие от живота. Въпреки че някои хора с NF2 нямат симптоми в ранните години, е възможно "мълчаливи" тумори да бъдат открити в хода на ЯМР изследване, когато се извърши в по-ранна възраст.

### 1.3. Комплекс туберозна склероза

Комплексът туберозна склероза (Tuberous sclerosis complex, TSC; TSC1 MIM#191100 и TSC2 MIM#191092) е мултисистемно заболяване характеризиращо се с образуване на хамартоми в различни части на тялото. Те могат да възникнат по кожата, в мозъка, бъбреците и други органи. Образованията обикновено са доброкачествени, но специфичната им поява, както и локализацията в тялото могат да доведат до развитие на тежки усложнения [Crino *et al.*, 2006; Curatolo *et al.*, 2008]. Туморите засягащи ЦНС са водеща причина за заболяемост и смъртност, а засягането на бъбреците е втората причина за преждевременна смъртност.

#### 1.3.1. Клинична картина

Синдромът е описан още през 1835 година от Rayer [Roach *et al.*, 1998] и по-късно от von Recklinghausen [Jozwiak *et al.*, 2000]. През 1880 година Bourneville описва синдрома при трима пациенти и тогава за първи път използва термина „туберозна склероза“, за да опише как е изглеждал мозък на момиче с хипертрофична склероза при аутопсия [Bourneville Dm, 1880]. Името на заболяването е дадено поради наличието на кортикални тубери открити в мозъка. Класическата клинична триада включваща епилепсия (80%), интелектуален дефицит (60%), както и ангиофиброми (75%), е описана за първи път от Vogt през 1908 година [Vogt, 1908]. Освен тази първоначално описана клиника са били приети и много други клинични изяви, които са включени към диагностичните критерии необходими за поставяне на диагноза TSC.

Диагностичните критерии са ревизирани през 1998 година и изискват наличието на два главни критерия или един главен и два второстепенни [Roach *et al.*, 1998; Jozwiak *et al.*, 2000; Curatolo *et al.*, 2008; Schwartz *et al.*, 2007; Roach and Sparagana, 2004]. През 2012 отново са ревизирани и към тях като критерий се добавя положителен резултат от молекулно-генетично изследване [Northrup and Krueger, 2013]. Диагностичните критерии са представени в Таблица 3.

**Таблица 3. Диагностични критерии за TSC [Northrup and Krueger, 2013]**

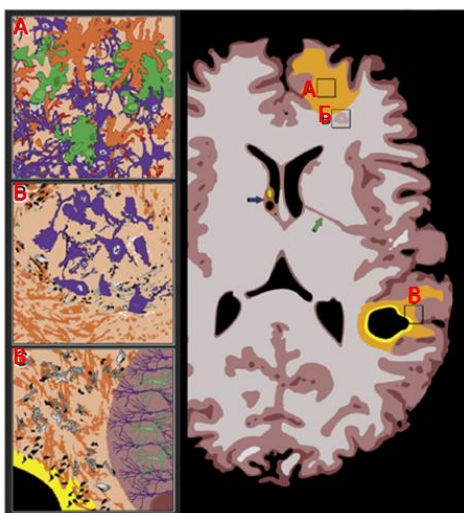
Главни характеристики (критерии)	Второстепенни характеристики (критерии)
Хипопигментни петна (3 или повече)(ХП)	Кожни лезии тип „конфети“
Лицеви ангиофиброми или плаки	Множество пръснати петна в зъбния емайл
Нетравматични унгални или периунгални фиброми	Гингивални фиброми
Шагренови петна	Ретинални ахроматични петна
Множествени ретинални хамартоми	Множество бъбречни кисти
Кортикална дисплазия (включва кортикални тубери и радиерно разположени миграционни линии в бяло мозъчно вещество)	Извънбъбречни хамартоми
Субелендимен нодул	
Субелендимен гигантоклетъчен астроцитом (СЕГА)	
Сърдечен рабдомиом (единичен или множество)	
Лимфангиоматоза (ЛАМ)	
Бъбречен ангиомиолипом ( $\geq 2$ )	

Поради изключителната хетерогенност на заболяването, пациентите отговарящи на клиничните критерии се диагностицират лесно, но е възможно асимптоматични и леки случаи да бъдат пропуснати, особено когато при пациентите е налице нормална интелигентност. Именно асимптоматичните случаи налагат необходимостта от ранна детекция и потвърждаване на поставената диагнозата, с цел навременни превантивни мерки. Въпреки високата вариабилност на TSC, типичната клиника се свързва най-често с развитието на хамартоми - лезии, които показват аномална тъканна диференциация. Тези туморни образувания рядко са злокачествени, което означава, че те не метастазират. Обикновено са локализирани на едно място и тъканта покрай тях е здрава. Съществуват и редки злокачествени форми на хамартомите известни като хамартобластоми. Локализацията на лезиите е отговорна за развитието на специфичните симптоми при TSC, които засягат различни органи, или за асимптоматичните случаи. Хистологични изследвания на хамартоми показват тъканна реминисценция на нервните клетки. Предполага се, че заболяването е резултат от невроналната клетъчна миграция и диференциация, по-специално на невроните, получени от невралната тръба. Например основната характеристика на

хипопигментните петна по кожата представлява локално нарушение в меланоцитите, които са получени от клетките на невралната тръба [Rott *et al.*, 1999; Andreas *et al.*, 2013]. На Фигура 12 са представени някои от клиничните кожни симптоми при TSC [Andreas *et al.*, 2013].



Миграцията на клетките на невралната тръба в различни тъкани е едно възможно обяснение за появата на лезии в почти всеки орган - ЦНС, бъбреци, кожа, сърце, бял дроб, ретина, кости, зъби, както и в скелетната мускулатура. В ПНС и тимуса все още не са описани лезии. На Фигура 13 е представен модел на тубер-подобни лезии засягащи мозъка [Feliciano *et al.*, 2013].

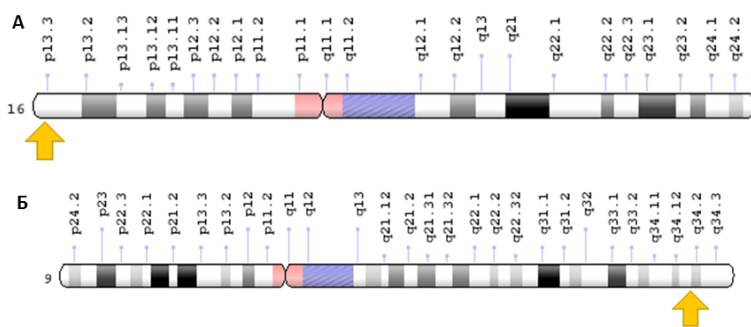


**Фигура 13. Модел на тубер-подобни лезии. Схематично представяне на някои от честите патологии свързани с TSC.**

А) Кортикални тубери характеризирани се с бицитомегални неврони (в лилаво), многоядрени гигантски клетки (в зелено) и глиози (в оранжево).  
 Б) Бяла хетеротопична материя в близост до кортикални тубери  
 В) Некротизация в центъра на тубера и цереброспинални кисти (периметърът им може да бъде калцифициран – отбелязано в ярко жълт цвят [Feliciano *et al.*, 2013].

### 1.3.2. Генетична основа на заболяването и засегнат белтъчен продукт

През 1987 година за първи път е била публикувана хромозомната локализация на ген свързан с TSC [Fryer *et al.*, 1987]. По-късно през 1993 е бил идентифициран и охарактеризиран *TSC2* генът, локализиран на 16-та хромозома (Фигура 14А) [European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium, 1993; Henske *et al.*, 1996], а през 1997 е идентифициран и генът *TSC1*, локализиран на 9-та хромозома (Фигура 14Б) [Slegtenhorst *et al.*, 1997].



**Фигура 14.** А) Локализация на *TSC2* гена на хромозома 16; Б) Локализация на *TSC1* гена на хромозома 9 [https://ghr.nlm.nih.gov/gene/TSC2#location; https://ghr.nlm.nih.gov/gene/TSC1#location].

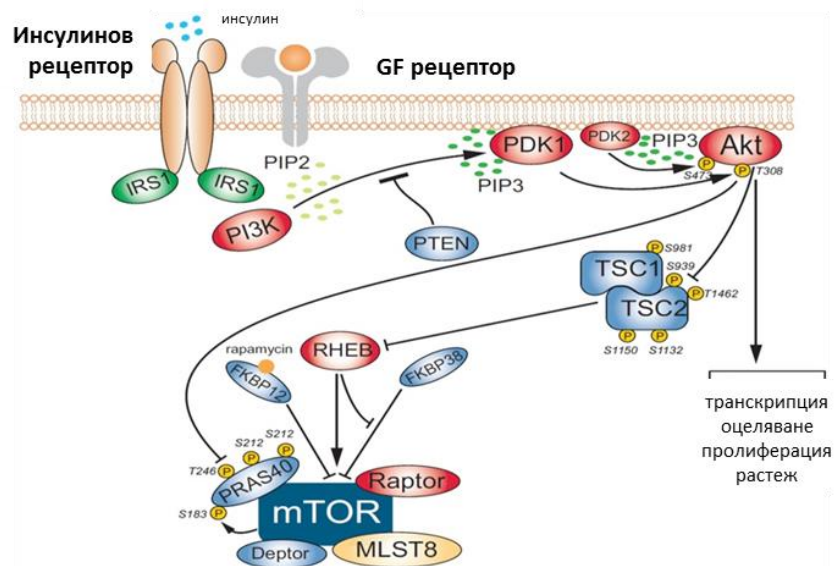
Известно е, че TSC се причинява от мутации в *TSC2* гена (MIM \*191092) включващ 42 екзона или *TSC1* гена (MIM #191100) включващ 23 екзона. В 69% от случаите се откриват патологични варианти в *TSC2* гена, а останалите 31% от пациентите са с патологичен вариант в *TSC1* гена. И двата гена са добре проучени и охарактеризирани тумор-супресорни гени.

*TSC2* генът кодира белтък наречен туберин (TSC2, 200 kDa), изграден от 1807 аминокиселини, докато *TSC1* генът кодира белтък наречен хамартин (TSC1, 130 kDa), изграден от 1164 аминокиселини [Au *et al.*, 2004].

Известно е, че белтъкът туберин е изграден от 7 домена: регион „левцинов цип“, два малки coiled-coil домени (CCD1, CCD2), малък регион с GAP (GAPD), два транскрипционни активиращи домена (TAD1, TAD2) и калмодулин-свързващо място (CaMD) [Au *et al.*, 2004]. Белтъкът хамартин е изграден от няколко домена: два coiled-coil домени (CCD), регион включващ ГТФ-Ras хомолог (Rho) и ERM регион [Au *et al.*, 2004]. Мутации в двата гена често причиняват съществени изменения на кодираните от тях протеини.

Основният клетъчен сигнален път, в който участват и двата белтъка е mTOR сигналният път [Rovey *et al.*, 1994]. Туберин е високо консервативен белтък в много видове (примати, гризачи, влечуги). Играе роля в контрола на клетъчния цикъл, така например, загубата на *TSC2* индуцира латентни клетки да навлязат в S фазата, и да

предотвратят навлизането на активните клетки в Go [Soucek *et al.*, 1997]. Друго доказателство, че туберин участва в контрола на клетъчния цикъл е неговата хомология с GAP домена на RAS-свързан GTPase активиращ протеин – Rap1GAPs. Както беше споменато по-горе (виж NF1), Ras семейството на GAPs са тумор-супресори, които регулират рецептори на растежни фактори. GTPase-те регулират митогенните трансдукционни сигнални пътища и са ключови участници в контролираната пролиферация на много типове клетки. Хомологията на TSC2 с това семейство на тумор-супресорни гени предполага, че той изпълнява същата функция [Wienecke *et al.*, 1995; Wienecke *et al.*, 1996]. На Фигура 15 е представен mTOR сигналният път, в който участват двата белтъка [Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. Protein Phosphorylation in Human Health, 2012].

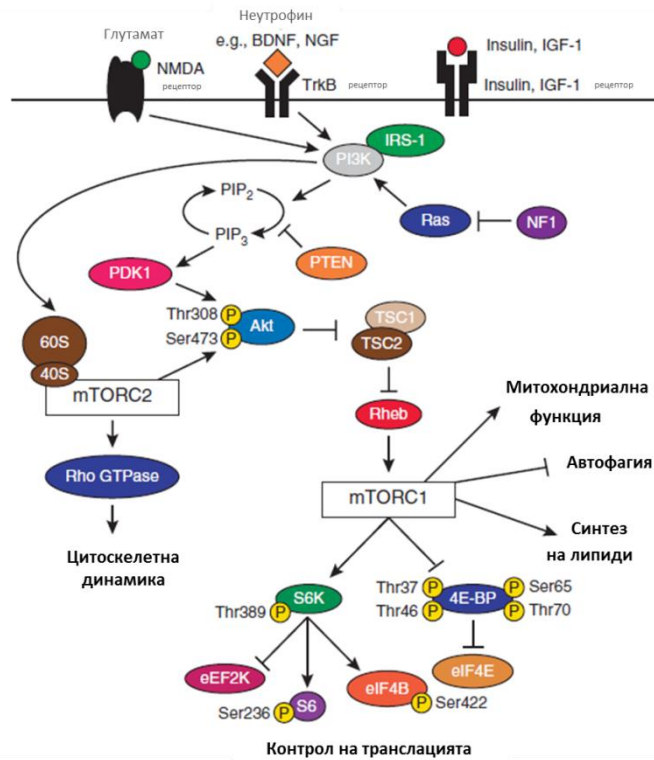


**Фигура 15. mTOR сигнален път с участието на TSC1 и TSC2**  
[Tchevkina and Komkov, 2012].

GAP активността на TSC2 е необходима, за да функционира комплексът, а TSC1 е необходим за стабилизиране на TSC2 и за предпазване на комплекса от убиквитин-медирано разграждане. При условия на растеж, TSC1-TSC2 комплексът е неактивен и по този начин позволява Rheb-GTP да активира mTORC [Tchevkina and Komelkov, 2012].

Общо погледнато TSC1-TSC2 комплексът функционира в няколко клетъчни сигнални пътя, включващи: път регулиращ растежа и транслацията (PI3K/ПКВ път),

път участващ в клетъчната адхезия/миграция/белтъчен транспорт (glycogen synthase kinase 3 [GSK3]/ $\beta$ -catenin/focal adhesion kinase [FAK]/Ras-related homolog [Rho] път), и път участващ в клетъчния растеж и пролиферация (MAPK път) (Фигура 16) [Au *et al.*, 2004].



Фигура 16. Сигнални пътища с участието на TSC1 и TSC2 [Au *et al.*, 2004].

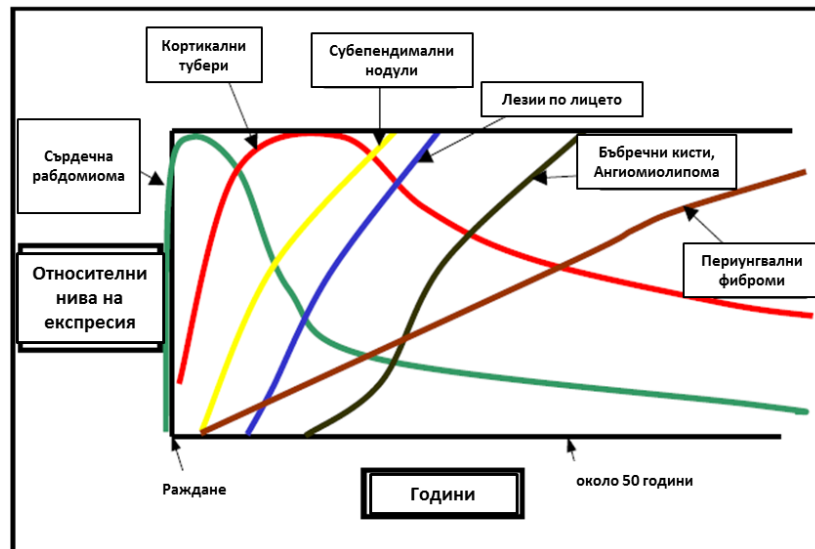
Комплексът е критичен негативен регулатор на сигналнизацията действаща след (downstream) PI3K/PKB път [Langkau *et al.*, 2002]. Липсата на функционално копие на един от двата гена *TSC2* или *TSC1* може да бъде причина за загуба на функцията на PI3K/PKB пътя. PKB активирана от PI3K директно фосфорилира TSC2, което го прави неактивен, това от своя страна повлиява активацията на Rheb, а от там и на mTOR комплекс 1 (mTORC1) [Costa-Mattioli and Monteggia, 2013]. Тъй като се намира по-надолу (downstream) в каскадата от PKB в PI3K сигналният път, TSC1-TSC2 е негативен регулатор на MAPK сигналния път. Известно е също, че ERK сигналнизацията (ERK-RSK, extracellular-signal-regulated kinase-p90 ribosomal protein S6 kinase) активира mTORC1 посредством множество фосфорилирания на TSC2 чрез ERK и таргетната рибозомна киназа S6, разположена надолу (downstream) в каскадата, като по този начин mTORC1 контролира невроналната белтъчна синтеза (Фигура 16).

Разположението на TSC1- TSC2 комплекса и действието му като обратим елемент на два ключови сигнални пътя: PI3K/PKB и MAPK/RSK, позволява участието му в контрола на клетъчния растеж посредством mTORC1 [Costa-Mattioli and Monteggia, 2013]. Комплексът действа като GAP посредством ГТФ-свързан Rheb, за да го превърне в неактивна ГДФ-свързана форма, където Rheb-ГТФ потенциално активира mTORC1 [Huang and Manning, 2008; Luo *et al.*, 2015]. Установено е, че комплексът действа преди (upstream) mTORC1 и е негов негативен регулатор (Фигура 16). При загуба на тумор-супресорната функция на комплекса се увеличава активността на mTORC1 медираната транслация, която е отговорна и за типичната фенотипна изява при TSC, свързана със симптоми от аутистичния спектър. Дефекти в регулацията на комплекса предизвикват туморогенеза [Costa-Mattioli and Monteggia, 2013].

Мутациите в двата гена са инактивиращи, водещи до намален или липсващ белтък, което нарушава и регулацията на mTORC1. Това предизвиква фенотипната изява, свързана с развитието на хамартоми в различни органи, включително и в мозъка. Повече от 90% от засегнатите пациенти показват невроанатомични аномалии като тубери, субependимален растеж и нарушения в бялото мозъчно вещество [Ridler *et al.*, 2001].

### 1.3.3. Диагностика на заболяването

Заболяването може да бъде диагностицирано чрез ултразвук в пренаталния или перинаталния период при наличие на сърдечен рабдомиом, тъй като той възниква в перинаталния период, но е възможно по-късно през живота да намалее или изчезне [Datta *et al.*, 2008; Giacoia, 1992]. При фетална ултрасонография могат да се видят освен сърдечните лезии и ранни мозъчни лезии. В останалите случаи TSC може да се диагностицира до първата година след раждането, тъй като при засегнатите деца с TSC, в голям процент от случаите се наблюдава епилепсия и типичните ХПа [Schwartz *et al.*, 2007; Staley *et al.*, 2011]. Различните кожни лезии обаче могат да възникнат в различен етап от живота и на различна възраст. Първите ангиофиброми могат да се видят до третата година след раждането, докато периунгвалните фиброми по-късно през живота (между 15 и 60 години). На Фигура 17 е представена графика изобразяваща времето на възникване на различните лезии [Kwiatkowski and Short, 1994].



**Фигура 17.** Графика представяща времето на възникване на различните лезии при TSC [Kwiatkowski and Short, 1994].

Децата диагностицирани с TSC, често показват широк спектър от прояви на ЦНС, сърдечно засягане, бъбречни кисти и кожни лезии. Засягането на ЦНС включва мозъчни лезии, широка гама от когнитивни, поведенчески, психични и неврологични симптоми (напр. епилепсия, инфантилни спазми, аутизъм и дефицит на вниманието/хиперактивност), както и тежки поведенчески проблеми (напр. агресия, гняв, хиперактивност, obsесивно поведение и умствено увреждане). При възрастните пациенти засягането е по-различно от това при децата. При тях се наблюдават по-малко на брой главни клинични критерии необходими за поставяне на диагноза TSC.

За да бъде поставена диагнозата TSC е необходимо да се установи степента на заболяването по следните оценки препоръчани и приети на „International Tuberous Sclerosis Consensus Conference“: медицинската история на пациента, скрининг за хипертензия, ЯМР на мозъка за наличие на тубери, субependимни нодули, миграционни дефекти, електроенцефалограма, оценка на психичното състояние, офталмологичен преглед, ехокардиограма в детска възраст (до 3 годишна), електрокардиограма, тестване на белодробната функция, ЯМР на корема, за наличие на ангиомиолиптома и бъбречни кисти, оценка на бъбречната функция чрез серумен тест за нивата на креатинин и генетична консултация [Northrup and Krueger, 2013].

При случаите на асимптоматични възрастни или млади родственици на засегнат пациент с TSC е целесъобразно да бъде направена оценка на риска за развитие на заболяването, за възможно най-ранна идентификация на патологичния вариант, с цел

навременни превантивни мерки и започване на правилно лечение. Оценката се базира и на молекулно-генетичен анализ, когато патогенният вариант в семейството е известен, а в случаите, когато той не е известен, е необходимо да се направят гореописаните оценки, включващи клинични изследвания, образна диагностика и молекулно-генетично изследване на двата гена. С нарастващата степен на разпознаване на възрастово-зависимия туморен фенотип се препоръчва провеждане на образна диагностика на определен интервал от време [Northrup and Krueger, 2013]. Това налага и необходимостта от молекулно-генетично изследване с цел потвърждаване на поставената клинична диагноза.

#### 1.3.4. Диференциална диагностика

TSC е автозомно доминантно наследствено заболяване, при което хетерозиготни патогенни варианти могат да бъдат идентифицирани в 75%-90% от засегнатите пациенти, които отговарят на клиничните диагностични критерии за TSC. Между 10 и 31% от случаите на TSC се дължат на мутации в *TSC1* гена, докато честота на мутации в *TSC2* гена е много по-висока около 69% [Au *et al.*, 2004]. Около две трети от засегнатите пациенти с TSC са резултат от *de novo* патологични варианти. Рискът за предаване на мутантния алел в потомството е 50%. Честотата на заболяването е 1:6000 новородени. При откриване на патогенен вариант в засегнатото семейство се препоръчва пренатална диагностика.

За да бъде потвърдена клиничната диагноза TSC е необходимо да се извърши молекулно-генетично изследване на двата гена. Молекулно-генетичната диагностика се базира основно на PCR-секвениране на екзоните на двата гена като първа стъпка за търсене на точкови мутации и MLPA анализ като втора стъпка за откриване на големи делеции и дупликации в един от двата гена.

Повече от 500 герминативни мутации са описани в *TSC2* гена включващи *missense*, *nonsense*, *frameshift* делеции/инсерции и *splice site* мутации [Au *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 1999; Dabora *et al.*, 2001; Sancak *et al.*, 2005]. Най-честите *TSC2* мутации са *missense* замнеите в кодони 611 и 1675, и 18-bp *in-frame* делеция в екзон 40. Заедно те представляват около 5% от известните *TSC2* мутации. От *TSC2* мутациите, 20% са *missense* или *nonsense*, докато при *TSC1* най-много от съобщаваните мутации са *nonsense* или *frameshift*, причиняващи прекратяване на белтъчния синтез [Jones *et al.*, 1999; Sancak *et al.*, 2005]. Известно е, че клиниката на пациентите с мутации в *TSC1*

гена е по-лека в сравнение с тази на пациентите с мутации в *TSC2* гена [Jones *et al.*, 1999; Dabora *et al.*, 2001; Astrinidis and Henske, 2005].

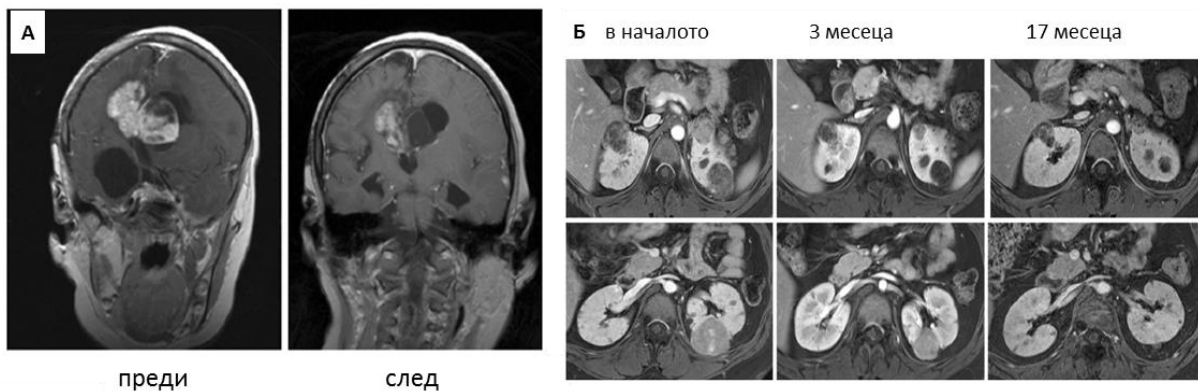
Генотип-неврокогнитивни фенотипни корелации са налице при специфични герминативни мутации в *TSC2* гена. *Missense* мутациите и малките *in-frame* делеции са асоциирани с висок коефициент на интелигентност и развитите (IQ/DQs). От значение обаче е локализацията на мутациите в гена, интересно е, че мутации водещи до преждевременно прекратяване на белтъчния синтез и малките *in-frame* мутации са асоциирани с видимо различен интелектуален профил, което показва, че типът мутация и локализацията ѝ в гена могат да бъдат свързани с различна неврокогнитивна проява [Goodman *et al.*, 1997; Jansen *et al.*, 2008; Jansen, Braams *et al.*, 2008]. Броят на туберите също е важен биомаркер определящ неврологичната тежест на заболяването и наличието на инфантилни спазми. По броя им може да се съди за степента и тежестта на засягане на главния мозък при пациенти с TSC [Goodman *et al.*, 1997]. При различни проучвания е установено, че голям процент от патологичните варианти в *TSC2* гена се свързват с по-тежка клиника, например при *de novo* мутациите се наблюдава по-висок риск към бъбречни образувания, по-висока честота на интелектуален дефицит, аутистични заболявания, ниско IQ и инфантилни спазми. Известно е, че някои *missense* мутации в *TSC2* гена като p.Arg905Gln, p.Ser1036Pro, p.Arg1200Trp, p.Gln1503Pro и p.Gln1579Pro са асоциирани с по-леки фенотипни изяви [Wentink *et al.*, 2012]. Бъбречните кисти възникват при патологични варианти в *TSC2* гена като: единична или няколко базови двойки инсерция, делеция или единичен нуклеотиден вариант (SNV). Поликистозното бъбречно заболяване в някои случаи може да бъде много тежко.

TSC е високо комплексно заболяване и диагностицирането му е трудно, тъй като по клинични характеристики и ултразвукови данни по време на феталната морфология може да се сбърка с друго заболяване наречено синдром на поликистозните бъбреци, дължащо се на мутации в *PKD1* гена [Consugar *et al.*, 2008].

### 1.3.5. Терапия на заболяването

Интересно е, че mTOR-инхибитори са в процес на проучване, с цел да се предотврати или забави неврокогнитивната прогресия при TSC. Информацията за генотип-фенотипните корелации, които могат да се получат от молекулно-генетичното изследване на двата гена биха подпомогнали клиницистите при избора на подходяща индивидуална терапия.

Ранното откриване на СЕГА позволява терапия с mTOR-инхибитори, за да се избегне необходимостта от неврохирургична интервенция, но не и в случаите, когато размерите на астроцитомата са животозастрашаващи [Krueger *et al.*, 2010]. За превенцията на епилептична енцефалопатия и намаляване на интелектуалния дефицит също е необходим навременен контрол на епилептичните пристъпи. Ефикасността на различните терапевтици при инфантилни спазми варира при различните пациенти. При проучвания е установено, че Вигабатрин контролира инфантилните спазми при 73% от децата с TSC [Camposano *et al.*, 2008]. При бъбречна ангиомиолипома (асимптоматична, нарастваща с размери >4см/дм или >3см, бързо развиваща се) терапията, която е най-ефективна и за момента е назначавана включва mTOR-инхибитори [Bissler *et al.*, 2013]. Еверолимус (Everolimus) и Сиролимул (Sirolimus) ефективно се използват като терапия при лечение на СЕГА и на бъбречен ангиомиолипом, а Еверолимус се използва и при лечение на епилептични пристъпи при пациенти с TSC [Curatolo *et al.*, 2016]. На Фигура 18 са представени ЯМРи на пациенти с TSC, с наличие на СЕГА и с бъбречен ангиомиолипом преди и след лечение с Еверолимус [Curatolo *et al.*, 2016].



**Фигура 18. А) ЯМР на пациент със СЕГА, преди и след лечение с Еверолимус; Б) ЯМР на пациент с билатерален бъбречен ангиомиолипом, преди и след лечение с Еверолимус [Curatolo *et al.*, 2016].**

Инхибитори на mTOR-пътя са показали добър ефект и при лечението на кожни ангиофиброми. При симптоматичен сърдечен рабдомиом се препоръчва хирургична интервенция или терапия с mTOR-инхибитори [Wataya-Kaneda *et al.*, 2016].

### 1.3.6. Прогноза на заболяването

При асимптоматични пациенти с TSC на възраст по-малка от 25 години се препоръчва ЯМР на една до три години за нововъзникнали СЕГА, докато при тези

пациенти с асимптоматични СЕГА диагностицирани в детството се препоръчват периодични прегледи в юношеството. При пациенти с бързорастящи СЕГА или СЕГА водещи до разширяване на мозъчните вентрикули се препоръчват по-чести ЯМР изследвания.

Скрининг за TSC свързано нервно-психично разстройство (ТСНР), трябва да се провежда най-малко веднъж годишно в специализирани клиники, където да се направи изчерпателна формална оценка за ТСНР през определен интервал от време в определен момент от годината. При пациенти с известна или предполагаема конвулсивна активност се препоръчва рутинна електроенцефалограма (ЕЕГ). ЯМР на корема за оценка на прогресията на ангиомиолипом и бъбречна кистозна болест се препоръчва на всеки една до три години през целия живот. За оценка на бъбречната функция се препоръчва измерване на скоростта на гломерулната филтрация и кръвното налягане поне веднъж годишно. Ехокардиограма се препоръчва на всяка една до три години при асимптоматични деца и деца със сърдечни рабдомиоми, докато не бъде документирана регресия. Клиничен скрининг за симптоми на ЛАМ (усилена диспнея и задух) се провежда при всяко клинично посещение, при жени на възраст над 18 години или такива, които съобщават за симптоми засягащи дихателната система. КТ с висока разделителна способност (HRCT) се препоръчва на всеки пет до десет години при асимптоматични пациенти с TSC с риск за развитие на ЛАМ (възрастни жени и възраст > 18 години), дори когато няма признаци на ЛАМ при първоначалните прегледи. Препоръчва се годишните прегледи за изследване на белодробните функции и HRCT да се провеждат на всеки две до три години при пациенти с белодробни кисти, открити с HRCT, а също и дерматологичен и стоматологичен преглед на всеки шест месеца, както и годишна офталмологична оценка при тези пациенти с предварително установени офталмологични лезии или симптоми за нарушение в зрението.

Оценката на рисковите роднини също е от изключително значение. Идентифицирането на засегнатите роднини дава възможност за мониторинг на ранно откриване на симптоми, свързани с TSC. Генетичното верифициране на TSC ще даде възможност за навременна и по-ранна терапия, с което ще се очаква и по-добра прогноза на заболяването.

Подходът за диагностика, лечение и проследяване на български пациенти с TSC е бил уточнен и приет след национална конференция на Българското Дружество по Неврология, Психиатрия и Психология на Детското Развитие [Консенсус за диагностика, лечение и проследяване на пациенти с TSC – комплекс в България, 2016].

## 1.4. Синдром на von Hippel-Lindau

### 1.4.1. Клинична картина

Синдромът на von Hippel-Lindau (VHL)(MIM #193300) е наследствено генетично заболяване с изява най-често в ранна възраст до 20та/30та годишнина, който спада към групата на Факоматозите. При него се наблюдава развитие на множество тумори и кисти в различни органи на човешкото тяло, които могат да бъдат доброкачествени и/или злокачествени. VHL се характеризира с развитие на хемангиобластоми (ХБ) в мозъка, костния мозък и ретината, бъбречни кисти и бъбречен клетъчен карцином (БКК) (хипернефрома), феохромоцитом (Фео) и параганглиом, панкреатични кисти и панкреатични невроендокринни тумори, тумори на ендолимфатичния сак, цистаденоми на надсеменника (Epididymal and broad ligament cystadenomas) [Maher *et al.*, 2011]. ХБте в 80% от случаите възникват в мозъка, 20% от случаите в костния мозък и много рядко по периферните нерви [Giannini *et al.*, 1998]. Прогресът на ХБ на ЦНС (цХБ) е асоцииран с мъжкия пол и с частични герминативни делеции [Lonser *et al.*, 2014]. При пациенти на възраст около 25 години в 70% от случаите се наблюдава доброкачествен ХБ на ретината (рХБ). Разположен е най-често в темпоралната периферия на ретината [Dollfus *et al.*, 2002]. БКК възникват в 70% от случаите при VHL пациенти около 60 годишната им възраст и са една от основните причини за смъртност. Общата преживяемост е свързана с размерите на тумора и възрастта на пациента [Kwon *et al.*, 2014]. Фео са локализирани в едната или двете надбъбречни жлези и могат да бъдат доброкачествени и злокачествени [Jimenez *et al.*, 2009]. Параганглиомите могат да се развият по симпатиковата ос в областта на корема или гръдния кош, обикновено тези тумори са нефункционални. Невроендокринните тумори на панкреаса се наблюдават в 5 до 17% от случаите на VHL [Maher *et al.*, 2011]. Туморите на ендолимфатичния сак се развиват в 10 до 16% от случаите на VHL. При някои пациенти се наблюдава унилатерална или билатерална загуба на слуха [Kim *et al.*, 2005]. Папиларният цистаденом представлява епителен тумор, който произхожда от надсеменника. Когато лезията е билатерална цистаденомът е асоцииран с VHL [Cox *et al.*, 2014].

VHL е разделен на два типа в зависимост от риска за развитите на Фео. Тази класификация на заболяването е представена в Таблица 4 [Cox *et al.*, 2014].

Таблица 4. Класификация на VHL [Cox *et al.*, 2014]

Тип на формация	VHL Тип 1 (без Фео)	VHL Тип 2 (с Фео)		
		Тип 2а	Тип 2б	Тип 2с
Фео	-	+	+	+
Ретинален ХБ	+	+	+	-
ХБ на ЦНС	+	+	+	-
БКК	+	-	+	-
Панкреатични тумори		+	+	-

**Легенда:** + наличие/ - отсъствие; Фео – феохромоцитом; ХБ – хемангиобластом; ЦНС – централна нервна система; БКК – Бъбречен клетъчен карцином

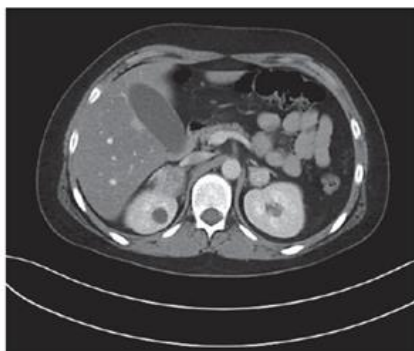
За поставяне на диагнозата VHL е нужно по клинични симптоми пациентът да попадне в една от изброените три групи:

(1) повече от един ХБ в ЦНС или ретината; (2) един ХБ в ЦНС или ретината, и висцерално усложнение (множество бъбречни, панкреатични или чернодробни кисти; Фео; бъбречен тумор) с изключение на бъбречни кисти и кисти на надсеменника, или (3) всяко едно от гореизброените с фамилна история.

Молекулно-генетичен анализ с цел търсене на мутации се препоръчва, когато е изпълнен един от изброените критерии:

(1) открити са класически VHL симптоми при конкретния пациент и/или при преки родственици; (2) идентифицирана е герминативна мутация в семейството; (3) фамилна история на БКК, ХБ, или Фео; (4) съмнение за VHL в случаи с билатерални тумори, мултицентрични тумори в един орган, или VHL-асоциирани тумори при млади пациенти (като пример: <50 години с ХБ или Фео или <30 години с БКК) [Ben-Skowronek and Kozaczuk, 2015].

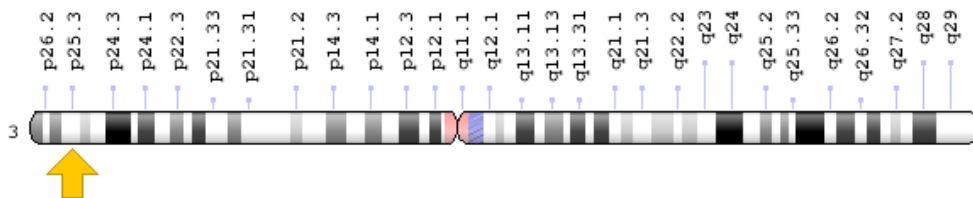
Според различни източници рискът за развитие на VHL тип 1 тумори е по-малък от 10%, докато рискът от развитие на Фео при VHL тип 2 е около 40-60%, като тип 2b е най-често срещан в Европейските държави. На Фигура 19 е представена снимка от КТ на пациент с Фео [Ben-Skowronek and Kozaczuk, 2015].



**Фигура 19. Фео в лява и дясна надбъбречна жлеза**  
[Ben-Skowronek and Kozaczuk, 2015].

### 1.4.2. Генетична основа на заболяването и засегнат белтъчен продукт

Заболяването VHL е описано за първи път през 1911 година от von Hippel и през 1926 година от Lindau [Von Hippel, 1911; Lindau, 1926]. VHL се дължи на мутации във *VHL* гена (MIM\*608537), който е локализиран на 3-та хромозома (3p25.3) (Фигура 20) [Latif *et al.*, 1993].



**Фигура 20.** Локализация на *VHL* гена на хромозома 3

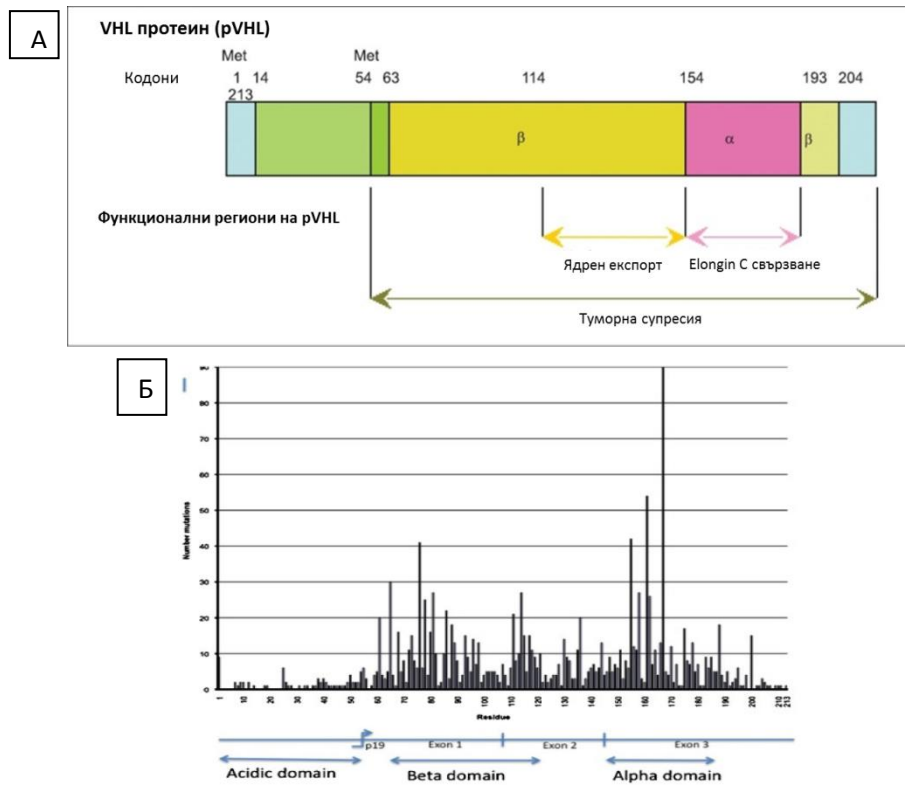
[<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/VHL#location>].

*VHL* е тумор-супресорен ген, който предпазва клетките от неконтролируем растеж и делене. Мутации в него водят до продукцията на увреден белтък или до неговата пълна липса, при което се нарушава правилната регулация на клетъчното делене и пътищата за оцеляване на клетката. Той е еволюционно консервативен сред червей, мухи, гризачи, зebraфиш и човек. Изграден е от 3 екзона и кодира два алтернативни белтъчни продукта: 30kDa белтък (p30, 213 аминокиселини, NM\_000551.2 [вариант 1 mRNA]) и 19kDa белтък (p19, 160 аминокиселини NM\_198156.1 [вариант 2 mRNA]), който се генерира чрез инициация на алтернативна транслация на вътрешен метионин в позиция 54 (Фигура 21A). Белтъчните продукти се експресират във феталните тъкани и тъканите на възрастния индивид. pVHL до голяма степен е цитоплазмен белтък, но се среща и в ядрото. Доменната структура на pVHL30 включва:

*N-терминален домен*, който е изграден от осем повторения на пет киселинни остатъка, наречен киселинен домен, той липсва при pVHL19. Отговорен е за свързването на метастатичен супресор Nm23H2, протеин регулиращ динамин-зависима ендоцитоза. Откритите соматични мутации при БКК, ХБ или Фео, и *VHL* патогенетичните герминативни мутации в този домен доказват функционалната роля на *VHL* гена.

*β-домен* (63-154 остатъци), който е отговорен за свързването на HIF-1α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) субединицата при 65-117 остатъци.

$\alpha$ -хеликазен домен (155-192 остатъци), който е отговорен за свързването на елонгин В и С, в елонгин ВС комплекс при 158-184 остатъци (Фигура 21А). Мутации във *VHL* гена водят до дефектно свързване с елонгин ВС и са асоциирани с VHL (Фигура 21Б) [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010].



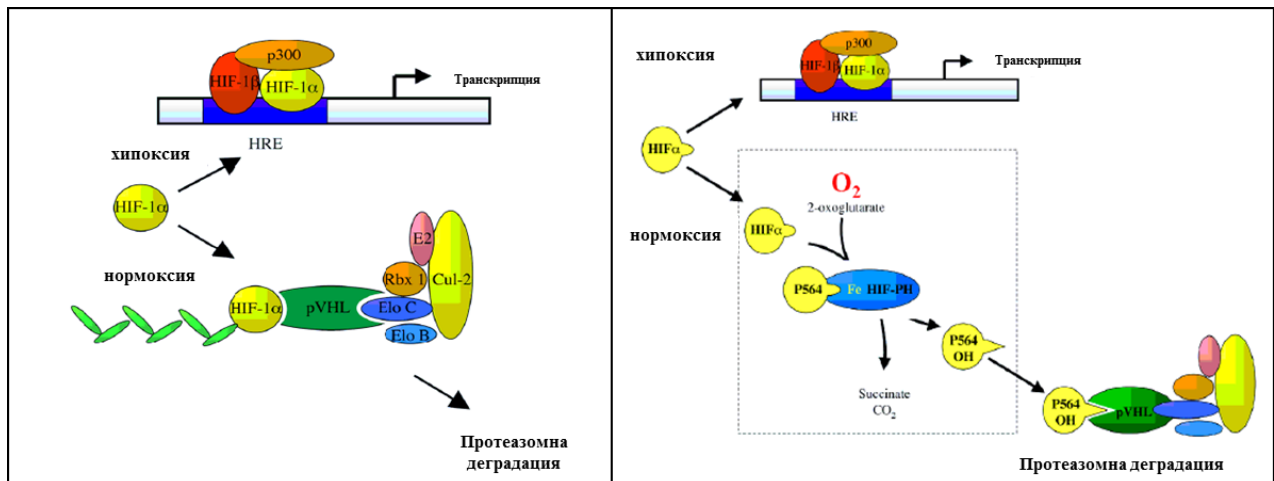
**Фигура 21. А) Организационен и Б) Мутационен спектър на VHL гена** [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010].

Основната функция на VHL белтъка (pVHL) е участието му в регулацията на транскрипцията, пост-транскрипционната генна експресия, апоптозата и в процеса на убиквитиниране [Kaelin, 2007]. Симптомите асоциирани с VHL и тумор на бъбреците се свързват с увеличена ангиогенеза и полицитемия, което предполага връзка между функцията на pVHL и адаптивния отговор към кислородния недостиг [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010].

При раковите, сърдечно-съдовите и хроничните обструктивни белодробни заболявания баланса на кислород в клетките е силно нарушен и клетките стават хипоксични (изпитват недостиг на кислород). Хипоксията е често срещана при различни видове солидни тумори, чиито клетки пролиферират бързо. При тях кръвоносните съдове често не функционират правилно и се наблюдава недостиг на кислород. Туморните клетки в тези хипоксични региони започват да се адаптират към

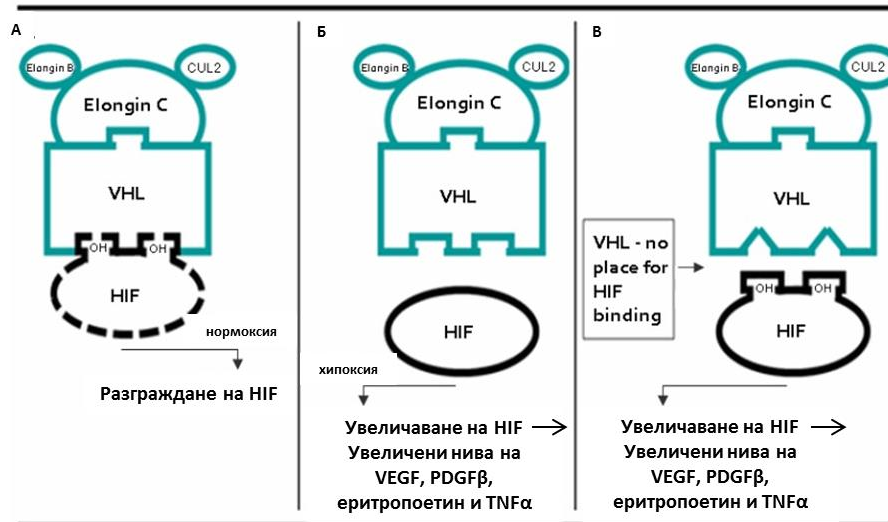
условията чрез активиране на различни пътища за оцеляване. Такива са активирането на HIF-1 $\alpha$  транскрипционен фактор, свърхекспресия на HIF таргетни гени, като VEGFA (Vascular endothelial growth factor A, васкуларен ендотелен фактор A) и по-рядко еритропоетин, гени участващи в клетъчната пролиферация, миграция и гени включени в глюкозния метаболизъм. При туморните клетки се наблюдава и увеличен глюкозен метаболизъм, тъй като хипоксичните клетки консумират повече глюкоза [Masoud and Li, 2015].

В хипоксична среда HIF-1 $\alpha$  е стабилен и образува хетеродимер с HIF-1 $\beta$ , след което се свързват с HRE елементи (cis-acting hypoxia response elements) на HIF таргетни гени като част от голям комплекс инициращ транскрипцията. При нормоксия HIF-1 $\alpha$  се разпознава от  $\beta$ -домена на pVHL. Нормално pVHL свързва и други белтъци като: елонгин C, който заедно с елонгин B и кулин-2, кодирани от TCEB2, CUL2 и Rbx1, участват във формирането на E3-убиквитиниращ лигазен комплекс (SCF), който маркира специфични белтъци таргетни за протеозомна деградация (Фигура 22, Фигура 23) [Mole *et al.*, 2001].



**Фигура 22.** E3 убиквитиниращ лигазен комплекс (SCF) включващ участието на pVHL [Mole *et al.*, 2001].

При нормоксия експресията на HIF-1 $\alpha$  се регулира негативно чрез протеазомно разграждане от E3-убиквитиниращ лигазен комплекс, включващ pVHL (Фигура 23A) [Kaelin, 2007].



**Фигура 23. Схема на pVHL и HIF**

А) Нормоксия в нормална клетка; HIF се свързва с pVHL.

Б) Хипоксия в нормална клетка; HIF не се свързва с pVHL.

В) Клетка с патогенно изменение във VHL гена; HIF не може да свърже pVHL

Освен хипоксичната среда на туморните клетки, генетични дефекти в гените участващи във формирането на убиквитинирация лигазен комплекс водят до тяхното развитие. VHL като заболяване е типичен пример. Носителството на герминативна мутация във VHL гена и формирането на тумори при VHL пациенти води до соматична загуба или инактивиране на дивия тип алел [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010].

#### 1.4.3. Диагностика на заболяването

Фео се диагностицира с биохимичен тест или образна диагностика (КТ или ЯМР) при пациенти на възраст между 10 и 40 години. Наличието на хормонално активни тумори може да бъде открито чрез изследване на нивата на катехоламин и метоксикатехоламин в плазма от 24-часова урина. Определянето на нивата на метоксикатехоламин в плазма се счита за най-полезен, макар и трудно достъпен, но предпочитан метод. Високата чувствителност на метода се дължи на факта, че катехоламините (адреналин и норадреналин) се секретират периодично от тумора [Ben-Skowronek and Kozaczuk, 2015]. Друга важна образна техника е ПЕТ, която може да окаже основна роля в диагностицирането на метастатични Фео поради способността специфично да визуализира малки тумори с множествена локализация [Еленкова, 2010].

#### 1.4.4. Диференциална диагностика

Честотата на VHL е 1:36 000 индивиди. Унаследяването е автозомно доминантно с 50% риск за предаване на мутантния алел в потомството. Около 80% от диагностицираните случаи на VHL имат засегнат родител, а 20% от случаите са резултат от *de novo* мутация. Ако патогенният вариант открит при изследвания пациент не се детектира в ДНК изолирана от венозна кръв, то откритото изменение е резултат от герминативен мозайцизъм или *de novo* мутация. В някои случаи липсата на фамиленост може да бъде обяснена с неправилно диагностицирани родственици от първо поколение, които са починали на ранна възраст. Наблюдава се висока пенетрантност на заболяването [Maher *et al.*, 1991]. Открити са над 500 патологични варианти, от които частични делеции на *VHL* гена, големи делеции и делеции на целият ген, които са около 10% от случаите, *in-frame делеции/инсерции* (6%), *frameshift* (13%), *nonsense* (11%), *missense* (52%) и *splice site* варианти (7%) [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010]. Единични нуклеотидни варианти (Single nucleotide polymorphisms - SNPs) са открити във всички кодиращи екзони на гена. За гореща точка се счита кодон 167 [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010].

Молекулно-генетичната диагностика на заболяването се базира основно на PCR-секвениране на екзоните на *VHL* гена като първа стъпка за търсене на точкови мутации и MLPA анализ като втора стъпка за откриване на големи делеции и дупликации. Диагнозата VHL се поставя след покриване на клиничните критерии или след откриване на хетерозиготен патологичен вариант във *VHL* гена чрез молекулно-генетично изследване. Откриването на такъв вариант потвърждава диагнозата дори при липса на клинични и радиографски находки.

VHL е високо комплексно заболяване и диагностицирането му е трудно, тъй като по клинични характеристики може да се сбърка с други невроендокринни синдроми като например Множествена ендокринна неоплазия (MEN). На Таблица 5 са описани редица заболявания свързани със сходна клиника на VHL [Binderup *et al.*, 2013].

Таблица 5. Диференциална диагностика на VHL [Binderup *et al.*, 2013]

Диференциална диагностика	Унаследяване/Ген	Коментар/Фенотип
<b>Белодробен карцином</b>		
Bitt-Hogg-Dubé синдром	АД: FLCN	Фиброфоликулома и триходискома на кожата, белодробни кисти, спонтанен пневмоторакс, бъбречни тумори (хромофор, онкоцити, clear cell, папилария и други)
Наследствена лейомиоматоза с бъбречен карцином	АД: FH	Множество лейомиоми на матка или подкожна тъкан, бъбречен карцином (папиларен тип 2)
Наследствен папиларен бъбречен карцином тип 1	АД: MET	Папиларен бъбречен карцином и аденоми
Наследствен бъбречен карцином с хромозомна транслокация	3;8 t (3;8)	
Lynch синдром	АД: MLH1, MSH2, MSH6, PMS2	Рак на дебело черво, ендометриален рак, рак в горния пикочен тракт, тънкото черво и стомаха
Комплекс туберозна склероза	АД: TSC1, TSC2	Виж 1.3
Cowden синдром	АД: PTEN	Макроцефалия, бенигнни тумори/хамартоми на кожата и мукозните мембрани, рак на гърдата, тироиден и ендометриален рак
Sickle cell anemia, хетерозиготна	АД: HBB	Медуларен бъбречен карцином
Beckwith-Wiedemann синдром	Спорадичен: IGF2, CDKN1C АД: CDKN1C (paternally imprinted)	”Overgrowth”, ембриологични дефекти на бъбреците, ушни гънки, неонатална хипогликемия, хепатобластом, невробластом, рабдомиосарком, <10%: тумори на Wilms
Наследствен параганглиом/феохромцитом (PGL4)	АД: SDHB	Множество параганглиоми и феохромоцитом, бъбречни тумори (БКК, папиларен тип II, eosinophile chromophobe, онкоцитом)
<b>Феохромоцитом/Параганглиом</b>		
Множествена ендокринна неоплазия (MEN) 1	АД: MENIN	Хипер- или неоплазия на паратироидните жлези, тумори на хипофизата, тумори на панкреаса, стомаха, тънките черва и кожата
Множествена ендокринна неоплазия (MEN) 2	АД: RET	Медуларен рак на щитовидната жлеза, феохромоцитом и първичен хиперпаратироидизъм, понякога марфаноиден фенотип и невроми
Наследствен параганглиом/феохромцитом	(PGL1-4) АД: SDHD, SDHAF2, SDHC, SDHB, SDHD и евентуално SDHAF2 са импринтвани, честотата е ниска ако унаследяването е от майката	Множество параганглиоми и феохромоцитом, бъбречни тумори
Неврофиброматоза тип I	АД: NF1	Виж 1.2.1
Множествена ендокринна неоплазия (MEN) 4	АД: CDKN1B и евентуално други CDKN гени	“MEN1 like”
Параганглиом и стомашно стромален сарком (Carney-Stratakis)	АД: SDHB, SDHC, SDHD (са импринтвани, Виж по-горе).	Параганглиом, стомашно стромален сарком
Carney triade	Мултифакторна етиология ?	Стомашни епителиоидни лейомиосаркоми, белодробни хондром, и екстраадrenalни парагангиоми и т.н.
<b>Бъбречни кисти</b>		
Автозомно доминантни поликистозни бъбреци (ADPKD)	АД: PKD1, PKD2	Поликистозни бъбреци, хипертония, чернодробни кисти, интракраниални аневризми, аневризми на аортата, херния, дивертикулоза на дебелото черво
Автозомно рецесивни поликистозни бъбреци (ARPKD)	АР: PKHD1	Поликистозни бъбреци, фиброза на черен дроб
Синдром на бъбречни кисти и диабети (RCAD)	АД: HNF-1beta	Поликистозни бъбреци, диабет, ранно начало на подагра, малформации на матката
Поликистозни бъбреци	Често спорадичен	Унилатерални бъбречни кисти

**Легенда:** АД – автозомно доминантно унаследяване; АР – автозомно рецесивно унаследяване

Диагностицирането на различните видове тумори особено при деца е важно за поставянето на правилна диагноза и извършването на молекулно-генетично изследване при засегнатите пациенти и членовете на техните семейства. Това е от съществено значение за по-интензивно наблюдение на пресимптоматичните носители на генетични изменения във *VHL* гена, отговорен за заболяването.

#### 1.4.5. Терапия на заболяването

Повечето ХБи, лезии на гръбначния мозък, Фео, панкреатични кисти, тумори на надсеменника могат да бъдат оперативно премахнати. При мозъчни тумори с малки и средни размери може да се използва гама нож. Стереотактична радиотерапия също може да бъде използвана, като след проучвания от последните шест години при изследване на 40 пациента с ХБ при 33% от тях не се наблюдава прогресия [Asthagiri *et al.*, 2010]. Терапията на рХБ включва използването на хирургични процедури като диатермия, ксенон и брахитерапия. Ранната хирургическа намеса при БКК е от съществено значение за оцеляване на засегнатите пациенти. При малки тумори под 3см е възможна радиочестотна аблационна терапия (Radiofrequency ablation therapy, RFA) [Best *et al.*, 2012]. При лечението на Фео се препоръчва кортикална адреналектомия, която включва предоперативна терапия с алфа или бета блокери, както и постоперативна терапия за подържане на артериалното налягане [Еленкова, 2010]. Частична адреналектомия може да се използва като терапия при деца. Злокачествени Фео при VHL са редки, с честота от приблизително 5% [Jimenez *et al.*, 2009].

#### 1.4.6. Прогноза на заболяването

При пациентите с предполагаема клинична диагноза VHL, без характерни за заболяването прояви, с първа степен на родство със засегнат, при който не е потвърдена поставената диагноза на молекулно-генетично ниво се налага редовен клиничен мониторинг. Този мониторинг включва годишни прегледи от специалисти по заболяването, една година след започване на неврологичната симптоматика и поява на зрителните и слухови проблеми. На Таблица 6 е представен протокол за наблюдение на деца с VHL [Maher *et al.*, 2011].

**Таблица 6. Протокол за наблюдение при деца с VHL**  
[Ben-Skowronek and Kozaczuk, 2015]

Скрининг	Метод	Начало на скрининг	Време
Ретинален ангиом	Офталмологичен преглед	Детска възраст или ранно детство; От първата година на живота при деца с генетично диагностициран VHL синдром [Shuin <i>et al.</i> , 2006]	На всеки 12 месеца
ХБ на ЦНС	ЯМР на ЦНС	От първата година на живота при деца с генетично диагностициран VHL синдром [Shuin <i>et al.</i> , 2006], особено при юноши	На всеки 12-36 месеца
БКК и панкреатични тумори	Ултразвук и/или ЯМР на корем	Преди 16-та година	На всеки 12 месеца
Фео	Кръвно налягане, 24 часова урина, катехоламинови метаболити, ЯМР на корем, сцинтиграфия	Преди 8-та година	На всеки 12 месеца

Две скорошни проучвания оценяват туморната прогресия. В едно от проучванията при развитието на туморните образувания се наблюдава връзка между пола и генотипа [Binderup *et al.*, 2013]. На база получените резултати, става ясно, че ретинален ангиом се развива по време на младешките години, а ХБите на ЦНС остовно в по-напреднала възраст. В други проучвания с помоща на Kaplan-Meier метод се преценява ходът на развитие на заболяването и оптималният скрининг за всеки засегнат орган, според който например ретиналния скрининг на пациенти с VHL може да започне на 12 г.в. [Kruizinga *et al.*, 2013].

### 1.5. Обобщение на литературните данни

Прецизната клинична диагноза при описаните по-горе синдроми спадащи към групата на Факоматози се нуждае от потвърждение на генетично ниво поради изключително хетерогенните им изяви, които могат да бъдат объркани ако не се познава и разграничава добре клинична им картина. Генетичното верифициране определя точния тип Факоматоза. Изясняването на молекулните основи на тези заболявания при всеки пациент е от значение както за прогнозиране хода на заболяването и прилагане на правилна терапия, така и за провеждане на адекватно генетично консултиране и пренатална диагностика в засегнатите семейства. Нашите усилия са насочени към изясняване на молекулните основи на разглежданите заболявания в прицелни групи от български пациенти с цел подпомагане на мултидисциплинарната грижа необходима на засегнатите семейства. Предизвикателството е да се съчетае напредъкът в молекулярната биология позволяващ откриване на генетични варианти отговорни за възникване на тези заболявания, водещи до развитите на определени фенотипни изяви, с възможността за създаване на бъдещ мониторинг определящ клиничният отговор при различни терапии в зависимост от типа на откритият генетичен вариант.

Откриването на нови и нови мутации в *NF1*, *NF2*, *TSC2*, *TSC1* и *VHL* гените отговорни за развитие съответно на NF1, NF2, TSC и VHL част от групата на Факоматозите дава възможност да се обясни ролята на белтъчните им продукти при нормален и мутантен генотип. Разбирането на техните функции и връзката с откритите мутации позволява да се определят рисковете за прогресия на тези заболяванията при отделните индивиди. Това ще даде възможност за по-добра диагностика, проследяване и лечение на засегнатите пациенти и техните семейства.

## **2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

### **2.1. ЦЕЛ**

Целта на настоящия дисертационен труд е молекулно-генетично охарактеризиране на някои Факоматози в България: Неврофиброматоза тип 1 и тип 2, Комплекс туберозна склероза и синдром на von Hippel-Lindau. Генотип-фенотипни корелации.

### **2.2. ЗАДАЧИ**

**2.2.1.** Въвеждане и оптимизиране на молекулно-генетичен подход за идентификация на патологични замени в гените *NF1*, *NF2*, *TSC2*, *TSC1* и *VHL*.

**2.2.2.** Приложение на разработения подход върху подбрана група пациенти с клинична диагноза:

- Неврофиброматоза тип 1
- Неврофиброматоза тип 2
- Комплекс туберозна склероза
- Синдром на von Hippel-Lindau

**2.2.3.** Сравняване на откритите генетични варианти в изследваните гени: *NF1*, *NF2*, *TSC2*, *TSC1* и *VHL* с публикуваните в световните бази данни.

**2.2.4.** Опит за установяване на генотип-фенотипни корелации с цел прогнозиране хода на развитие на заболяванията.

**2.2.5.** Обобщение на получените резултати и сравнение с лутературни данни.

### 3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### 3.1. МАТЕРИАЛИ

##### 3.1.1. КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ

В рамките на настоящия дисертационен труд бяха проведени молекулно-генетични изследвания върху общо 146 лица. На база клинична диагноза, пациентите са обособени в групи, представени в Таблица 7:

**Таблица 7. Брой изследвани лица в зависимост от разпределението им в четирите групи заболявания**

	Брой индексни пациенти	Брой семейства	Брой родственици	Общ брой изследвани лица
Неврофиброматоза тип 1 (NF1)	35	35	37 (36+1 фетус) 21 здрави 16 засегнати	72
Неврофиброматоза тип 2 (NF2)	6 5 с български произход 1 с гръцки произход	6	6 6 здрави	12
Комплекс Туберозна Склероза (TSC)	21 19 с български произход 2 с румънски произход	21	22 13 здрави 9 засегнати	43
Von Hippel-Lindau синдром (VHL)	12	12	7 3 здрави 4 засегнати	19
<b>ОБЩО</b>	<b>146</b>			

Пациентите с клинична диагноза NF1, NF2, TSC и VHL са диагностицирани и насочени за ДНК анализ от:

1. „Специализирана Болница за Активно Лечение по Детски Болести проф. д-р Иван Митев“ ЕАД - София
2. Университетска Специализирана Болница за Активно Лечение по Неврология и Психиатрия „Св. Наум”, гр. София
3. Университетска Многопрофилна Болница за Активно Лечение Александровска, гр. София
4. УМБАЛ „Свети Георги“ ЕАД, гр. Пловдив
5. Болница Al Obregia, Клиника по детска неврология, гр. Букурещ, Румъния
6. Лаборатория EuroGenetica S.A., гр. Солун, Гърция

7. Регионални педиатрични, неврологични центрове и генетично-консултативни звена.

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

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

Настоящото изследване е финансирано частично по договори № 2-С/2015, 1-Д/2016 и Д-131/2017 на МУ-София.

### **3.1.2. БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ**

При провеждане на изследвания на ниво ДНК и в частност при изследванията, извършени в настоящия дисертационен труд, се използва високомолекулна ДНК, изолирана от левкоцити от венозна или капилярна кръв, и ДНК изолирана от биопсичен материал и хорионни въси. Използват се 3-6 ml венозна кръв, взета в пластмасова епруветка (тип вакутейнер) и антикоагулант етилен диамин тетраацетат – натриева сол (ЕДТА). Капилярна кръв се взима в пластмасови епруветки от 1ml със същия антикоагулант - ЕДТА. Кръвните проби се взимат след нахранване и се съхраняват на +4°C до времето за обработка (за изолиране на високомолекулна ДНК се съхраняват не повече от 48 часа).

## **3.2. МЕТОДИ**

### **3.2.1. ПРЕДАНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА МАТЕРИАЛА**

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

**Принцип:**

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

**Процедура:**

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

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

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

**Лизиране на ядрените клетки:**

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

**Преципитация на белтъците:**

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

**Преципитация на ДНК:**

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

**Буфери използвани за изолирането на ДНК:**

Лизис буфер (pH=7.4): NH<sub>4</sub>Cl - 155mM; KHCO<sub>3</sub> – 10mM; Na<sub>2</sub>EDTA – 0.1mM

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

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

**Апаратура:**

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

### 3.2.1.2. Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна, капилярна кръв, биопсичен материал и хорионни въси по фенол-хлороформен метод

#### **Принцип:**

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

#### **Процедура:**

##### **Разрушаване на клетките и клетъчните ядра:**

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

##### **Екстрахиране на белтъците:**

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

##### **Преципитация на ДНК:**

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

##### **Буфери използвани за изолирането на ДНК:**

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

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

#### **Апаратура:**

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

### 3.2.2 АНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА МАТЕРИАЛА

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

- Протокол за размножаване на всички екзони и екзон-интронните граници на *NF1* и *NF2* гените

Необходимите праймери за амплификация на *NF1* и *NF2* гените са дизайнирани чрез компютърна програма: In-Silico PCR [<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>]. Секвенциите на праймерите и размерът на амплификационните продукти са представени в Таблица 8 за *NF1* гена и Таблица 9 за *NF2* гена.

**Таблица 8. Секвенции на праймери и размер на фрагмента при амплификация на *NF1* гена.**

Екзон	Секвенция на праймера	Размер на фрагмента
1	F - CTTCCCTCACCTCAGCCTC R - TCCCCTCACCTACTCTGTCC	219 bp
2	F - AGGTATCTGTGGTTGATGCAG R - TCCACAGAAAATCACTTTCCATAC	368 bp
3	F - TCAGATGTGTGTTGATTGGTAGC R - TTGGGACATAAGATCATTCTCAAG	219 bp
4	F - GGTGGTGTGTATGTAAGGTGTTC R - GTGAGGGGCAAAAGAAGCTTG	446 bp
5	F - TGAGATACCACACCTGTCCC R - TGTCATTATAAAAATCCAGTTTGGTG	290 bp
6-7	F - TTTTGCTCTGAGTTGTATTTGTG R - AAATAACTTGGAACACGATGATAGG	520 bp
8	F - AATGCCAGGGATTTTGTTC R - AAGCCTAAAGTAATACACACCTTGAG	294 bp
9	F - GGCTGTTAATTTGCTATAATATTAGC R - GCAAGTCCTATGAACCTTATCAACG	390 bp
10-11	F - TGCCATTTGTGTGGGTAATG R - ATGGTCCCTTCGGTCAAG	753 bp
12	F - GATAAACAGAGCATACAACCTCACG R - ACCAAAGCAGCAGGAATAGG	284 bp
13	F - GGTGGATAGCTATTATCCTGAGTC R - GGTCTTGGCGTTTCAGC	268 bp
14	F - CTTCTCCTTCTAATCTCTCTCG R - CCACACACCAAGGAACATC	259 bp
15	F - CCAGTTAGAGTCAGAATGATGGG R - GGGTGACAAAATTTAGCACTATTC	542 bp
16	F - FGCATTAGGTTATTGATGATGC R - TCTCTCACCATTACCATTCC	233 bp
17	F - GAGTCTCAAACAGGAAGACAACCTC R - AATTTACCAAATTTTCATTTCAGAAAAC	319 bp
18	F - GCTCTTGTGAGTTATTGTATGCG R - CAGATGCCATGTGCTTTGAG	448 bp

<b>19 - 20</b>	F - CCTTTTGGGTGGAGCTTATC R - GCTATATGTTACTTTACTGAGCGAC	576 bp
<b>21</b>	F - CATGGAAGAAATGTTGGATAAAGC R - CTGACCCCTACATTGAGATGAC	685 bp
<b>22 - 24</b>	F - CTTACTCTGTGTGTTTAGATCAGTCAG R - CAAACACAAAAGTTTGACATCTC	1314 bp
<b>25</b>	F - TGAGGGGAAGTGAAAGAAGCTTG R - CCTATCCTAGTCCTGTCAATGGG	300 bp
<b>26 - 27</b>	F - CATGCACATATGATTGTTTTGG R - TGAAGGATTTGCTATGTGCC	759 bp
<b>28 - 29</b>	F - TGGTTGTCAACTTTGGGTTTAC R - CCTTGCTTCATGCAGTGTTAG	596 bp
<b>30</b>	F - ACGTTGCACTTGGCTTAATG R - CCATCAGCAGCTAGATCCTTC	328 bp
<b>31</b>	F - TTTTGTGCTGTATGTAGTCGG R - CAGTGAAGGTCAAATAGGCTG	225 bp
<b>32 - 33</b>	F - GCAAAGTTTGACCTTTGAACTC R - GTACATGGATTTATGTGAAACCG	943 bp
<b>34</b>	F - GCCCTCCATATTTGTAATCTTAG R - CTTAGTCCAAGAAGATGCAAAG	371 bp
<b>35</b>	F - GGCTGTTTACAAATCAGCTGAC R - CTGGTGGCAAACCTCCTTC	328 bp
<b>36</b>	F - CCCTTTAGAATGCCTGTTGC R - CCCTGCTATATGCTCCCAAG	379 bp
<b>37</b>	F - GAATCCAGACTTTGAAGAATTGT R - GGTAGGACACCTAGGGAGG	653 bp
<b>38</b>	F - GCATAGTGTTTTGTTTGGTTGG R - CAATTTACAATATTAAGGTAGAGGCTG	548 bp
<b>39</b>	F - TTAAGGGGTATTTGGTTTTACTG R - GGAAAATTCTGAAATGAAAGGG	460 bp
<b>40</b>	F - CAGGCCTGATTCTAGGTAATAGTC R - CAGTGCTTTGCCCAATGTG	395 bp
<b>41 - 42</b>	F - TTCATATTGATTAGGCTGTTCC R - GCAACTTGGTGTTAGAGCAC	783 bp
<b>43 - 45</b>	F - TGTATCTAGAGTTTTGATTTAGGGAAC R - GAAAGATATGCTTTACAACCTGAGAAC	980 bp
<b>46</b>	F - CCTGAATTCATTCCGAGATTC R - TGAAAGAAAGTAACATTCAACACTG	251 bp
<b>47</b>	F - ACTGCAGTGTGTTTTGAAAGAG R - GCAACAAGAAAAGATGGAAGAG	280 bp
<b>48</b>	F - TTGAACACAAAATTAAGTGAGCC R - GCATTTAAAGTAAGACATAAGGGC	327 bp
<b>49</b>	F - GACCTCAGCAGATGCTTGTTTC R - CTGTGAACCTTCTGCTCTGCC	320 bp
<b>50</b>	F - TCATCCTGTTTTAAGTCACACTTG R - GCTTGCCTCCATTAGTTGG	274 bp
<b>51</b>	F - TAGGACAGCCACTTGGAAGG R - CATGGAAAATTTTGATAATCCTG	347 bp
<b>52 - 54 53F seq</b>	F - GAGTCCTCAGTGAAAGCTTAAACAC R - TCTCATTTTGCCTCTTTGC GCTGTTGAATTTTAGAAGTAACATTG	1122 bp
<b>55 - 56</b>	F - GCACATTATTCTGGGGAATG R - GCACATTGTGTGTTCTTAAAGC	721 bp
<b>57</b>	F - TTTTGGCTTCAGATGGGG R - TTTGCTATAAACTGATCACAAGGG	370 bp
<b>58</b>	F - GCAATGAAATTCAGTCCTGG R - GGGCAAGGACAGGGAAG	278 bp

**Таблица 9. Секвенции на праймери и размер на фрагмента при амплификация на NF2 гена.**

Екзон	Секвенция на праймера	Размер на фрагмента
1	F - CAGCCAATCGCAGCATCTAT	762 bp
	R - CCCGTCTCTAGCTACACCCAT F2 - CAACTCCCCTTTCCGCTCA	405 bp
2	F - CAGTCCTCATCAGCTGTCTTAGTGT R - GAGGAGAAGGAAACTGGTAGCAT	428 bp
3	F - CCTTGCAAAGGCTTCTTTGA R - GGGCTGACCTTCCAGAGGTA	330 bp
4	F - CTCTGGCAGCCCTCATTAGAA R - CTGGGGCAAGTCTCTCTGAA	300 bp
5	F - GAGCTGGGAGGGAATGAGAT R - CCCACACTGTTTACTGGAGATTACA	306 bp
6	F - CCTCCAATAGAATGGTGCCTTA R - GCCATAAAGGAATGTAAACCA	301 bp
7	F - CGACGTGGCTCTAGAGGAAT R - CCTTCTTTACCACAGAACCATAAAA	310 bp
8	F - CTGTTGGGACCTGCTGAAA R - CCAGTTGAGCTTCCCAGTTT	470 bp
9	F - GGAAGCCAGGACAAGGCATA R - GCGCCAAGTGAGATACCATTCTA	324 bp
10	F - CTGCTACCTGCAAGAGCTCAA R - GGTAGGCATCGGCAAATGAA	370 bp
11	F - GCAATAAGAATGACCCTGGCTA R - CAAACGCTGCTAACTCATGGTT	369 bp
12	F - GGAGTCCGAGACTCTGGTTTGT R - GCAAGCAGCTTGAGGACAACCT	424 bp
13	F - GGTGCCATCCTCAGGGTTA R - CAGGCTCTCTGCACCTCTCAT	357 bp
14	F - GAGGTGGGACCCGAGTTGT R - GGAAATTCTTCCCTCCAGGGTGT	406 bp
15	F - CCAGGCCTCAAACCCTAGAT R - GCCAATAGTCTAGTGA CTGGCTA	378 bp
16	F - CAGCCAACCTTCTTGAGCATCTAT R - CTCTTCACTCAGCTGGGGAA	338 bp
16 (ALT)	F - TCACGATTTTCAGGCCTATCC R - ATGCCACCAAGACAAAGGAC	492 bp

За всеки фрагмент са оптимизирани условията за провеждане на ПВР, като са променяни следните параметри на ПВР: концентрация на компонентите, температура и време за хибридизация на праймерите и време за синтез на желания продукт. Оптималните концентрации на компонентите в реакционната смес за ПВР са посочени в Таблица 10.

**Таблица 10. Оптимална концентрация на компонентите, участващи в ПВР за намножаване на всички екзони и екзон-интронни граници на *NF1* и *NF2* гените.**

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

Оптималната програма за провеждане на ПВР за получаване на специфичен продукт е представена в Таблица 11.

**Таблица 11. Оптимална програма за провеждане на ПВР за получаване на специфични продукти на екзони от *NF1* и *NF2* гените.**

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	95°C	5 min	1
Денатурация	95°C	30 sec	30
Хибризация на праймерите	60°C	30 sec	
Синтез на нова верига	72°C	40 sec	
Краен синтез	72°C	5 min	1

**- Протокол за намножаване на дълбоко интронни варианти в *NF1* гена**

Дълбоко интронните варианти са представени в Таблица 12. Необходимите праймери за амплификацията им са дизайнирани чрез компютърна програма: In-Silico PCR [<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>]. Секвенциите на праймерите и размерът на амплификационните продукти са представени в Таблица 13.

**Таблица 12. Дълбоко интронни варианти в *NF1* гена.**

c.60+9032_60+9036del5	c.1393-592A>G
c.61-7486G>T	c.1527+1159C>T
c.288+2025T>G	c.1642-449A>G
c.288+1137C>T	c.1721+542A>G
c.888+651T>A	c.3198-314G>A
c.888+789A>G	c.4110+945A>G
c.888+10312A>G	c.4173+278A>G
c.889-942G>T	c.5749+332A>G
c.1062+113A>G	c.5750-279A>G
c.1260+1604A>G	c.7908-321C>G

**Таблица 13. Секвенции на праймери и размер на фрагмента при амплификация на 20-те дълбоко интронни варианти в *NFI* гена.**

Екзон	Секвенция на праймера	Размер на фрагмента
60+9032del	F - GCGTATTAATTA AAAAATGTGTTTTCCACT R - CAGATGAAACAAGCCAATGCTT	277 bp
61-7486G>T	F - GACCGTTATTAGTCAGTGCTGCTAT R - GTGCCTCTAAAAACCCAAGACTT	375 bp
288+1137C>T	F - GAGAAGTGTTGGTGGAAAGCATT R - GGTCAACGGTCAATAAGAAAATTT	450 bp
288+2025T>G	F - CTTGCCGTGCTCTACTGTTGA R - CTGTGAATTCACATTACAATGCCT	415 bp
888+651/789	F - GGCACCATGACAACCTGGTAAT R - CACAGATACACCCAGGATCAATA	505 bp
888+10312A>G	F - GCCAGAGTCAGATTGAAAAGTAAGT R - GATGCTGCTGGTCTAAAGACCA	365 bp
889-942G>T	F - CTCACGTTGGTTTCTAATTTCCCTT R - GGCTGTTCTGTTGCTCTAAATTT	405 bp
1062+113A>G	F - CTA CTGTTCAGTCCATGGTGGT R - GGCCCTAATTGCCACATTATT	281 bp
1260+1604A>G	F - CGCTGTGGCTCAGAACACTAA R - CCACACATGCAGTGCTCATT	313 bp
1393-592A>G	F - GGTGATGTTAGCTCTGGAATATAATT R - GTTCTCACA AATATACACACTGGGTAA	473 bp
1527+1159C>T	F - GCCTGGTGCATAATAAGCACTA R - GTTCCTTCTTCTCTCTCTCCA	383 bp
1642-449A>G	F - CGTTAGTGTTCTCTGAGCCAGATT R - GCTAAATGATGAATTCGGAACAAT	348 bp
1721+542A>G	F - CCAATGCTTTTCGATGAATGAAT R - CACCGGGTTAAACAAAACATAATTA	348bp
3198-314G>A	F - GATGCTCAAGTCCCTGACTTAAGAT R - GAGTTAATATGCAGATCCCAGAATACA	392 bp
4110+954A>G	F - GAAACTGTGATTCTGGAAGAAACAT R - CAGCCCAAACCTTGAGAAGATATT	477 bp
4173+278A>G	F - CAGCCTATTTGACCTTCACTGTAA R - GCAACTTTTAGGTAAGATTTAGAAAAGTGA	376 bp
5749+332A>G	F - GTAGGCCACATTGAGAAATCCA R - GCTGGGAGAAGATCAACATTTATAA	398 bp
5750-279A>G	F - GTGGGAGTGGGTTATACCTGTGTA R - GGAGAAAAGACACTTGGCAAAT	327 bp
7908-321C>G	F - GGATCATGTATTTCACTCCCTCTAAA R - CAATGAACATGTGTGTGTGTCTGT	343 bp

За всеки фрагмент са оптимизирани условията за провеждане на ПВР, като са променяни следните параметри на ПВР: концентрация на компонентите, температура и време за хибридизация на праймерите и време за синтез на желанния продукт. Оптималните концентрации на компонентите в реакционната смес за ПВР са посочени в Таблицы 10 и 11 (виж по-горе).

- **Протокол за размножаване на всички екзони и екзон-интронните граници на *TSC1* и *TSC2* гените**

Необходимите праймери за амплификация на *TSC1* и *TSC2* гените са дизайнирани отново чрез In-Silico метод [<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>]. Секвенциите на праймерите и размерът на амплификационните продукти са представени в Таблица 14 за *TSC1* гена и Таблица 15 за *TSC2* гена.

**Таблица 14. Секвенции на праймери и размер на фрагмента при амплификация на *TSC1* гена.**

Екзон	Секвенция на праймера	Размер на фрагмента
1	F - CGTCTATCCTTCCTTTTCGAGAA R - CCCTACCAAGCAAGTGAGTCTCT	298 bp
2	F - CCTGTCAGGGATAGAGGAGGA R - CCCTCATGCCATAGATGGT	301 bp
3	F - GCATTGAACACGTGCATTAGTTT R - CAGCAGGATTCTAGTGGCTCTAAA	359 bp
4	F - GTGACAGGAAGCTGTGTAAGGTA R - CAGTGGCGCACAGAAATCA	297bp
5	F - CTGCATGACCCTTGCTTTACAT R - GCTTCCTTGCTTTAAGTTGCCTA	358 bp
6	F - GTACGTGAGTCAACTTGTGATTTGT R - GTCTACATGTCCATTCCTTACAGCA	363 bp
7 - 8	7F - GCTGGCAGCCACTTGTTTATA 8R - CCTCAACAGGGATTACCTCCTA	775 bp
9 - 10	9F - GTGGCTGGCACTGAGTTGA 10R - CTGACCCAAAGGGTCAGCT	1155 bp
11 - 12	11F - CTGAACACTGGCCATGGAT 12R - CTGGCATAATTAGGCTTCTCAAA	710 bp
13 - 14	13F - GCACTCGGCTGACSTTTAAA 14R - CAGCAAGCCTGTGAGCAAT	825 bp
15	F - CTCTCTGAGTGACACTGGCATGT R - GGGAGTGTGAAGAATGATTCTTGT	762bp
16 - 17	16F - GACCACAAGGAAGTGATCTAACTTT 17R - CTCGGCTGCTGTGCTTTATAA	990 bp
18	F - CAGGGTAGCTTATGACTATTCAGATGA R - CAGAGAGAAAAGCATTTCAGCTTAGT	410 bp
19 - 20	19F - GAGCCGTTGAGCTAAGGCAT 20R - CATGCGGGAGACATACTGTCT	1167 bp
21 - 22	21F - GCCTTCTCAGTCCTTCTTACATTGT 22R - GGTTGAGTTTAGAAAGAAGGGC	632 bp
23	F - GAGAGTGGGCTAGCGGAGTT R - CTTGCACTCAGACCCTGGAA	739 bp

Таблица 15. Секвенции на праймери и размер на фрагмента при амплификация на *TSC2* гена.

Екзон	Секвенция на праймера	Размер на фрагмента
1	F - CGTCACGTGATGCAAGGAT R - GCACCCGCCATGACTTAA	356 bp
2	F - CAGGGAGTGTGGGAGGAAA R - CTGGAGACAGCATTCTGTGTA	418 bp
3	F - GCAGTGGGAGTCTTTAGGTGGT R - GGCAGTCAGCTGTCAACCAT	273 bp
4	F - GTGGGGCTCTCAGTCACAA R - CAGCTCCAGAGCCCATCA	373 bp
5	F - CCTGCACTTCAGGGACTTCTT R - CAGGTGCATGAAGCAGGGT	364 bp
6	F - CAGTGCGTGGTCTGTCTGTT R - CTGCGGAGCTGAACTTAGGA	323 bp
7 - 9	7F - GACGTCATAGAGTGACTAGACCACA 9R - GAGGACAAGGACTCTCTAAGCCA	1175 bp
10	F - CCTCGGCAACCTCACACAT R - GCCTGGAAGGCCTAGAAAT	330 bp
11	F - GATAAACGTGTGGTGGGCACT R - CCTGTCTCCGGTGGAAGGT	438 bp
12 - 14	12F - GAGAGGGCTGAGGGTGTCT 14R - GCACGTGCACAACAGAGACA	1366 bp
15	F - GGGACATGTCCGCTGCTT R - CTCACCTACGGACACAGCCAT	379 bp
16	F - GGTAGAAAGTGTCTCACGGCT R - GGGGAACAGACTCCAACACA	279 bp
17	F - GGTGGTCTGGGTTTGAA R - GTCTCTGCAGCTTCCAGGAA	356 bp
18 - 20	18F - CATCAGCAGGTGGCCTTTT 20R - CCAGAGGCTCGCAGTCTTT	1048 bp
21	F - CCTCACATTCCTGGTGTGTTACT R - GCCTGGCAGAAACTCGTTT	437 bp
22	F - GCTAAGCCTCGGCTGTTCT R - CTGAGAGAGGGCACCAGAGA	380 bp
23 - 25	23F - CCTTCTCTCCTCTGCAGCA 25R - CCCATTTCCACTCACTGACTT	1000 bp
26	F - CGTGAAGCCTTACTTGTCTCA R - CAGACGATGAGGTCATGCAA	468 bp
27 - 29	27F - GCTTTGGCCCTTGGTGATA 29R - GTGAGCTGTGGAAGGCTCA	870 bp
30	F - CTGCCTGTGGCACTAGCTT R - CCCAAGAGGGCCAAGTCT	413 bp
31	F - GACATCGTGGTCCTGAGGATT R - CAGCAGAGAGGAGCCACATT	423 bp
32	F - GTGCTCTCTGCTCGACCTGT R - CAAGCCAAAGACATTCTGCA	305 bp
33	F - CTGTCCCTCTGGTCAGGAGAA R - CCCAAGTTCAGAGCCAGTT	330 bp
34 - 36	34F - CTCACCACCTCCAGGTCAA 36R - CTC AATGAGCACTTCATGCTGT	1312 bp
37-38	37F - CTGCTGGAATGGATGGTCTT 38R - GAGGAGGACCTGCCACCAA	896 bp
39 - 42	39F - GGAGCTGACAGGTGTCTAGCAGT 42R - GGAGCTGACAGGTGTCTAGCAGT	986 bp

След последваща оптимизация са установени оптималните условия за провеждане на ПВР (Таблица 16).

**Таблица 16. Оптимална концентрация на компонентите, участващи в ПВР за намножаване на всички екзони и екзон-интронни граници на *TSC1* и *TSC2* гените.**

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

Оптималната програма за провеждане на ПВР за получаване на специфичен продукт е представена в Таблица 17.

**Таблица 17. Оптималната програма за провеждане на ПВР на *TSC1* и *TSC2* гените.**

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

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

Необходимите праймери за амплификация на *VHL* гена са дизайнирани отново чрез In-Silico метод [<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>]. Секвенциите на праймерите и размерът на амплификационните продукти са представени в Таблица 18.

**Таблица 18. Секвенции на праймери и размер на фрагмента при амплификация на *VHL* гена.**

Екзон	Секвенция на праймера	Размер на фрагмента
1	F - CGAAGACTACGGAGGTCGACT R - CTGGATGTGTCCTGCCTCAA	567 bp
2	F - GAGACGAGGTTTCACCACGTTA R - GTGCCTGACATCAGGCAAA	383 bp
3	F - GGTAGTTGTTGGCAAAGCCTCTT R - CTCTGAGAATGAGACACTTTGAAACTAA	376 bp

След последваща оптимизация са установени оптималните условия за провеждане на ПВР (Таблица 19).

**Таблица 19. Оптимална концентрация на компонентите участващи в ПВР за намножаване на изследваните екзони от *VHL* гена.**

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

Оптималната програма за провеждане на ПВР за получаване на специфичен продукт е представена в Таблица 20.

**Таблица 20. Оптималната програма за провеждане на ПВР на екзони от *VHL* гена.**

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	95°C	5 min	1
Денатурация	95°C	30 sec	30
Хибридизация на праймерите	60 °C	30 sec	
Синтез на нова верига	72°C	40 min	
Краен синтез	72°C	5 min	1

- **Протокол за намножаване на единична нуклеотидна замяна с.723G>A; p.Pro241= в екзон 4 на *CCND1* гена, който се смята за модификатор на *VHL***

Необходимите праймери за амплификация на замяна с.723G>A; p.Pro241= (в литературата описван още като с.870A>G) в екзон 4 на *CCND1* гена са дизайнирани отново чрез In-Silico метод [<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>]. Секвенциите на

използваните праймери са: F:GCCTCAGATACCGAGTGCTT и R:GTAAGTTCTAGGAGCAGTGGAAGAA, а размерът на амплифицирания продукт е 469bp.

След последваща оптимизация са установени оптималните условия за провеждане на ПВР описани в Таблица 19 (виж по-горе) и оптималната програма за провеждане на ПВР за получаване на специфичен продукт, която е представена в Таблица 20 (виж по-горе).

### 3.2.2.2. ЕЛЕКТРОФОРЕЗА В АГАРОЗЕН ГЕЛ

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

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

#### **Използвани буфери:**

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

#### **Апаратура:**

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

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

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

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

### 3.2.2.3. ДИРЕКТНО СЕКВЕНИРАНЕ ПО SANGER С ФЛУОРЕСЦЕНТНО БЕЛЯЗАНИ ДИДЕЗОКСИ НУКЛЕОТИДИ

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

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

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

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

Разделянето на фрагментите в автоматичния секвенатор ABI3130 се извършва на принципа на капилярната гел-електрофореза. Използваните при секвенционната реакция терминиращи дидезоксинуклеотиди са флуоресцентно белязани, поради което се осъществява лазерна детекция. Всеки от четирите дидезоксинуклеотида (ddG, ddA, ddT и ddC) е белязан с два флуорофора – флуоресцин и един от четирите типа родамин. Флуоресцинът има висок екстинкционен коефициент при  $\lambda=488\text{nm}$  (това е и дължината на вълната, емитирана от аргоновия лазер, който се използва в автоматичните секвенатори). Играейки ролята на донор, флуоресцинът поглъща енергията на лазерния

лъч и я прехвърля към акцепторния родамин върху същата молекула. Всеки от четирите акцептора емитира светлина с определена дължина на вълната, която се детектира от апарата, и така се идентифицира съответният нуклеотид.

**Процедура:**

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

**Намножаване на желаня ДНК фрагмент чрез ПВР**

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

**Пречистване на намножения продукт:**

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

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

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

**Техника:**

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

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

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

**Провеждане на секвенционна реакция:**

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

**Техника:**

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

Режимът за провеждане на секвенционната реакция е:

Денатурация – 95°C – 20sec;

Хибридиране на праймера – 50°C – 15sec;

Синтез на верига – 60°C – 3min.

Този цикъл се повтаря 25 пъти.

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

**Преутаяване на секвенционния продукт:**

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

**Техника:**

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

Получената утайка се промива с 200µl 80% етанол, вортексират се и се центрофугира за 10min на 12000rpm на стайна температура. Супернатантата се премахва чрез изсмукване на вакуум. Утайката се суши на стайна температура на тъмно за 12 часа. Сухата утайка може да се съхранява на тъмно на стайна температура за няколко дни.

**Разтваряне на секвенционния продукт:**

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

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

**Визуализиране и отчитане на пробите:**

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

**Апаратура:**

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

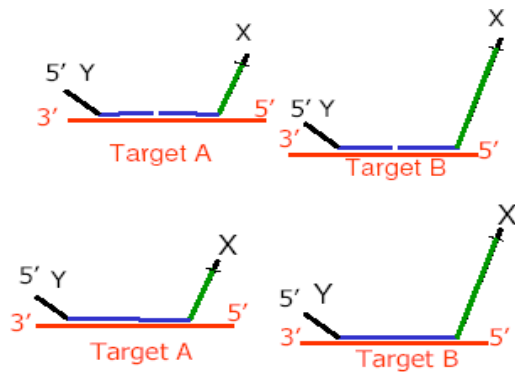
Електрофоретичното разделяне на секвенционните продукти се извършва на автоматичен секвенатор ABI Prism 3130 Genetic Analyzer.

**3.2.2.4. МУЛТИПЛЕКСНА ЛИГАЗНО ЗАВИСИМА АМПЛИФИКАЦИЯ (MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION, MLPA)****Принцип на MLPA анализа:**

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

**Принцип на MLPA анализа:**

Метода позволява да се анализират до 45 нуклеотидни фрагмента в една реакция, като се оценява количествено броят копия, получени при амплификацията на всеки фрагмент. Принцип на метода MLPA е представен на Фигура 24.

**Фигура 24. Принцип на метода MLPA**

За всяка прицелна последователност (Target A и Target B) се дизайнират по две специфични сонди. Към всяка от сондите са прикачени специфични секвенции, които се разпознават от праймерите X и Y. Двата края на специфичните сонди се лигираат със специфичен лигазен ензим.

Получените амплификационни продукти се разделят на капилярна електрофореза (ABI3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Фрагментите се сравняват като площ на получените пикове, както в рамките на една проба, така и спрямо контролни проби, анализирани едновременно с изследвания пациент. Когато анализът касае X свързани гени, пациентите от мъжки пол се анализират спрямо контроли от мъжки пол, а пациентите от женски пол – спрямо контроли от женски пол.

**Процедура за MLPA анализ:**

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

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

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

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

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

**Реакция на лигиране:**

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

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

**Полимеразна верижна реакция:**

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

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

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

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

**Условия на амплификационната реакция:**

95°C – 30 sec

60°C – 30 sec                      33 цикъла

72°C – 60 sec

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

**Приготвяне на пробите за електрофоретично разделяне:**

По 2.5µl от всяка амплифицирана проба се смесват с 12µl Hi-Di формамид (Applied Biosystems) и 0.6µl ROX500 size standard (Applied Biosystems). Така приготвените проби се денатурират на 95°C – 5 мин и се поставят в лед.

**Капилярна електрофореза:**

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

**Визуализиране и отчитане на пробите:**

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

Прецизната интерпретация на резултатите изисква извършването на математически калкулации за количествена оценка на получените генни фрагменти. За нашите цели най-подходящ се оказва следният математически алгоритъм: всеки фрагмент отчетен като променен (по-нисък или по-висок) спрямо контролата се калкулира самостоятелно и независимо от останалите; пресмята се средно аритметично от площите на всички референтни пикове; площта на анализирания пик се разделя на средно-аритметичната стойност от референтните пикове; получената стойност се разделя на аналогичната стойност при контролата; полученото съотношение се интерпретира както следва:

$\frac{\text{площ на пика} / \text{средно аритметична площ на всички референтни пикове при пациента}}{\text{площ на пика} / \text{средно аритметична площ на всички референтни пикове при контрола}}$	=	Съотношение на площите на пиковете
---	---	------------------------------------

съотношение около 1 – нормален резултат  
 съотношение <0.6 – делеция  
 съотношение >1.6 – дупликация

Изчисленията се представят в табличен вид.

Освен математически алгоритъм беше използвана и програмата - Coffalyser, при която математическите калкулации за количествената оценка на получените генни фрагменти се пресмятат от самата програмата и отново се представят в табличен вид [<https://coffalyser.wordpress.com/>]. Съотношенията са същите като горе-описаните.

**Апаратура:**

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

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

**Използвани MLPA китове в дисертационния труд:**

SALSA MLPA P081 NF1 mix 1 probemix

SALSA MLPA P082 NF1 mix 2 probemix

SALSA MLPA P044 NF2 probemix

SALSA MLPA P124 TSC1 probemix

SALSA MLPA P046 TSC2 probemix

SALSA MLPA P016 VHL probemix [www.mlpa.com]

**3.2.3. ЛИТЕРАТУРНИ БАЗИ ДАННИ, ИЗПОЛЗВАНИ В ПРОУЧВАНЕТО**

При секвенционния анализ на изследваните гени разчетената секвенция на продуктите от ПБВ се сравнява с публикуваната за всеки ген в GenBank базата данни.

Използваните референтни генни секвенции в настоящото проучване са:

NM\_001042492 (*NF1* и 20 дълбоко интронни варианти), NM\_000268.3 (*NF2*), NM\_000368.4 (*TSC1*), NM\_000548.4 (*TSC2*), NM\_000551.3 (*VHL*) и NM\_053056.2 (*CCND1*). Откритите нуклеотидни замени са описани според номенклатурните насоки на Human Genome Variation Society [<http://www.hgvs.org/mutnomen/>]. За сравнителния анализ на откритите мутации при български пациенти с публикуваните данни в литературата са използвани редица проучвания на други автори, цитирани в раздел „Резултати и Обсъждане“, както и следните публично достъпни мутационни бази данни:

- ENSEMBL [<http://www.ensembl.org/index.html>]
- Leiden Open Variation Database [<http://www.lovd.nl>]
- National Center for Biotechnology Information [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>]
- University of California Santa Cruz [<https://genome.ucsc.edu/>]

## 4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Групата от пациенти, обект на молекулно-генетични изследвания в настоящия дисертационен труд, се състои от общо 146 лица, от които пациенти с клинична диагноза NF1 (35 индексни пациента, 21 здрави и 16 засегнати родственици), NF2 (6 индексни пациента и 6 здрави родственици), TSC (21 индексни пациента, 13 здрави и 9 засегнати родственици) и VHL (12 индексни пациента, 3 здрави и 5 засегнати родственици).

Резултатите от молекулно-генетичните изследвания са представени в 4 публикации [Колева *et al.*, 2017; Glushkova *et al.*, 2017; Glushkova *et al.*, 2018a; Glushkova *et al.*, 2018b].

### 4.1. Неврофиброматоза

По отношение на молекулно-генетичната диагностика на неврофиброматози настоящата разработка има пилотна роля. До момента в България не бяха докладвани пациенти с генетично верифицирана диагноза Неврофиброматоза тип 1 и тип 2. Настоящият труд постави началото на молекулно-генетичната диагностика на тази група заболявания в България с въвеждане на методика за извършване на генетичен анализ при пациенти с клинична диагноза Неврофиброматоза.

#### 4.1.1. Неврофиброматоза тип 1 (NF1)

##### 4.1.1.1. Изследвана група пациенти

В рамките на настоящия труд бяха изследвани 35 пациента с клинична диагноза NF1 от общо 35 семейства. В анализираната група бяха открити общо 25 мутации в *NF1* гена, като 5 от тях са нови за световната литература: 4 в кодиращите участъци на *NF1* гена: две мутации засягащи сплайсинга, малка делеция на пет нуклеотида и дупликация на един нуклеотид, всички находки са описани в Таблица 21 (в червен цвят) и един вариант в некодиращия участък на *NF1* гена представляващ дълбоко интронен вариант описан в Таблица 23 (Пациент 34) (в зелен цвят). По-голяма част от откритите мутации при изследваните български пациенти са добре известни и описани в световната литературата, свързани с типичната клинична картина на NF1. Клиничните характеристики на 23-те генетично верифицирани случая с открити мутации в кодиращите последователности на *NF1* гена са представени в Таблица 21.

**Таблица 21. Клинични и молекулно-генетични данни на пациентите с диагноза NF1, с открити мутации в кодиращите последователности на *NF1* гена.**

№	Клинични характеристики	Локализация	Тип замяна	Мутации в <i>NF1</i> гена	Фамилност	Възраст/Пол
1	три/четири CALs	Екзон 5	frameshift (инсерция)	c.540insA, p.Leu180fs	De novo	3 м./ Ж
2	шест CALs >15mm/dm; множество лунички; 1 ПН; сколиоза; 2 Lisch нодула; <b>изоставане в нервно-психичното развитие</b>	Екзон 30	nonsense	c.4084C>T, p.Arg1362*	De novo	19 г./ М
3	множество CALs; Н на дясното рамо; две неврофиброми на врата и две на гърба	Инtron 35	Splice site	<b>c.4725-1G&gt;A #</b>	Засегнат брат и майка (неналични)	33 г./ Ж
4	три CALs >2cm/dm, лунички; сколиоза	Екзон 18	nonsense	c.2041C>T, p.Arg681*	De novo	18 г./ Ж
5	множество CALs >5mm; 1 ПН; хипоплазия на малкото крило на сфеноидната кост в дясно (sphenoid wing dysplasia); атрофия на оптичен нерв; птоза	Екзон 29	nonsense	c.3916C>T, p.Arg1306*	Майка негативна, баща неналичен	13 г./ Ж
6	CALs	Екзон 50	nonsense	c.7348C>T, p.Arg2450*	Родители неналични, сестра носителка	29 г./ Ж
7	множество CALs; <b>изоставане в нервно-психичното развитие; ГТКП</b>	Екзон 13	missense	c.1466A>G, p.Tyr489Cys	неналични родители	3 г./ Ж
8	CALs; ПН на кръста; Lisch нодули; остеоартроза	Екзони 37-58	Герминативна делеция	Герминативна делеция на екзони 37-58	неналични родители; негативен фетус	26 г./ Ж
9	множество Ни в дясна тенарна област, 1-ви и 3-ти пръст на дясната ръка; следоперативни цикатрикси на дясната ръка; ограничени движения на метакарпалните и интерфалангеалната става; хипестезия на 2ри и 3ти пръст на дясната ръка	Екзони 1-12	Соматична делеция	<b>Соматична делеция на екзони 1-12</b>		50 г./ Ж
10	множество CALs; Н на гърба (4 г.в.), през пубертета множество Ни; хамартоми в малък мозък (14 г.в.); две лезии в шийния, торакалния и лумбалния отдел на гръбначния стълб по хода на нервите (13 and 9mm) и подобна зона и в ляво (10mm), на ниво Тх7 и Тх9 лезии в ляво в паравертебралната мускулатура (15 and 11mm), множество лезии в лумбалната област и в илеопсоас (от 8 мм до 28 мм)	Екзон 14	frameshift (делеция)	c.1541_1542delAG, p.Gln514Argfs*43	Фамилен случай, но роднините не са налични	16г./ М
11	множество CALs на врата, раменете, гърба и корема, на бедрото 1 CAL; <b>ГТКП</b> ; глиоза в десния хипокампус	Екзон 16	frameshift (делеция)	c.1756_1759delACTA, p.Thr586Valfs*17	De novo	24 г./ Ж
12	множество CALs; ПН на дясната ръка; параганглиом; десен оптичен глиом	Екзон 38	missense Splicing ефект	c.5270T>A, p.Val1757Asp	2 дъщери носителки	41 г./ Ж
13	множество CALs; <b>ГТКП</b> (1 г. 2м.); мигрена	Екзон 8	frameshift (делеция)	<b>c.823delATCTT, p.(Leu275Valfs*14) #</b>	Негативна майка	17г./ Ж

14	множество CALs; хамартоми инфратенториално и в медула спиналис; няколко базални ганглиини НСОи; сколиоза	Екзон 5	nonsense	c.574C>T, p.Arg192*	Негативен баща	4 г./ Ж
15	множество CALs по корема, гърба и гърдите; <b>ГТКП</b> ; множество (~9) НСОи в ЦНС; атрофия на ляв оптичен нерв; голям лимфангиом латерално на лявата длан; невротизъм и екстраверсия	Екзон 43	frameshift (дубликация)	<b>c.6547dupC, p.(Arg2183Profs*11) #</b>	Майка носителка	18 г./ Ж
16	множество CALs; хемангиом на гърба; лицев дисморфизъм; брахидактилия; абнормно задебеляване на хипоталамуса вдясно, оптичен глиом в десен оптичен нерв; <b>изоставане в нервно-психичното развитие</b>	Екзон 17	missense	c.1885G>A, p.Gly629Arg	Майка с CALs, брат носител	7 г./ М
17	множество Lisch нодули двустранно; двустранна лумбосакрална радикулопатия за L4 и EC1 коренчета; фокална епилепсия с вторично <b>ГТКП</b>	Екзон 9	nonsense	c. 910C>T, p.Arg304*	неналични родители	44 г./ Ж
18	множество CALs; аксиларни лунички; мускулна хипотония; НСОи; нестабилна походка; задръжка в говора	Инtron 22	Splice site	<b>c.2990+2T&gt;G #</b>	5 носители (7 изследвани)	2 г./ М
19	множество CALs и кожни Ни по тялото и крайниците; макроцефалия; сколиоза	Екзон 28	nonsense	c. 3721C>T, p.Arg1241*	неналични родители	12 г./ Ж
20	множество CALs; глиом на ляв оптичен нерв и паренхимни лезии; <b>генерализирана епилепсия; тежка умствена изостаналост с аутизъм</b>	Екзон 21	missense	c.2540T>C, p.Leu847Pro	Майка носителка	16 г./ М
21	множество CALs; множество Ни и ПНи (след бременност)	Инtron 45	Splice site	c.6820-3A>G (tr. variant 1) c.6757-3A>G (tr. variant 2)	Майка и дъщеря носителки	35 г./ Ж
22	< 10 CALs; билатерални глиоми на оптичен нерв (скенер-СТ); тумор дясно темпорално, супратенториално; две лезии; задръжка на речта; <b>изоставане в нервно-психичното развитие</b>	Екзон 26	frameshift (делеция)	c.3456_3459delACTC, p.Leu1153Metfs*4	De novo	3 г./ Ж
23	множество CALs; лунички; 1 лезия от типа НСО	Екзон 40	nonsense	c.5902C>T, p.Arg1968*	De novo	5 г./ М

**Легенда:** CALs – „café au lait“ петна кафе с мляко; Н – неврофибром; ПН – плексиформен неврофибром; ГТКП – генерализирани тонично-клонични пристъпи; НСОи – неидентифицирани светли обекти; ЦНС – централна нервна система. В червено са отбелязани всички нови (#), непубликувани мутации

Пациентите с диагноза NF1, които бяха негативни за мутации в *NF1* гена след секвениране по Sanger на всички 58 екзона на гена, бяха подложени на MLPA анализ за големи делеции и дупликации. Този анализ доведе до откриване на две големи делеции: едната герминативна делеция на екзони 37-58 в ДНК изолирана от венозна кръв, а другата соматична делеция на екзони 1-12 в ДНК изолирана от свежа биопсия от неврофибром. Тази соматична делеция на екзони от 1-ви до 12-ти отговаря на клинична картина описана при пациенти със сегментна неврофиброматоза (SNF1) [Roth *et al.*, 1987; Ruggieri and Praticò, 2015], а в нашия случай клиниката на прицелния пациент включва наличие само на ПНи, ограничени в един участък (сегмент) на тялото (Таблица 21, Пациент 9) (в син цвят). Случаят е интересен тъй като е единствен по рода си за България и е с генетично верифицирана SNF1 в хода на настоящия дисертационен труд.

При 12 от всички изследвани случаи след молекулно-генетичен анализ чрез секвениране по Sanger и MLPA анализ не бяха открити генетични изменения в *NF1* гена. Негативните случаи са представени в Таблица 22.

**Таблица 22. Клинични данни на случаите негативните за мутации в *NF1* гена.**

№	Диагноза	Клинични характеристики	Фамилност	Възраст/Пол	Диференциална диагноза
24	NF1	1 неврофибром на гърба	-	16 г./ М	
25	NF-Noonan	Туморна формация в ляв бъбрек (~34mm); гинекомастия	-	35 г./ М	<i>PTPN11</i> ген негативен
26	NF1	CALs	-	41 г./ М	
27	NF1/TSC	CALs , Лицеви ангиофиброми, Аутизъм	-	11 г./ М	<b>TSC2 положителен (16 г.в./М) (Виж по-долу Пациент 10 - TSC)</b>
28	NF1/NF2	Аденом на паротидна жлеза; ВШ	-	39 г./ М	<i>NF2</i> ген негативен
29	NF1	3 CALs на бедрото	-	1 г./ Ж	
30	NF1	CALs; сколиоза на дистална трета на лява тибия	-	3 г./ Ж	
31	NF1	Множество CALs	-	8 г./ М	
32	NF1	13 CALs	-	6 г./ Ж	
33	NF1	множество CALs; опериран интрадурален тумор на ниво L4 - между коренчетата на кауда еквина на гръбначния мозък (хистология - менингеом)	-	25 г./ М	
34	NF1	множество неврофиброми по цялото тяло, след 35 години броят им се увеличил, вероятен плексиформен неврофибром на дясната ръка; операция на шиен прешлен поради изтъняване	майка, баща (неналични) и засегната дъщеря	77 г./ М	
35	NF1	Множество CALs	-	5 г./ Ж	

При всички негативни случаи от Таблица 22 беше проведена следваща стъпка, включваща секвениране по Sanger на 20-те дълбоко интронни варианти, намиращи се в некодиращите участъци на *NF1* гена, описани подробно като замени в Глава 3, Таблица 11. Всички те са съобщени в световната литература като патогенни [Svaasand *et al.*,

2015]. При двама от негативните пациенти за мутации в кодиращите и донор-акцептор сплайсинг участъците на *NF1* гена бяха открити два различни дълбоко интронни варианти, които са описани в Таблица 23.

**Таблица 23. Позитивни случаи за дълбоко интронни вариант в *NF1* гена.**

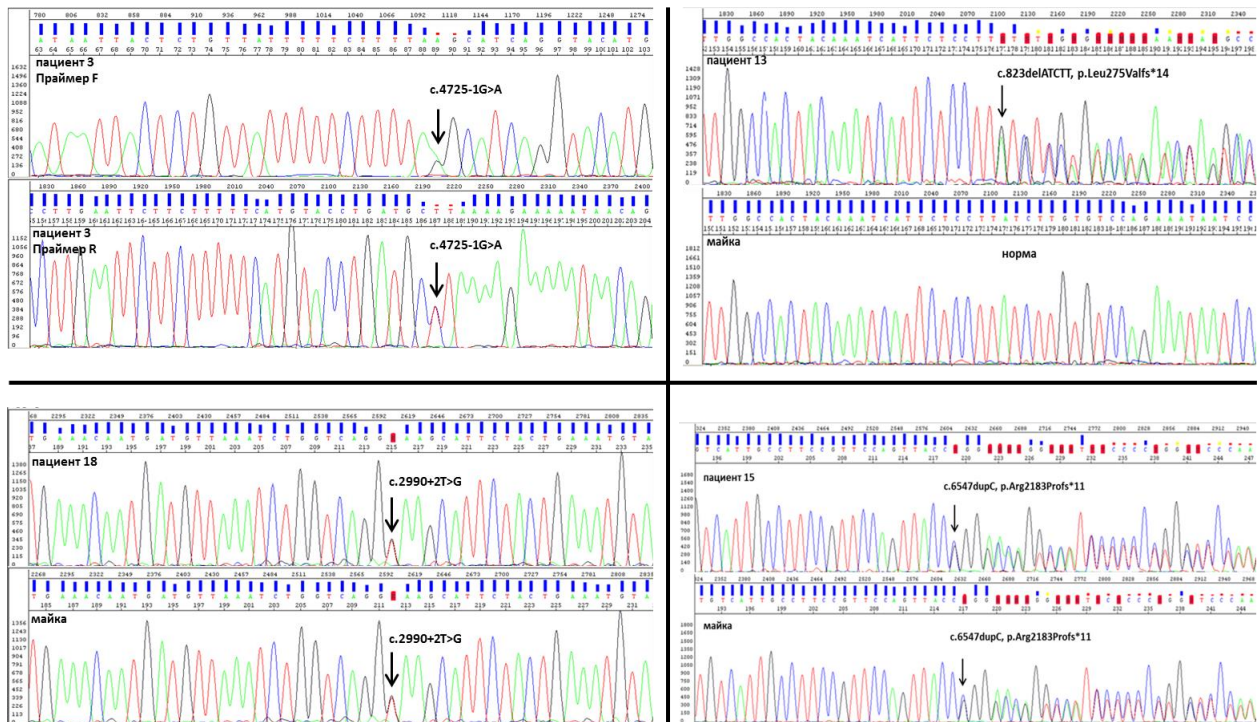
№	Диагноза	Клинични характеристики	Deep intronic варианти в <i>NF1</i> гена	Фамилност	Възраст/ Пол
30	NF1	CALs; сколиоза на дистална трета на лява тибия	c.5749+332A>G	De novo	3 г./ Ж
34	NF1	множество неврофиброми по цялото тяло, след 35 години броят им се увеличил, вероятен плексиформен неврофибром на дясната ръка; операция на шиен прешлен поради изгъняване	c.889-948T>G	майка, баща (неналични) и засегната дъщеря	77 г./ М

Единият от вариантите c.889-948T>G (маркиран в зелено в Таблица 23) е небулкикуван в световната литература.

При един от негативните случаи за NF1 (Пациент 27, Таблица 22), след като всички проведени генетични изследвания не доведоха до идентифициране на генетичен дефект и след преразглеждане на клиничната симптоматика, диагнозата беше ревизирана. Беше изказано предположение за Комплекс туберозна склероза, на базата на което пациентът беше изследван за мутации в *TSC2* гена. Беше открит патологичен вариант (виж по-долу), което доведе до генетично верифициране на случая, макар и с друга диагноза. Това доказва важността на клиничните критерии за поставяне на диагноза NF1 и нуждата пациентите да покриват тези критерии. В представения случай, който се оказа с диагноза TSC налице бяха само CALs.

#### 4.1.1.2. Резултати от молекулно-генетичен анализ

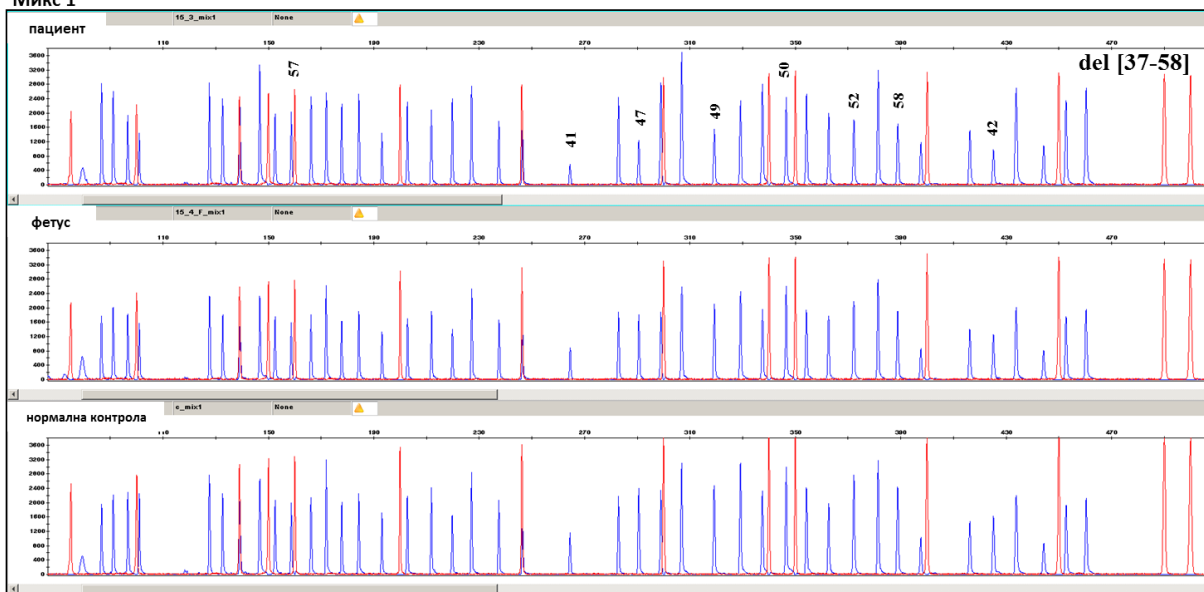
Мутациите c.4725-1G>A, c.2990+2T>G, c.823delATCTT, p.(Leu275Valfs\*14) и c.6547dupC, p.(Arg2183Profs\*11) открити в *NF1* гена бяха докладвани за пръв път от нашия екип. До момента няма данни в световната литература тези замени да са откривани от други изследователски групи. Секвенционни профили на четирите новооткрити мутации в *NF1* гена са представени на Фигура 25.



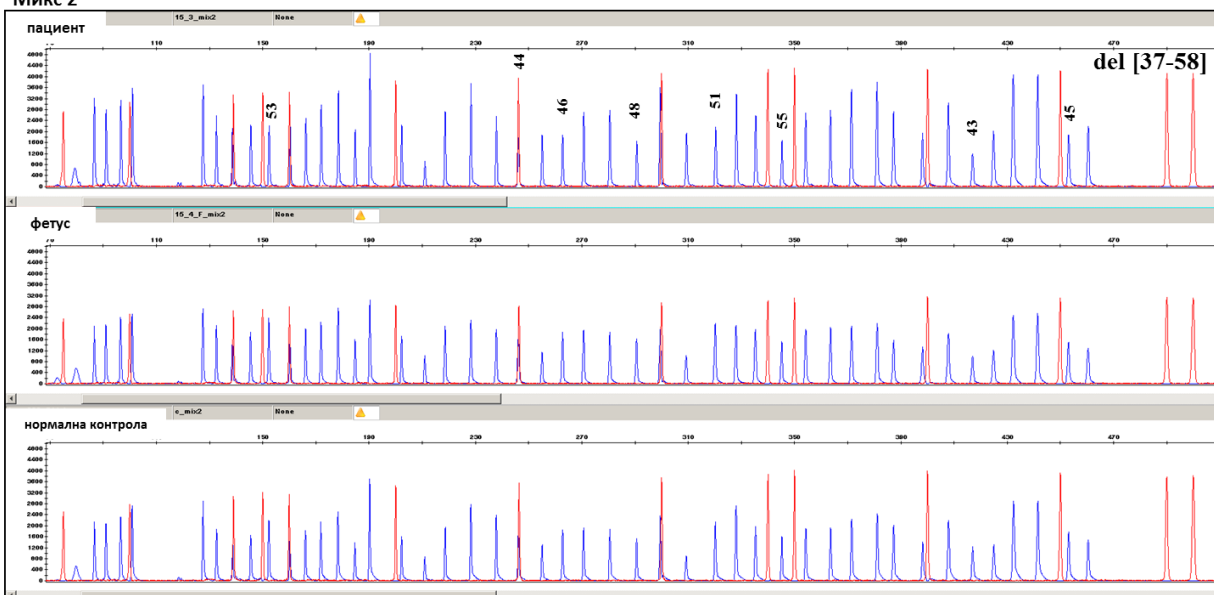
**Фигура 25. Секвенционни профили на четирите непубликувани мутации в *NF1* гена.**

След провеждане на MLPA анализ беше открита герминативна делеция на екзони от 37-ми до 58-ми (виж Таблица 21, Пациент 8). Резултатът е представен на Фигура 26. В същото семейство беше проведена и пренатална диагностика, която завърши с резултат за здрав фетус. Математическите калкулации за количествена оценка на получените генни фрагменти, доказващи наличие на делеция при прицелния пациент са представени в Таблица 24А и 24Б. Резултатът от изследване на фетуса е представен на Фигура 26 (фетус), а математическите обработки на резултатите са представени в Таблица 25А и 25Б.

Микс 1



Микс 2



Фигура 26. MLPA профил на делеция del[37-58] в *NF1* гена

В Таблица 24А и 24Б са представени изчисления от микс 1 и микс 2 към получения резултат на прицелния пациент представен на Фигура 26, докато в Таблица 25А и 25Б са представени изчисления към получения резултат на фетуса.

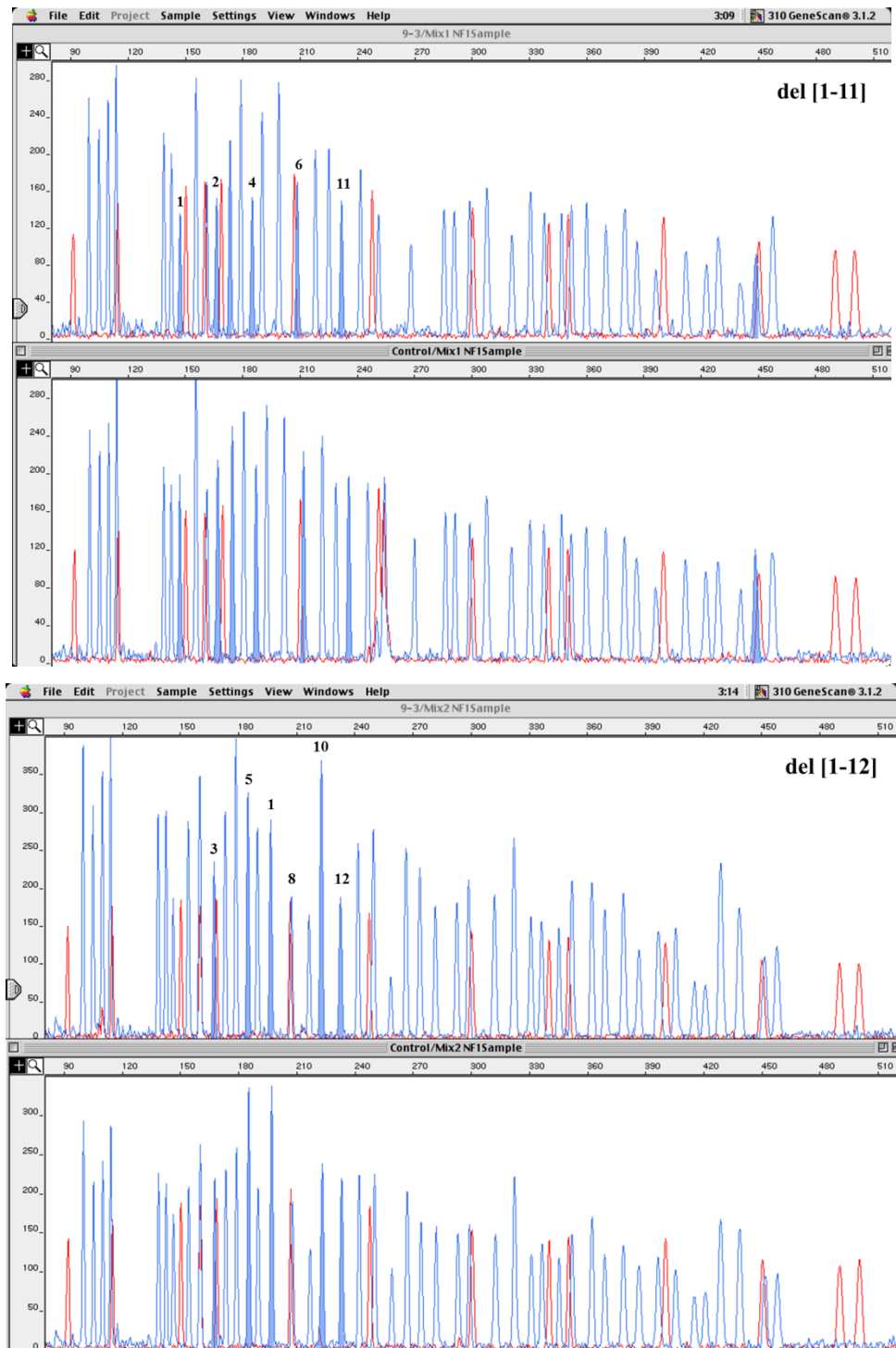
**Таблица 24. Математически калкулации за количествена оценка на получените генни фрагменти при прицелния пациент от Фигура 26.**

А mix1				Б mix2			
А	Б	А/Б	ехоп	А	Б	А/Б	ехоп
П/ср.РефП	К/ср.РефК			П/ср.РефП	К/ср.РефК		
0.701525569	0.667893624	1.05	1	0.487155084	0.418021559	1.17	1
1.052796705	0.921415066	1.14	28	0.557517973	0.556250372	1.00	30
0.620697623	0.683215672	0.60	57	0.541852105	0.744744208	0.63	53
0.638772356	0.667401349	0.96	2	0.519732968	0.487939968	1.07	3
0.790148244	0.719582462	1.10	32	0.623385827	0.612887857	1.02	34
0.724909755	0.678231391	1.07	4	0.908130777	0.877613007	1.03	5
0.835391559	0.789423927	1.06	35	0.518219788	0.489607528	1.06	36
0.746881852	0.756133854	0.99	6	1.224207463	1.289857662	0.95	1
0.69531238	0.839697475	0.63	37	0.573717905	0.568340182	1.01	8
0.944743693	1.01568566	0.93	11	0.234186922	0.311535942	0.65	38
0.629509055	0.749734284	0.64	39	0.986415611	1.007444464	0.98	10
0.596522668	0.563654468	1.06	26	0.681598768	0.884164136	0.57	40
0.213620749	0.439539723	0.49	41	0.499038001	0.649038175	0.57	44
0.900968949	0.825483044	1.09	13	0.524717562	0.511107141	1.03	12
0.476269211	0.962027724	0.50	47	0.527387881	0.723482818	0.53	46
1.45812259	1.258746266	1.16	15a	0.794241698	0.737478411	1.08	14
0.617195644	1.000917421	0.62	49	0.4822595	0.612590078	0.59	48
1.191068412	1.017224019	1.17	17	0.589917836	0.371568102	1.59	16
1.018341746	1.32544948	0.57	50	0.663262581	0.89369305	0.54	51
0.925878191	0.956120428	0.97	21	0.834830537	0.843725805	0.99	20
0.836125845	1.332095188	0.63	52	0.526097227	0.687034721	0.57	55
0.774163402	1.191489243	0.65	58	0.90345772	0.850812936	1.06	25
0.559017597	0.491167027	1.14	29	0.984679904	1.052289917	0.94	33
0.723949535	0.762779562	0.95	18	0.743550154	0.737240188	1.01	27
0.456048103	0.794592811	0.57	42	0.432013009	0.692037401	0.62	43
0.557379575	0.469876148	1.19	23	0.814002054	0.757846465	1.07	19
1.199992811	1.047745046	1.15	ivs36	1.644649093	1.67982848	0.98	ivs36
				0.784005478	1.047882794	0.55	45

**Таблица 25. Математически калкулации за количествена оценка на получените генни фрагменти при фетус от Фигура 26.**

А mix1				Б mix2			
А	Б	А/Б	ехоп	А	Б	А/Б	ехоп
П/ср.РефП	К/ср.РефК			П/ср.РефП	К/ср.РефК		
0.60946792	0.667893624	0.91	1	0.530595165	0.418021559	1.27	1
0.952163189	0.921415066	1.03	28	0.653619596	0.556250372	1.18	30
0.689636448	0.683215672	1.01	57	0.834210853	0.744744208	1.12	53
0.624580479	0.667401349	0.94	2	0.542072663	0.487939968	1.11	3
0.729504818	0.719582462	1.01	32	0.727087539	0.612887857	1.19	34
0.667039574	0.678231391	0.98	4	1.014981446	0.877613007	1.16	5
0.783190386	0.789423927	0.99	35	0.598085244	0.489607528	1.22	36
0.699999346	0.756133854	0.93	6	1.157314376	1.289857662	0.90	1
0.787220401	0.839697475	0.94	37	0.665515545	0.568340182	1.17	8
1.073927237	1.01568566	1.06	11	0.40338623	0.311535942	1.29	38
0.704173291	0.749734284	0.94	39	0.937149663	1.007444464	0.93	10
0.559884333	0.563654468	0.99	26	0.826140737	0.884164136	0.93	40
0.401850144	0.439539723	0.91	41	0.768872805	0.649038175	1.18	44
0.858825146	0.825483044	1.04	13	0.493353076	0.511107141	0.97	12
0.871994662	0.962027724	0.91	47	0.818548851	0.723482818	1.13	46
1.259811715	1.258746266	1.00	15a	0.840666946	0.737478411	1.14	14
1.027366162	1.000917421	1.03	49	0.738565037	0.612590078	1.21	48
1.012901284	1.017224019	1.00	17	0.499211382	0.371568102	1.34	16
1.388124538	1.32544948	1.05	50	1.049115046	0.89369305	1.17	51
0.961014831	0.956120428	1.01	21	1.065972621	0.843725805	1.26	20
1.263697801	1.332095188	0.95	52	0.752553237	0.687034721	1.10	55
1.074143131	1.191489243	0.90	58	1.08575935	0.850812936	1.28	25
0.491805853	0.491167027	1.00	29	0.889207197	1.052289917	0.85	33
0.796144008	0.762779562	1.04	18	0.767856568	0.737240188	1.04	27
0.731879649	0.794592811	0.92	42	0.60615536	0.692037401	0.88	43
0.519800069	0.469876148	1.11	23	0.746814489	0.757846465	0.99	19
1.121423852	1.047745046	1.07	ivs36	1.569189172	1.67982848	0.93	ivs36
				0.933861838	1.047882794	0.89	45

На Фигура 27 е представен резултат от MLPA анализ, показващ делеция на екзони от 1-ви до 12-ти, която е соматична, тъй като е възникнала в неврофиброматозната тъкан и не се открива в ДНК от венозна кръв на пациента (виж Таблица 21, Пациент 9).



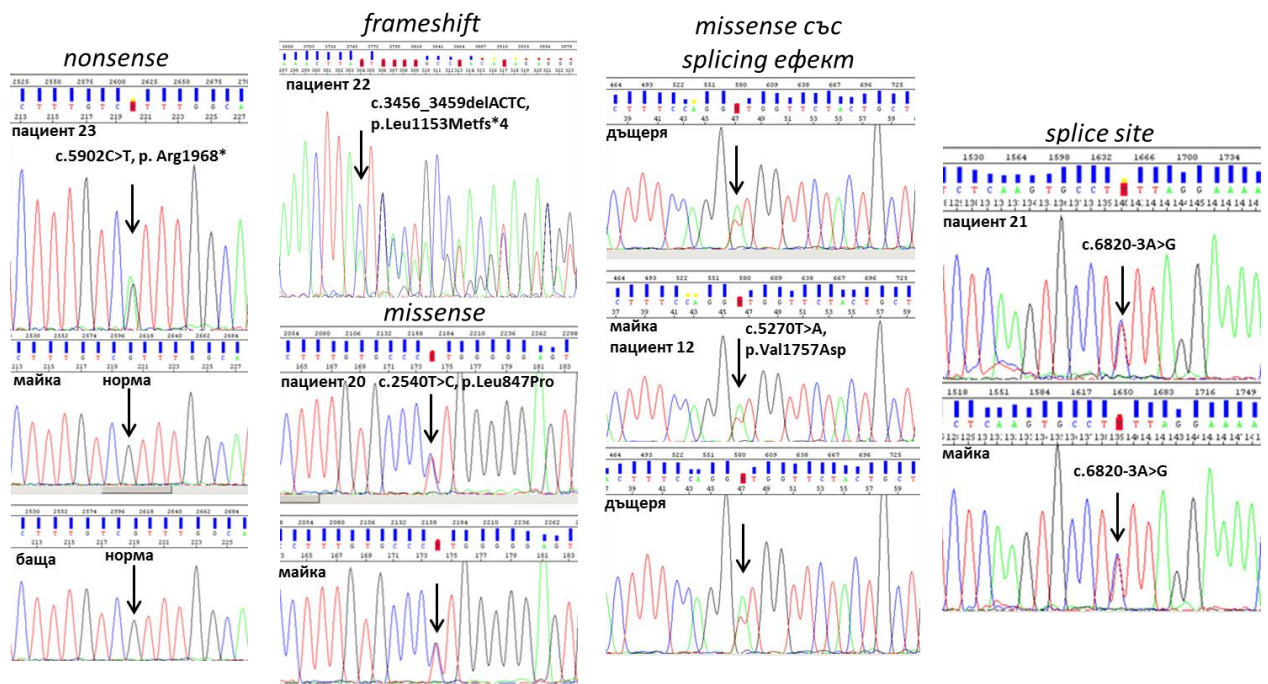
Фигура 27. MLPA профил на делеция del[1-12] в *NF1* гена

В Таблица 26А и 26Б са представени изчисления от микс 1 и микс 2 към получения резултат представен на Фигура 27.

**Таблица 26. Математически калкулации за количествена оценка на получените генни фрагменти от Фигура 27.**

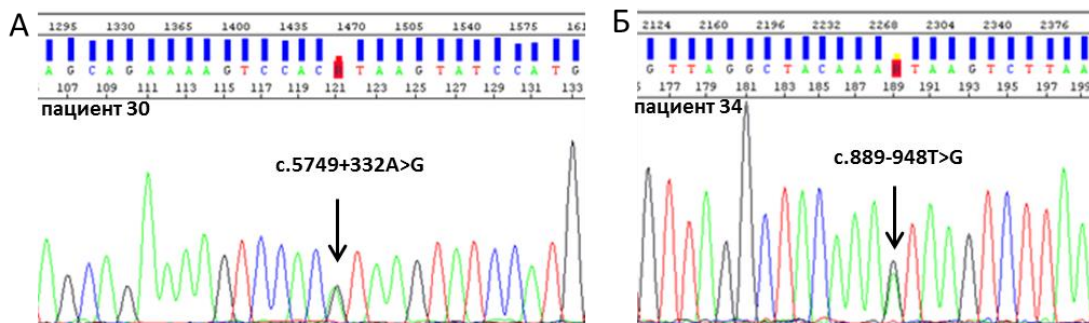
А				Б			
mix1				mix2			
А	Б	А/Б	ехон	А	Б	А/Б	ехон
П/ср.РефП	К/ср.РефК			П/ср.РефП	К/ср.РефК		
0.477185267	0.640690005	0.60	1	0.595406673	0.867747378	0.59	1
0.929906542	0.902993404	1.03	28	0.624457917	0.794958312	0.79	30
0.690764156	0.639201759	1.08	57	0.882467475	1.137607276	0.78	53
0.54535459	0.695010993	0.52	2	0.489556598	0.948164992	0.52	3
0.849367784	1.016100118	0.84	32	0.837308611	1.170982176	0.72	34
0.73886751	1.004194148	0.54	4	0.83817152	1.483752659	0.56	5
0.90324354	1.010519195	0.89	35	0.689751305	0.983129172	0.70	36
0.63166575	0.8207678	0.57	6	0.868085671	1.618841536	0.54	1
0.885376581	0.899272789	0.98	37	0.469709709	0.824518937	0.57	8
0.724573942	1.12139354	0.55	11	0.3883087	0.569280423	0.78	38
0.774051677	0.951361407	0.81	39	0.563191433	1.226289151	0.46	10
0.612424409	0.641434128	0.95	26	0.842773697	1.297806792	0.75	40
0.461242441	0.780957213	0.69	41	0.805956279	1.174478594	0.79	44
0.710280374	0.645898867	1.10	13	0.234998672	0.666226558	0.35	12
0.855415063	1.310772873	0.85	47	0.738649438	1.038754004	0.71	46
1.096481583	1.42462371	0.87	15а	0.660700062	0.930365046	0.71	14
0.740241891	1.072281414	0.89	49	0.663576423	0.815618964	0.81	48
0.864211105	0.836022324	1.03	17	0.827528985	1.123303748	0.74	16
0.98213304	1.332352444	0.84	50	0.99637136	1.226289151	0.81	51
0.851566795	0.879181465	0.97	21	0.865496947	0.836279616	1.03	20
0.884002199	1.04995772	0.84	52	0.59051686	0.800361867	0.74	55
0.800989555	0.974429224	0.82	58	0.794450836	1.068950341	0.74	25
0.495052226	0.542093692	0.91	29	0.661275334	0.763808406	0.87	33
0.537383178	0.699847793	0.77	18	0.499911497	0.676715812	0.74	27
0.579439252	0.830813462	0.80	42	0.321864767	0.543216216	0.79	43
0.368059373	0.385455775	0.95	23	0.358682184	0.590258931	0.71	19
0.621770203	0.906341958	0.69	ivs36	1.04325604	1.328956698	0.79	ivs36
				0.558013984	0.786694051	0.71	45

На Фигура 28 са представени секвенционните профили на част от детектираните патологични варианти в *NF1* гена при някои от изследваните пациенти. В зависимост от типа на мутацията те попадат в различни групи (Таблица 21). Всички тези генетични варианти са известни и описани в световната литература като патогенни [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=NF1%5Bgene%5D>].



Фигура 28. Секвенционни профили на различни типове мутации открити в *NF1* гена.

След извършване на секвениране по Sanger бяха открити два дълбоко интронни варианти в некодиращите участъци на *NF1* гена. Резултатите на двамата пациенти с дълбоко интронни варианти са представени на Фигура 29.



Фигура 29. Секвенционни профили: А) вариант c.5749+332A>G; Б) нов, неописван вариант c.889-948T>G.

#### 4.1.1.3. Дискусия

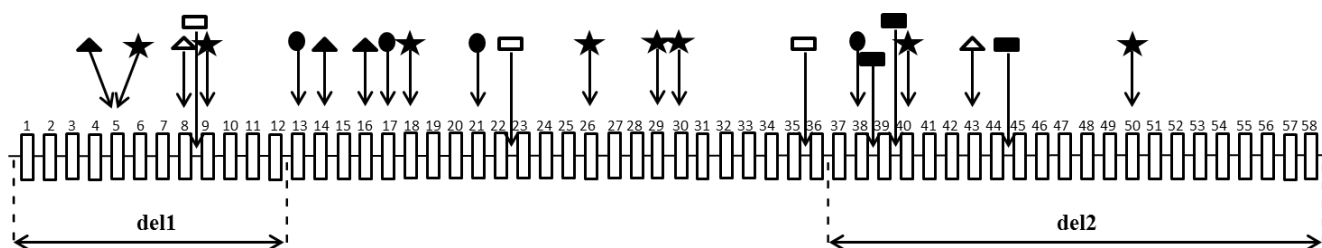
Швановите клетки, които са дефицитни на белтъка неврофибромин, кодиран от *NF1* гена се смятат за първични неопластични клетки. Неврофибромите са доброкачествени тумори на Швановите клетки и само една група от тези клетки могат да носят соматични мутации в *NF1* гена [Ferner and Gutman, 2013]. Нивата на неврофибромин са важни за развитието, диференциацията и функцията на меланоцитите. При загуба на едно копие на *NF1* гена се повишава транскрипцията на меланоцит-специфични гени, което може да доведе до промяна в пигментацията на кожата [Deo *et al.*, 2013]. Неврофиброминът участва и в контрола и диференциацията, както и в изпълнението на функциите на костните клетки, особено тези на остеокластите и остеобластите [Abramowicz and Gos, 2014].

По литературни данни разпределението на мутации в *NF1* гена е както следва: 5-10% от случаите са големи делеции, а 85-90% са точкови мутации включващи *missense*, *nonsense*, *splice site* и *frameshift* мутации [Wimmer *et al.*, 2006; Sabbagh *et al.*, 2013; Valero *et al.*, 2011].

В изследваната прицелна група от български пациенти с диагноза NF1, освен промени в кожната пигментация, най-често CALs и наличие на неврофиброми, се откриват и случаи със засягане на костите, като развитие на сколиоза и костни деформации (*sphenoid wing dysplasia*), резултат от наличие на *nonsense* мутации, които водят до скъсен или липсващ белтък. При други пациенти се наблюдават неспецифични за клиничната картина на NF1 изяви, като генерализирани тонично-клонични пристъпи (ГТКП)(Таблица 21, Пациенти 11, 17) и тежка умствена изостаналост с аутизъм (Таблица 21, Пациент 20)

В сравнение с *missense* мутациите, тези които предизвикват промяна в рамката на четене или така наречените *frameshift* мутации, водещи до преждевременно прекратяване на белтъчния синтез се асоциират с по-тежка клиника и съответно с по-голям брой CALs, развитие на Lisch нодули, засягане на костите, развитие на неврофиброми в различни части на тялото, ГТКП, мозъчни лезии и др. (Таблица 21).

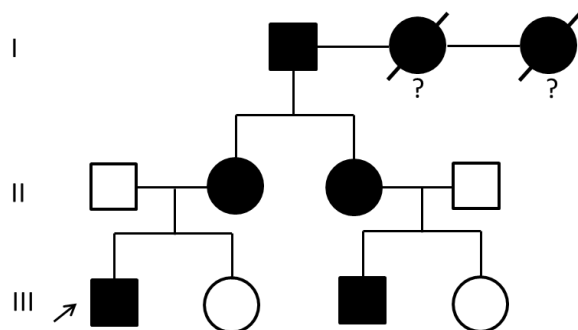
По-голямата част от откритите генетични варианти в *NF1* гена при изследваните български пациенти са *nonsense* (8/25 или 32%) и *frameshift* (6/25 или 24%), като повечето са концентрирани в началната част на *NF1* гена, в първата половина (до 30-ти екзон). На Фигура 30 е представено разпределение на откритите мутации в *NF1* гена при прицелната група пациенти.



**Фигура 30.** Графично представяне на откритите мутации в *NF1* гена. Запълнена звезда *nonsense* мутация, запълнен кръг *missense* мутация, запълнен триъгълник *frameshift* мутация, правоъгълник *splice site* мутация, празни символи нови, непубликувани до момента мутации. Хоризонталните линии показват двете големи делеции – del1 – соматична делеция на екзони 1-12; del2 – герминативна делеция на екзони 37-58.

За двете нови *splice site* мутации c.4725-1G>A и c.2990+2T>G, се смята, че засягат mRNA процесинга и вероятно водят до промяна в структурата на белтъка (по-дълъг, по-къс или липсващ белтък), което драстично променя неговата функция [Sabbagh *et al.*, 2013].

Интерес представлява родословието на пациента с генетично верифицирана *splice site* мутация c.2990+2T>G (Таблица 21, Пациент 18). Родословно дърво е представено на Фигура 31.



**Фигура 31.** Родословие при пациент с мутация c.2990+2T>G. Използвани са следните символи: квадрат - индивид от мъжки пол, кръг - индивид от женски пол, запълнен символ - засегнат индивид, незапълнен символ - здрав индивид, ? - неясен генотип, / - починал индивид. Индексният пациент е посочен със стрелка.

Тази мутация нарушаваща сплайсинга се свързва с изключително тежка клинична картина (засягане на ЦНС) при прицелния пациент с начало в много ранна възраст (Таблица 21, Пациент 18). На Фигура 32 са представени снимки на клиничните изяви при засегнатите роднини – майката и лелята на прицелния пациент, които включват тежко кожно засягане с множество неврофиброми и ПНи, които се увеличават след бременност и с напредване на годините. На база тежката фенотипна изява при индексния пациент включваща ранно начало и засягане на ЦНС, в сравнение с наблюдаваната клиника с кожна манифестация и засягане на ПНС, без наличие на

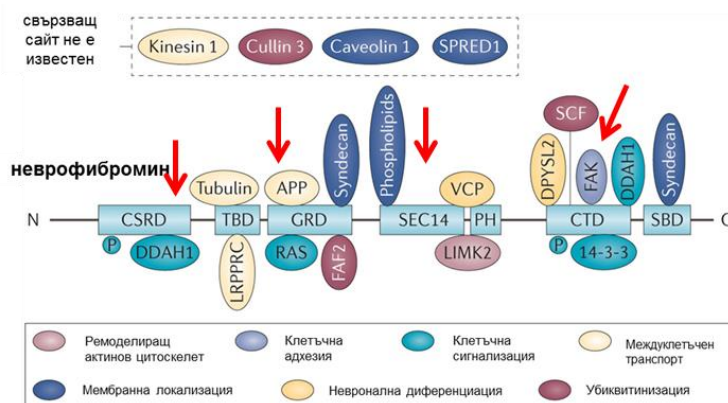
туморни формации в ЦНС при другите родственици, може да се заключи, че е налице тежка антисипация в родословието.



**Фигура 32. Клинична картина наблюдавана при роднини на Пациент 18, Таблица 21.**

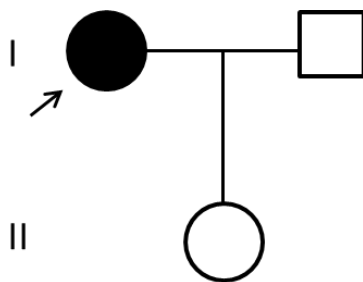
Откритата за пръв път делеция с.823delATCTT, p.(Leu275Valfs\*14) е локализирана преди CSRD домена на неврофибромин и е патогенна тъй като нарушава рамката на четене на генетичната информация (*frameshift* мутация) и предизвиква преждевременно прекратяване на синтеза на белтъка неврофибромин.

Четвъртата нова мутация представлява дупликация на един нуклеотид с.6547dupC, p.(Arg2183Profs\*11) и е локализирана в CTD домена, който участва в свързването с друг белтък наречен фокална адхезионна киназа (focal adhesion kinase, FAK) и вероятно засяга клетъчната адхезия, растеж, междуклетъчното сигнализиране и карциногенеза [Kweh *et al.*, 2009]. На Фигура 33 е представена схема на домените на белтъка неврофибромин, като на нея е отбелязано в кои от домените попадат четирите новооткрити мутации.



**Фигура 33. Схематично представяне на домените на белтъка неврофибромин. С червени стрелки са показани домените, в които попадат четирите новооткрити мутации [Ratner *et al.*, 2015]**

Обикновено мутациите причиняващи делеции на един или повече екзони от *NF1* гена са свързани с ранно начало, по-тежък фенотип и доживотен риск за злокачествена трансформация [Williams *et al.*, 2009; Deo *et al.*, 2013; Abramowicz and Gos 2014; Slattery, 2015; Ratner *et al.*, 2015]. Откритата герминативна делеция на екзони 37-58 (Таблица 21, Пациент 8) засяга С-терминалния хеликазен домен на белтъка и е свързана с кожна пигментация, ПН на кръста и остеоартрит, сходна клинична картина на друга съобщавана в литературата при този тип мутации [Trovó-Marquí and Tajara, 2006]. След потвърждаване на поставената диагноза NF1 и откриване на патологичен генетичен дефект, пациентката беше генетично консултирана за пренатална диагностика при бъдещи бременности. Такава беше осъществена при установяване на бременност. В материал изолиран от хорионни въси на плода беше осъществен MLPA анализ на *NF1* гена за изясняване на носителския статус на фетуса по отношение на откритата делецията при неговата майка. Такава не беше намерена при плода (Фигура 26). Родословното дърво на семейството е представено на Фигура 34.



**Фигура 34. Родословие при пациент с делеция на екзони 37-58 .**

Един от изследваните пациенти (Таблица 21, Пациент 9) беше с клинична картина, включваща множество неврофиброми, появяващи се на дясната ръка и датиращи от ранна възраст, които са били многократно отстранявани. Проведеният ДНК анализ във венозна кръв (секвениране по Sanger и MLPA анализ) не доведе до откриване на генетични изменения. На базата на локализиращия характер на неврофибромите и негативния резултат от генетичното изследване във венозна кръв, се насочихме към диагноза SNF1. При този вид NF клиничната изява е локализирана само в един сегмент на тялото и се очаква наличие на соматична мутация, възникнала в областта на формиране на неврофиброма. В последствие беше проведен анализ върху ДНК изолирана от свежа биопсия от неврофиброма. Беше установена соматична делеция на екзони 1-12 от *NF1* гена (виж Фигура 27). Мутацията беше проверена

отново във венозна кръв и резултатът беше негативен, което потвърждава соматичния ѝ произход.

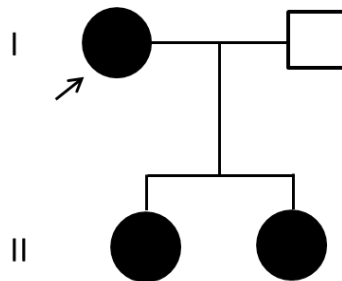
Първите пациенти описани със SNF1, локализирана в една част на тялото са от Gammel през 1931 година и Crowe и сътр. през 1956 година [Gammel, 1931; Crowe *et al.*, 1956]. През 1977 година Miller и Sparkes използват термина "сегментна неврофиброматоза" [Miller and Sparkes, 1977]. Поради разнообразието в клиничната изява на NF, Riccardi я класифицира в осем категории [Riccardi, 1982]. През 1987 г. Roth и сътр. подразделят NF в четири варианта: сегментна, локализирана с дълбоко засягане, наследствена и двустранна [Roth *et al.*, 1987]. Тип V е бил използван за SNF1. След това Gorlin и сътр. (1992) добавят още две категории: тип VIII "гастроинтестинален тип" и тип IX "неврофиброматоза/Нунан" форма [Gorlin *et al.*, 1992]. През 2015 Ruggieri и Pratico предлагат четири групи за мозаечната NF въз основа на клиничните данни [Ruggieri and Praticò, 2015]. Доказаният случай на соматична мутация, открита в *NF1* гена водеща до развитие на SNF1 в дясната ръка на пациентката е единственият генетично верифициран по рода си в България. Този случай съвпада с констатацията от епидемиологичните проучвания, според които жените са засегнати два пъти по-често, отколкото мъжете и дясната страна на тялото е по-често засегнати отколкото лявата страна [Puyas *et al.*, 2007]. Една от възможните причини за развитие на неврофиброми може да е соматичното инактивиране на *NF1* гена [García-Linares *et al.*, 2011]. Тази соматична мутация представлява *in-frame* делеция на екзони 1-12, локализирана преди CSRD домена. Същата делеция е съобщавана само веднъж в литературата от Laczmańska и сътр., но е открита в ДНК изолирана от венозна кръв, при 10 годишно момче, с лицев дисморфизъм и умствено изоставане, клинични характеристики не толкова типични за NF1 [Laczmańska *et al.*, 2014]. Този случай на SNF1 спада към случаите с клиничната категория "само неврофиброми", които представляват 52% от докладваните случаи [García-Romero *et al.*, 2016].

Преди настоящото проучване, единственият български случай с NF1, клинично описан в сетовната литература от български екип изследователи, е бил с изключително тежък фенотип, но без генетично верифицирана мутация в *NF1* гена [Dimitrova *et al.*, 2008].

В прицелната група български пациенти бяха открити четири *missense* мутации, което представлява 16% (4/25). Първата от тях с.1466A>G, p.Tyr489Cys е открита при пациент, който покрива само един от критериите за NF, а именно наличие на CALs.

Този тип мутации се свързват с относително лека клинична изява в сравнение с мутациите водещи до скъсен белтък [Sabbagh *et al.*, 2013], но при нашия пациент фенотипната изява включва и изоставане в нервно-психичното развитие и ГТКП, порядко срещани при NF1 (виж Таблица 21, Пациент 7). При останалите три *missense* мутации с.5270T>A, p.Val1757Asp, с.1885G>A, p.Gly629Arg и с.2540T>C, p.Leu847Pro се вижда, че клиниката на пациентите е свързана с тежка фенотипна изява, която покрива повече от един критерии необходим за поставяне на диагнозата (виж Таблица 21).

Възможно обяснение за вариант p.Val1757Asp може да е предполагаемият сплайсинг ефект на този вариант, тъй като замяната засяга втория нуклеотид на екзон 38 след акцепторното сплайс място и се очаква да оказва ефект върху сплайсинга [<http://www.ensembl.org>]. В това семейство, индексната пациентка (Пациент 12, Таблица 21) предава мутацията на двете си дъщери, които към момента на генетичното изследване са на възраст 15 и 14 години, съответно. По-голямата дъщеря има същата клинична изява като майка си, докато по-малката за момента има само CALs. На Фигура 35 е представено родословно дърво на това семейство.



**Фигура 35. Родословно дърво на семейство с мутация с.5270T>A, p.Val1757Asp**

Оценката на патогенния ефект на *missense* мутацията с.5270T>A (p.Val1757Asp) е представена на Фигура 37, като е използван софтуер за математическа обработка (PolyPhen-2 (v2.2.2r398) prediction of functional effects of human nsSNPs). Изчисленият коефициент на патогенност за варианта с.5270T>A е 1.000, което съответства на висока вероятност за патогенност (Фигура 36).



**Фигура 36. Резултат от онлайн предиктор, който използва два различни модела за предсказване. [<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>]**

Интересно е да се отбележи, че *missense* мутацията с.2540T>C, p.Leu847Pro разположена в екзон 21 попада в CSRD домена, който е вторият по важност функционален домен след GAP домена. При този тип мутация аминокиселината левцин (Leu) е заменена с аминокиселината пролин (Pro), различаващи се по физико-химичните си характеристики, което не води до изместване рамката на четене, но вероятно променя структурата на белтъка и повлиява неговата функция. Единствено при този изследван пациент от прицелната група, фенотипната изява включва тежко умствено изоставане с аутизъм, както и това, че е един от пациентите с епилепсия и глиом на ляв оптичен нерв (Таблица 21, Пациент 20). CSRD е домен, който включва свързващи места за цАМФ, което предполага възможната му роля в цАМФ сигнализация. По литературни данни в Швановите клетки при липса на NF1 може да се индуцира количеството на цАМФ, инхибирайки ГТФазен протеин участващ в клетъчната адхезия и синаптогенеза [Kim *et al.*, 2001]. Други проучвания показват, че инхибирането на цАМФ/ГТФазния път чрез Rho-RAC и абнормната организация на цитоскелета са в основата на неврокогнитивните проблеми при пациенти с NF1, което би обяснило фенотипната изява при Пациент 20 (Таблица 21) [Dasgupta *et al.*, 2003].

Общият брой генетично верифицирани случаи с клинична диагноза NF1 е 71% (25/35). Два от случаите се изясняват след секвениране по Sanger на 20-те дълбоко интронни варианти. При първия случай се наблюдава *de novo* възникнал дълбоко интронен, патогенен вариант с.5749+332A>G, с клинична изява включваща CALs и сколиоза на дистална трета на лява тибия (Пациент 33), публикуван в световната литература като патогенен [Svaasand *et al.*, 2015]. Във втория случай се открива нов, неопишван в световната литература дълбоко интронен вариант означен като с.889-948T>G (маркиран в зелено в Таблица 23), който е в близост до един от 20-те

публикувани варианти с.889-942G>T в интрон 8 на *NF1* гена. След анализ със софтуер за математическа обработка Human Splicing Finder (Version 3.0) най-близките места за възникване на ново splice site място са дадени в Таблица 27.

**Таблица 27. Резултат от онлайн предиктор Human Splicing Finder (Version 3.0)**

cDNA позиция	Splice site тип	Криптично място – ако се използва показва с колко ще се промени екзона	Вариация (%)
-959	Акцептор	+947	Ново място +68.42
-952	Акцептор	+940	-2.4
-951	Донор	+939	Ново място +63.84

От таблицата се вижда, че откритият генетичен вариант създава ново splice site място с вероятност 68% и 64%. Предполага се, че при наблюдаваните проценти съществува голяма вероятност за фенотипна изява. За да се потвърди патогенният ефект на открития вариант е необходимо допълнително извършване на сегрегационен анализ в семейството и функционални изследвания. По данни на пациента случаят е фамилен със засягане в три поколения, но останалите засегнати роднини не са налични за генетичен анализ.

Интересно е да се отбележи, че фенотипните изяви при тези два случая с дълбоко интронни варианти са съществено различни и в клиничен и във възрастов аспект (Таблица 23, Пациент 33 и 34). При Пациент 33 на 3 г.в. се манифестира кожно и костно засягане, докато при Пациент 34 на 77 г.в. освен кожно и костно засягане, е засегната и ПНС (Таблица 23).

### **Генотип-фенотипни корелации**

*Nonsense* мутациите се откриват при пациенти на възраст между 4 и 44 години и представляват 32% (8/25). При 3 от случаите мутациите са *de novo* (Таблица 21). Само при един от пациентите клиничната изява включва единствено CALs (Таблица 21, Пациент 6), при всички останали се наблюдава тежка клинична изява независимо от локализацията на откритата мутация, като при 5 пациента е засегната опорно-двигателната система, а при 4 от тях е налице сколиоза (Таблица 21, Пациенти 2, 4, 14 и 19).

*Frameshift* мутациите се откриват при пациенти на възраст между 3 месеца и 24 години и представляват 24% (6/25). При 3 от случаите мутациите са *de novo*. Мутацията в екзон 5 е открита при пациент на 3 месечна възраст с клиника включваща само CALs,

докато тази в екзон 8 е доказана при пациент на 17 г.в., с тежка клинична изява, а мутацията в екзон 14 е намерена при пациент на 16 г.в. и е асоциирана с изключително тежка фенотипна изява (Таблица 21). Мутацията в екзон 16 от CSRD домена, както и тези в екзон 26 от TBD домена и екзон 43 от FAK домена са свързани с по-тежка клинична изява (Таблица 21). При Пациент 22 с мутация в 26 екзон от TBD домена, вероятната причина за тежката фенотипната изява е липсата на функционално място в TBD домена на белтъка, което нарушава свързването на тубулин и по този начин повлиява регулацията на Ras сигналния път и клетъчната организация, функция и растеж [Bollag *et al.*, 1993]. При този пациент още на 3 г.в., в момента на генетичното изследване, клиничната изява е изключително тежка, включваща билатерални оптични глиоми, туморна формация дясно темпорално и супратенториално, две лезии и задръжка в речта. Мутацията открита при него е *de novo* възникнала.

*Missense* мутациите се откриват при пациенти на възраст между 3 и 41 години и представляват 16% (4/25). Нито една от откритите мутации не е *de novo*. Мутацията с.1466A>G, р.Тур489Cys в екзон 13 е открита при пациент на 3 г.в. като в момента на извършване на генетичното изследване се покрива единствено клиничен критерий за CALs, вероятно поради ранната възраст на пациентката, като е възможно останалите характерни симптоми на заболяването да се развият в по-напреднала възраст или да бъдат открити след провеждане на ЯМР. Налице обаче са изоставане в нервно-психично развитите и ГТКП, поради което при този пациент би било подходящо извършване на образна диагностика, с цел проследяване на ЦНС. Мутациите в екзон 17 и 21 попадат в CSRD домена и са свързани с относително тежка фенотипна изява (Таблица 21, Пациенти 16 и 20). Откритата мутация в 38 екзон не е известно кой домен засяга, но се вижда, че е свързана с тежка фенотипна изява и се предава от майка на дъщери (Таблица 21, Пациент 12). Три от петте пациенти с нервно-психично разстройство било то в по-лека или по-тежка форма, със или без аутизъм са с генетично верифицирани мутации от типа *missense* (Таблица 21, Пациенти 7, 16 и 20).

*Splice site* мутациите се откриват при пациенти на възраст между 2 и 35 години и представляват 12% (3/25). И трите детектирани мутации са свързани с тежка фенотипна изява предаваща се в поколенията. Новооткритата *splice site* мутация с.2990+2T>G е фамилна, засягаща три поколения, като фенотипната изявата при прицелния пациент е с изключително ранно начало, още на 2 г.в. (Таблица 21, Пациент 18). Допълнително доказаните два случая след анализ на 20-те дълбоко интронни

варианти допълнително увеличават процента на *splice site* мутациите, при което той става общо 20% (5/25) (Таблица 23, Пациент 30 и 34).

#### 4.1.1.4. Обобщение на резултатите от NF1

В рамките на настоящия дисертационен труд е извършено молекулно-генетично охарактеризиране на пациенти с диагноза NF1. За България това е първото по рода си проучване за това заболяване. При 25 от 35 изследвани семейства или общо при 71%, клинично поставената диагноза беше потвърдена чрез секвениране по Sanger или MLPA анализ на *NF1* гена (25/35 или 71%). Това показва, че нашите пациенти са много добре клинично изяснени и правилно подбрани. Идентифицирането на мутацията, причиняваща фенотипната изява, позволява проследяване на дефекта в семейството, дори и пренатално, както беше направено в едно от засегнатите семейства. Впечатление прави, че в част от родословията се наблюдава тежка антисипация при предаването на една и съща мутация в поколението (пример е семейството с новооткритата *splice site* мутация с.2990+2T>G). Този феномен подчертава важността на генетичното изследване и пренаталната диагностика в засегнатите семейства, а адекватното медико-генетично консултиране е истинско предизвикателство. Като най-чести типове генетични дефекти в изследваната прицелна група се наблюдават *nonsense* мутациите с честота 32% (8/25), след тях са *frameshift* мутациите 24% (6/25), следвани от *splice site* мутации 20% (5/25) и *missense* мутации 16% (4/25). От генетично верифицираните български случаи 92% са точкови мутации, докато само 8% от мутациите са големи делеции, което съответства на литературните данни за типа на мутациите в *NF1* гена. Около 72% от генетично верифицираните случаи засягат жени и само 28% засягат мъже. Най-младият пациент е на 3 месечна възраст, докато най-възрастният е на 77 г.в., което показва широкият възрастов диапазон, в който пациентите според тежестта на клиничната симптоматика биват насочени за генетични изследвания.

#### 4.1.2. Неврофиброматоза тип 2 (NF2).

##### 4.1.2.1. Изследвана група пациенти

В рамките на настоящия труд бяха изследвани 6 неродствени пациента с клинична диагноза NF2 от 6 семейства. В анализирания група бяха открити 3 мутации в *NF2* гена, едната *in-frame* делеция открита за първи път от нашия екип и две добре известни в световната литература *nonsense* мутации, описвани като патогенни. Клиничните характеристики на 3-те генетично верифицирани случая с открити мутации в кодиращите последователности на *NF2* гена са представени в Таблица 28.

**Таблица 28. Клинични и молекулно-генетични данни на пациентите с диагноза NF2, с открити мутации в кодиращите последователности на *NF2* гена.**

№	Клинични характеристики	Локализация	Тип замяна	Мутации в <i>NF2</i> гена	Фамилност	Възраст/Пол
1	1 CAL; кожни лезии по челото и окосмената част на главата; глиом в ляв оптичен нерв; унилатерален шваном на 8ми черепно-мозъчен нерв; интракраниални менингеоми в ляво мезиотемпорално; епилепсия-миоклонични и ГТКП; миопия	Екзон 6	nonsense	c.592C>T, p.(Arg198*)	De novo	18 г./ Ж
2	дясно париетален менингеом; билатерален вестибуларен шваном (29 мм вдясно и 19 мм в ляво); лезия в малкия мозък (10мм) и мултифокална лезия на нивото на церебралния педункул вдясно; хемипареза в ляво; симптоматична епилепсия	Екзон 8	nonsense	c.784C>T, p.(Arg262*)	De novo	13 г./ М
3	Билатерални вестибуларни шваноми	Екзон 11	In-frame делеция	<b>c.1070_1072delAGA, p.(Glu357_Arg358delinsGly)</b>	De novo	45 г./ Ж

**Легенда:** CALs – „café au lait“ петна кафе с мляко; ГТКП – генерализирани тонично-клонични пристъпи. В червено е отбелязана нова, непубликувана мутации

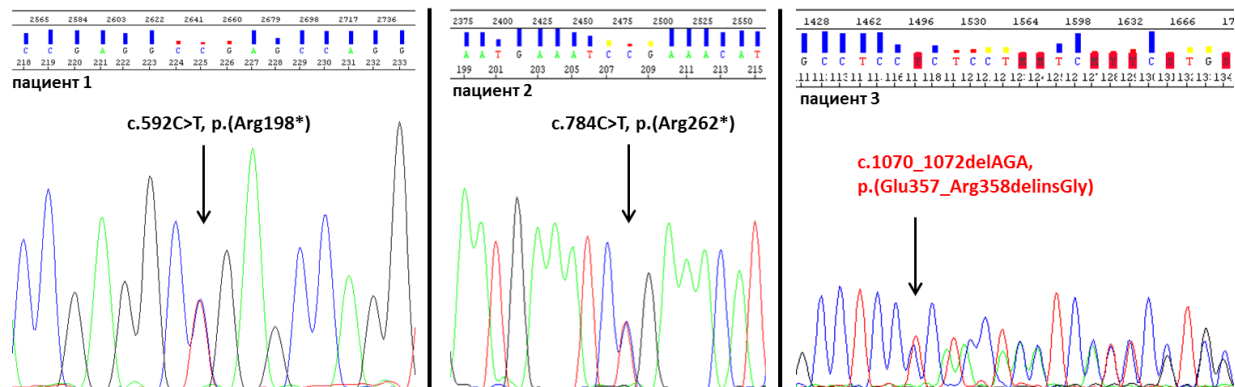
При 3 от всички изследвани случаи след молекулно-генетичен анализ чрез секвениране по Sanger и MLPA анализ не бяха открити генетични изменения в *NF2* гена. Негативните случаи са представени в Таблица 29.

**Таблица 29. Клинични данни на случаите негативните за мутации в *NF2* гена.**

№	Клинични характеристики	Мутации в <i>NF2</i> гена	Фамилност	Възраст/Пол
1	1 мозъчен тумор неопределен	няма	-	27 г./ Ж
2	менингиом Тх7; 1,5-2см. (опериран), менингиом на ТН9, 10 (оперирани), менингиом в малък мозък - 6см (опериран), шваном на лопатка	няма	-	62 г./ Ж
3	<i>гръцки произход</i> Липса на клинично описание	няма	баща с CALs, неврологични и скелетни проблеми	новородено

#### 4.1.2.2. Резултати от молекулно-генетичния анализ

Мутацията c.1070\_1072delAGA, p.(Glu357\_Arg358delinsGly) е открита за първи път от нашия екип, докато другите две мутации c.592C>T, p.(Arg198\*) и c.784C>T, p.(Arg262\*) в *NF2* гена са откривани и от други изследователски групи и описвани като патологични в световната литература [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>]. Секвенционните профили на трите мутации в *NF2* гена са представени на Фигура 37.



**Фигура 37.** Секвенционни профили на трите мутации открити в *NF2* гена. Новооткритата мутация е отбелязана в червено.

Мутацията открита при Пациент 1 на 16 г.в. попада в екзон 6 на *NF2* гена и е *de novo* възникнала. Мутацията открита при Пациент 2 на 13 г.в. е локализирана в екзон 8 на *NF2* гена и също е *de novo*. И двете мутации са точкови мутации, които генерират стоп кодон (*nonsense*) в позиции съответно 198 и 262, и по този начин причиняват преждевременно прекратяване на белтъчната синтеза, водещо до скъсен или напълно липсващ белтък.

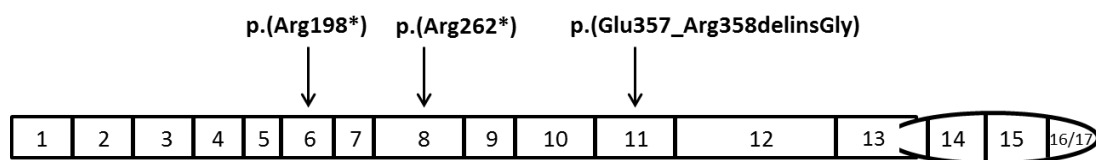
Третата мутация, която беше открита от нашия екип при Пациент 3 на 45 г.в. представлява *in-frame* делеция на три бази, която предизвиква загуба на аминокиселината аргинин (Arg) в позиция 358 като на нейно място се инсерира аминокиселината глицин (Gly). В този смисъл, тази *in-frame* делеция има ефект аналогичен на *missense* мутация (аминокиселинна замяна).

#### 4.1.2.3. Дискусия

В прицелната група от 6 пациенти с предполагаема клинична диагноза NF2, при трима от тях бяха открити две *nonsense* и една *in-frame* делеция (Таблица 28) [Evans *et al.*, 1998]. За *nonsense* мутациите се знае, че водят до продукцията на нестабилен мерлин [Evans, 2009]. Пациенти носещи мутации, които водят до нарушаване рамката

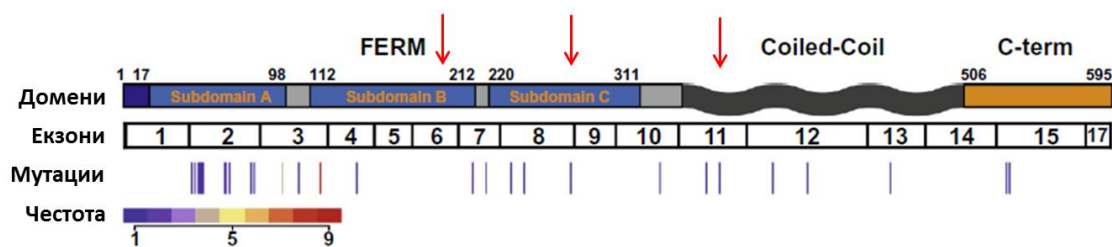
на четене на генетичната информация и предизвикват преждевременно прекратяване на белтъчния синтез, като *nonsense* или *frameshift*, обикновено се характеризират с ранна клинична изява, развитие на по-голям брой менингиоми и спинални тумори. Такава е и наблюдаваната фенотипна изява при Пациенти 1 и 2 (Таблица 28). Развитието на туморни формации преди 20 г.в., каквито се наблюдават при двамата пациенти с *nonsense* мутации, ги отнася към така наречения тежък тип (Wishart тип), при който заболяването е с ранна изява и множество тумори, повече от 3 [Ruggieri, 1999; Ruggieri and Praticò, 2015]. Наличието на повече от един тип тумори при пациенти с NF2 се свързва с агресивна изява на заболяването [Slattery, 2015].

На Фигура 38 е представено разпределение на откритите мутации в *NF2* гена.



**Фигура 38.** Графично представяне на откритите мутации в екзоните на *NF2* гена.

Известно е, че биохимичната функция на белтъка мерлин се регулира по 3 механизма – посттранслационна модификация, по локализация на белтъка и по взаимодействия с ефектори, разположени надолу в сигналната верига (downstream). Както беше споменато мерлин е съставен от глобуларен аминок-терминален FERM-домен и карбокси-терминална хидрофилна опашка, свързани посредством флексибилен coiled-coil сегмент. Този FERM-домен е структурен аналог на ERM протеините, тъй като съдържа ERM последователност. На Фигура 39 са представени домените на белтъка мерлин, като на нея е отбелязано в кои от домените попадат трите открити мутации.



**Фигура 39.** Графично представяне на откритите мутации (маркирани с червени стрелки) в трите домена на белтъка мерлин и честота на откриваните мутации по литературни данни в екзоните на *NF2* гена [Cooper and Giacotti, 2014].

Мутации във FERM-домена на мерлин се срещат по-често, докато мутациите в карбокси-терминалния край на мерлин значително намаляват по брой, а в хеликазния са още по-редки, което показва, че FERM-домена играе основна роля в туморната супресия [Cooper and Giancotti, 2014]. Известно е също, че FERM-домена е отговорен за инхибиторния ефект върху клетъчния растеж. Двете *nonsense* мутации попадат именно във FERM-домена на белтъка мерлин и са свързани с по-тежка фенотипна изява при засегнатите пациенти, докато *in-frame* мутацията при Пациент 3 е локализирана в  $\alpha$ -хеликазния домен на мерлин, където попадат значително по-малък брой мутации [Baser *et al.*, 2005]. *Nonsense* мутациите и в двата случая водят до стоп кодони съответно в позиции 198 и 262, което се свързва със синтез на скъсен или липсващ нестабилен белтък. Той се разпознава от системите за протеазомна деградация и се разгражда. Клетките дефицитни на мерлин биха били с нарушена функция на инхибиране на клетъчния растеж (Фигура 11 от раздел „Литературен обзор“). При повечето пациенти с мутации водещи до скъсен или липсващ белтък и друг тип мутации, които са локализирани във FERM-домена се знае, че се засяга ролята на белтъка в анти-митогенната сигнализация и туморната супресия [Cooper and Giancotti, 2014].

Откритата от нашия екип *in-frame* мутация е локализирана в екзон 11 на *NF2* гена, който попада в  $\alpha$ -хеликазния домен. Мутацията е делеция на три бази, която води до загуба на аминокиселината Arg в позиция 358, като на нейно място се инсерира аминокиселината Gly. Тъй като аминокиселината Gly има по-проста структура (водороден атом) в сравнение с Arg (допълнителна базична група), тази драстична разлика в аминокиселинната композиция вероятно повлиява физикохимичните свойства на белтъка. Тъй като мутацията е локализирана в домен, който участва в свързването на N- и C-терминалните домени, бихме могли да спекулираме, че се повлиява конформацията на белтъка. По литературни данни конформационни промени на белтъка мерлин могат да го превърнат в по-затворена форма, което да доведе до намалено инхибиране на клетъчния растеж. От друга страна, при дефект в свързването между домовете, може да се получи по-отворена форма, което да доведе до по-активно инхибиране на клетъчния растеж. За нашата новооткрита мутация не може да се каже как точно ще повлияе на белтъчната молекула, тъй като са необходими допълнителни анализи, а е известно също така, че мерлин участва в много по-строга регулация включваща участие на епигенетични фактори, посттранслационна модификация и това, че белтъкът функционира в зависимост от локализацията му. Като фенотипна изява

при изследвания пациент налице е типичната клиника за NF2, включваща БВШи (Таблица 28, Пациент 3). За биохимичните механизми, залегнали в основата на функционирането на белтъка мерлин и участието му в потискане на клетъчния растеж и пролиферация вече са известни и описани два модела на регулация опосредствани от функциите на белтъка в ядрото на клетката или извън него (cortex) [Cooper and Giancotti, 2014].

### **Генотип-фенотипни корелации**

Честотата на NF2 е около 1:33/40 000 индивида, а в някои държави тя е още по-ниска. Това го прави много по-рядко в сравнение с NF1 [Evans, 2009], което обеснява и малкия брой засегнати български пациенти, в резултат на което само три генетично верифицирани случая бяха докладвани от нашия екип. При 100% (3/3) от тези български случаи мутациите са *de novo* възникнали и не са унаследени от родителите.

Известно от литературата е, че герминативни мутации възникват обикновено в първите 15 екзона на NF2 гена и много по-рядко, почти никога в екзон 16 и 17. Най-често срещаните мутации са *nonsense* в CpG острови, както се вижда и при нашите генетично верифицирани случаи, където при двама от тях се откриват *nonsense* мутации (2/3 или 67%), като и в двата случая заменена е именно азотната база цитозин (C – азотна база). Съществува и относително строга генотип-фенотипна корелация в зависимост от типа и позицията на NF2 мутацията [Baser *et al.*, 2005; Selvanathan *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2011; Evans *et al.*, 1998; Hexter *et al.*, 2015]. Известно е, че тези мутации намиращи се в началните екзони на гена се свързват с по-тежка клинична изява, както се наблюдава и при Пациент 1 с мутация в екзон 6 и при Пациент 2 с мутация в екзон 8 на NF2 гена (Таблица 28, Фигура 38) [Cooper and Giancotti, 2014]. В сравнение с тези два случая непубликуваната *in-frame* делеция в екзон 11 беше открита при Пациент на 45 г.в. с по-лека клинична изява включваща само БВШи (Пациент 3, Таблица 28).

#### **4.1.2.4. Обобщение на резултатите от NF2**

В рамките на настоящия труд е извършено молекулно-генетично охарактеризиране на пациенти с диагноза NF2. За България това е първото по рода си проучване за това заболяване. При трима пациенти от шест изследвани семейства или общо при 50% (ако бъде изключен случая от гръцки произход – 60% (3/5)), клинично

поставената диагноза беше потвърдена чрез секвениране по Sanger или MLPA анализ на *NF2* гена. Като най-чести типове генетични дефекти в изследваната група се наблюдават *nonsense* мутациите с 67% (2/3), след тях са *in-frame* мутациите с 33% (1/3). От генетично верифицираните случаи 67% засягат жени, а 33% засягат мъже. Една от откритите мутации е нова за световната литература представляваща *in-frame* делеция локализирана в  $\alpha$ -хеликазният домен на мерлин, мутации в който са изключително редки. Навременното потвърждаване на поставената клинична диагноза с помоща на молекулно-генетичен анализ би позволил навременна профилактика при пациенти с тежка клиника особено в ранна детска възраст.

## 4.2. Комплекс туберозна склероза

### 4.2.1. Изследвана група пациенти

В рамките на настоящия труд бяха изследвани 21 пациенти с клинична диагноза TSC от общо 21 семейства. В анализираната група бяха открити общо 19 мутации: 11 в *TSC2* гена и 8 в *TSC1* гена. Четири от 11-те мутации в *TSC2* гена са нови мутации, от които 2 са *nonsense*, 1 *frameshift* и 1 голяма делеция, а останалите 7 са известни и описвани в световната литература. Две от 8-те мутации в *TSC1* гена са нови мутации, от които 1 е *nonsense* и 1 е *frameshift*, останалите 6 са известни и описвани в световната литература.

След секвениране по Sanger и последващ MPLA анализ на общо 21 пациента в *TSC2* гена бяха открити общо 11 различни генетични варианти. Клиничните характеристики на генетично верифицираните 11 случая с открити мутации в кодиращите последователности на *TSC2* гена са представени в Таблица 30.

**Таблица 30. Клинични и молекулно-генетични данни на пациентите с диагноза TSC, с открити мутации в кодиращите последователности на TSC2 гена.**

№	Клинични характеристики	Локализация	Тип замяна	Мутации в TSC2 гена	Фамилност	Възраст/ пол
1	белодробен аденокарцином; множество чернодробни лезии	Екзон 4	missense	c.275A>T, p.Glu92Val	неналични родители	35 г.в./ Ж *
2	2 ХПа; 1 САЛ; <b>ФЕ</b>	Екзон 34	frameshift (делеция)	c.4473delA, p.Val1492Cysfs*84	майка носителка само с 2 ХПа	2 г.в./ Ж
3	2 ХПа; ЛАи; перивентрикуларни калцификати; <b>ГТКП</b>	Инtron 25	splice site	c.2838-122G>A	неналични родители	43 г.в./ М
4	ХПа; 2 хиперпигментни петна; сърдечен рабдомиом; лимфоподобни образувания в тилната област; <b>епилепсия</b>	Екзон 37	nonsense	c.4830G>A, p.Trp1610*	De novo	4 месеца/ Ж
5	> 5 ХПа; ЛАи; УФ; ШП; КД; СЕГА - оперирана; субependимни нодули; <b>ФЕ с вторична генерализация; интелектуален дефицит с аутизъм</b>	Екзон 17	missense	c.1769T>C, p.Leu590Pro	неналични родители	5 г.в./ Ж
6	ХПа; ЛАи; билатерални ретинални хамартоми; множество субependимни и субкортикални тубери; <b>ФЕ с вторична генерализация</b>	Екзон 34	nonsense	<b>c.4051G&gt;T, p.(Glu1351*)</b>	Майка носителка	15 г.в./ М
7	ХПа; 3 сърдечни рабдомиоми; <b>West синдром; интелектуален дефицит</b>	Екзон 38	missense	c.4949A>G, p.Tyr1650Cys	Майка носителка (мозаечен профил)	1 г.в./ М
8	ХПа; ЛА; ШП; СЕГА; субкортикални тубери; <b>West синдром; ГТКП; интелектуален дефицит с аутизъм</b>	Екзон 42	missense	c.5228G>A, p.Arg1743Gln	Брат носител неналични родители	17 г.в./ М
9	ХПа; ЛАи; субependимни нодули с калцификация; <b>ФЕ</b>	Екзон 26	frameshift (дубликация)	<b>c.2954_2957dupATGT, p.(Val987Cysfs*19)</b>	Баща носител	10 г.в./ Ж
10	ХПа; ЛАи; ШП; УФи; субependимни нодули и субкортикални тубери; СЕГА; фибром на ляв клепащ; <b>генерализирана епилепсия; интелектуален дефицит</b>	Екзон 18	frameshift (indel)	<b>c.2066_2073del8, insACGGGCAGGGA CCTCGCTGGGfs*18, p.(Leu689Hisfs*17)</b>	De novo	16 г.в./ М
11	ХПа; ЛАи; множество кортикални тубери; бъбречни ангиомиолиптоми; СЕГА; <b>ФЕ с вторична генерализация</b>	Делеция 1-16 екзон	deletion	<b>1-16 екзон</b>	De novo	15 г.в./ Ж

**Легенда:** ХП(а) – хипопигментно(а) петно(а); ЛА(и) – лицев(и) амгиофибром(и); УФ – унгвален фибром; ШП – Шагренови петна; СЕГА – субependимален гигантоклетъчен астроцитом; КД – кортикална дисплазия (включва кортикални тубери и радиерно разположени миграционни линии в бяло мозъчно вещество); ФЕ – фокална епилепсия; ГТКП – генерализирани тонично-клонични пристъпи. \* починал пациент. В червено са отбелязани всички нови, непубликувани мутации.

От всички 21 пациенти, 11 се изясняват на молекулно ниво след секвениране по Sanger и MPLA анализ на TSC2 гена. Останалите 10 негативни пациента за TSC2 са подложени на скрининг за мутации в TSC1 гена. След секвениране по Sanger на TSC1 гена бяха открити 8 различни генетични варианти. Клиничните характеристики на генетично верифицираните 8 случая с открити мутации в кодиращите последователности на TSC1 гена са представени в Таблица 31.

**Таблица 31. Клинични и молекулно-генетични данни на пациентите с диагноза TSC, с открити мутации в кодиращите последователности на TSC1 гена.**

№	Клинични характеристики	Локализация	Тип замяна	Мутации в TSC1 гена	Фамилност	Възраст/пол
12	ХПа; КД; субependимни нодули; <b>терапевтично резистентна епилепсия – West синдром; интелектуален дефицит</b>	Екзон 15	nonsense	<b>c.1966G&gt;T, p.(Gly656*)</b>	Засегната майка (неналична)	5 г.в./Ж
13	ХПа; множество субкортикални тубери; субependимни нодули с калцификация; <b>терапевтично резистентна епилепсия; интелектуален дефицит с аутизъм</b>	Екзон 5	nonsense	c.325C>T, p.Gln109*	Майка носителка	15 г.в./М
14	ХПа; ЛАи; сърдечен рабдомиом; <b>симптоматична епилепсия</b>	Екзон 22	frameshift (делеция)	<b>c.2698_2699delCA, p.(Gln900Glnfs*2)</b>	Майка носителка	8 г.в./Ж
15	5 ХПа; ЛАи; субependимни нодули; кортикална дисплазия; <b>ГТКП</b>	Екзон 15	nonsense	c.1525C>T, p.Arg509*	неналични родители	10 г.в./М
16	ХПа; перивентрикуларни калцификати (КТ); <b>West синдром; интелектуален дефицит</b>	Екзон 15	nonsense	c.1453G>T, p.Glu485*	Засегнати роднини (неналични)	7 г.в./Ж
17	ХПа; субependимни нодули с калцификация; КД; <b>епилепсия</b>	Екзон 15	frameshift (делеция)	c.1888_1891delAAAG, p.Lys630Glnfs*22	De novo	2 г.в./Ж
18	ХПа; ЛАи; субependимни нодули с калцификация; радиална миграционна линия в бялото мозъчно вещество; <b>ГТКП</b>	Екзон 9	nonsense	c.772G>T, p.Glu258*	неналични родители	11 г.в./Ж
19	<b>румънски произход</b> ХПа; ЛАи; ШП; 1CAL; перивентрикуларни калцификати (КТ)	Екзон 6	frameshift (делеция)	c.433_434delCA, p.Gln145Valfs7*	Има дете с TSC: ХПа; ЛАи; ШП; множество тубери; перивентрикуларни и калцификати; АМЛи; фокална епилепсия (неналично)	36 г.в./М

**Легенда:** ХП(а) – хипопигментно(и) петно(а); ЛА(и) – лицев(и) амгиофибром(и); УФ – унгвален фибром; ШП – Шагренови петна; СЕГА – субependимален гигантоклетъчен астроцитом; КД – кортикална дисплазия (включва кортикални тубери и радиерно разположени миграционни линии в бяло мозъчно вещество); ФЕ – фокална епилепсия; ГТКП – генерализирани тонично-клонични пристъпи; КТ – компютърна томография. В червено са отбелязани всички нови, непубликувани мутации.

Тъй като мутациите в TSC2 гена се срещат с по-висока честота (69%) в сравнение с тези в TSC1 гена (31%) беше избран системен подход, който включва като първа стъпка секвениране по Sanger на TSC2 гена, след което при негативните случаи се премина към втора стъпка включваща секвениране по Sanger на TSC1 гена. В случаите, в които не се откриха мутации в двата гена се премина към трета стъпка – MLPA анализ за големи делеции и дупликации. След извършването на MLPA анализ беше открита делеция на 16 екзона (от 1-ви до 16-ти) в TSC2 гена, която не е описвана в световната литература (Таблица 30, Пациент 11).

При двама от изследваните пациенти (10% или 6% от български произход) не бяха открити генетични изменения в двата гена, както и по-големи реанжировки, включващи делеции и дупликации. Единият от случаите не е с български произход, а с румънски. Негативните случаи са представени в Таблица 32.

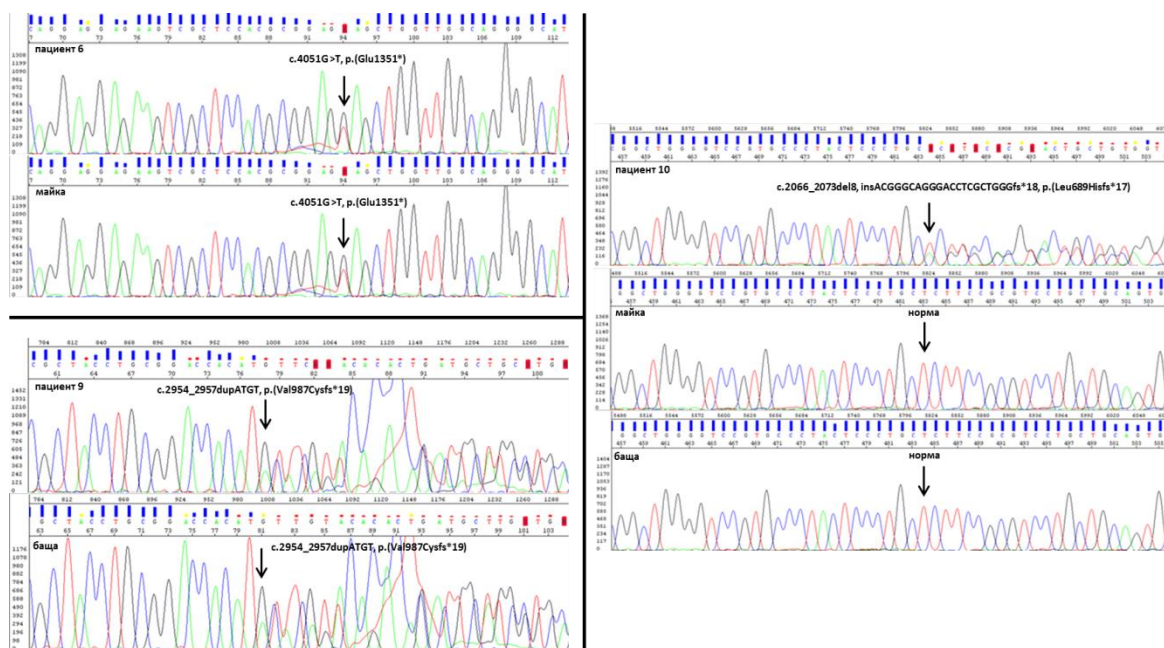
**Таблица 32. Клинични данни на случаите негативни за мутации в *TSC2* и *TSC1* гените.**

№	Клинични характеристики	Диагноза	Фамилност	Възраст/ пол
20	ЛАи; УФи; колагенома (хистология от кръст); множество бъбречни кисти (билатерални); множество субependимални нодули и перивентрикуларни калцификати	TSC	Засегнат син с тежък интелектуален дефицит с аутизъм; Дъщеря без клинична симптоматика; Син на дъщеря й с клиника включваща интелектуален дефицит с аутизъм	56 г.в./ Ж
21	<u>румънски произход</u> ХПА; ЛАи	TSC	-	1 г.в./ Ж

**Легенда:** ХП(а) – хипопигментно(у) петно(а); ЛА(и) – лицев(и) ангиофибром(и); УФ – унзвален фибром

#### 4.2.2. Резултати от молекулно-генетичен анализ

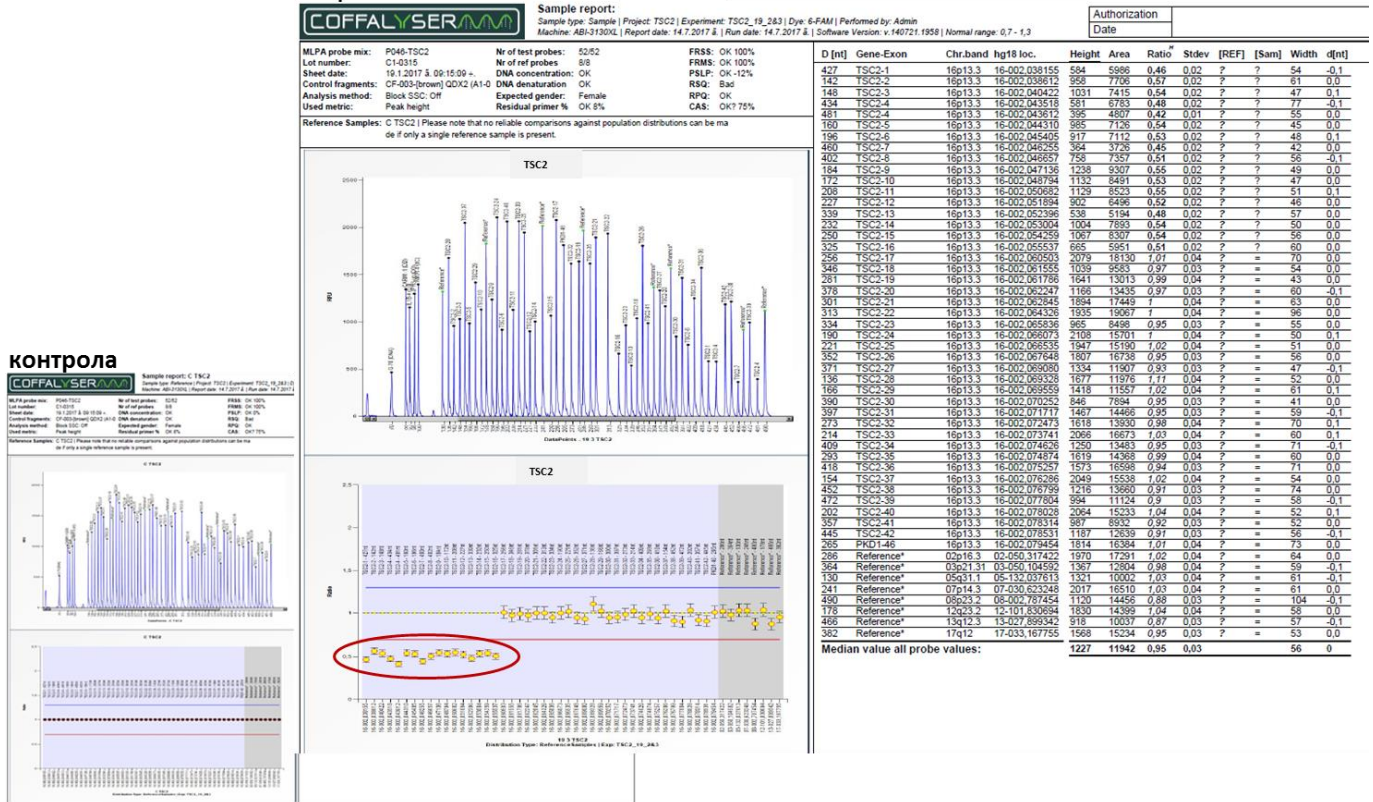
Мутациите c.4051G>T, p.(Glu1351\*), c.2954\_2957dupATGT, p.(Val987Cysfs\*19), c.2066\_2073del8, insACGGGCAGGGACCTCGCTGGGfs\*18, p.(Leu689Hisfs\*17) и делеция от 1 до 16 екзон открити в *TSC2* гена бяха докладвани за пръв път от нашия екип. До момента няма данни в световната литература тези замени да са откривани от други изследователски групи. Секвенционни профили на три от новооткритите мутации в *TSC2* гена са представени на Фигура 40.



**Фигура 40. Секвенционни профили на трите непубликувани мутации в *TSC2* гена.**

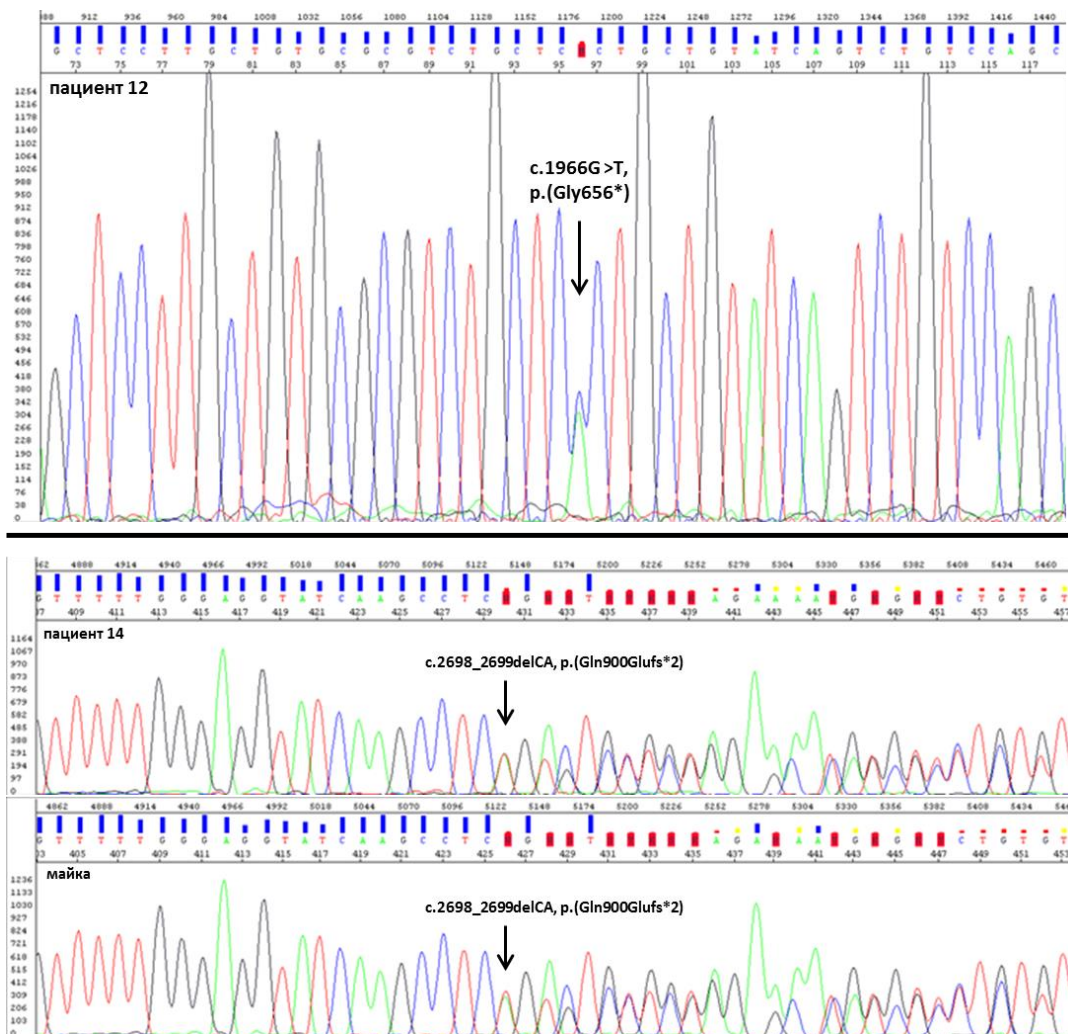
Резултат на четвъртата непубликувана мутация в *TSC2* гена представляваща делеция на екзони от 1-ви до 16-ти, както и математически изчисления към тази мутация, в табличен вид са представени на Фигура 41.

пациент 11



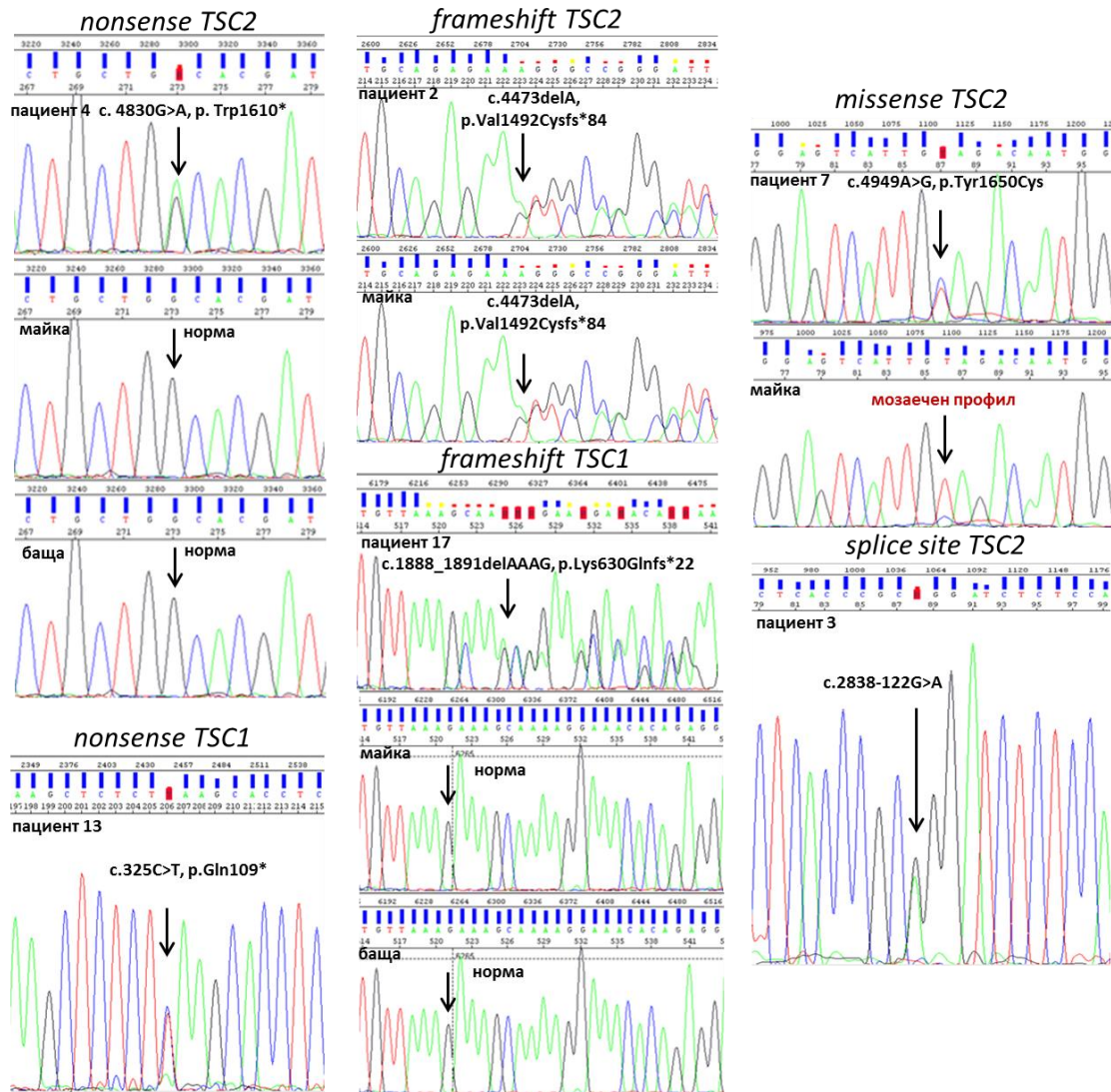
Фигура 41. MLPA профил на делеция del[1-16] в TSC2 гена.

Двете мутации в TSC1 гена с.1966G>T, p.(Gly656\*) и с.2698\_2699delCA, p.(Gln900Glnfs\*2) бяха докладвани за пръв път от нашия екип. До момента няма данни в световната литература тези замени да са откривани от други изследователски групи. Секвенционните профили на новооткритите мутации в TSC1 гена са представени на Фигура 42.



Фигура 42. Секвенционни профили на двете непубликувани мутации в *TSC1* гена.

На Фигура 43 са представени секвенционните профили на част от детектираните патологични варианти в двата гена при някои от изследваните пациенти. В зависимост от типа на мутацията те попадат в различни групи (Таблица 30 и 31). Всички тези генетични варианти са известни и описани в световната литература като патогенни [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>].



Фигура 43. Секвенционни профили на различни типове мутации открити в *TSC2* и *TSC1* гените.

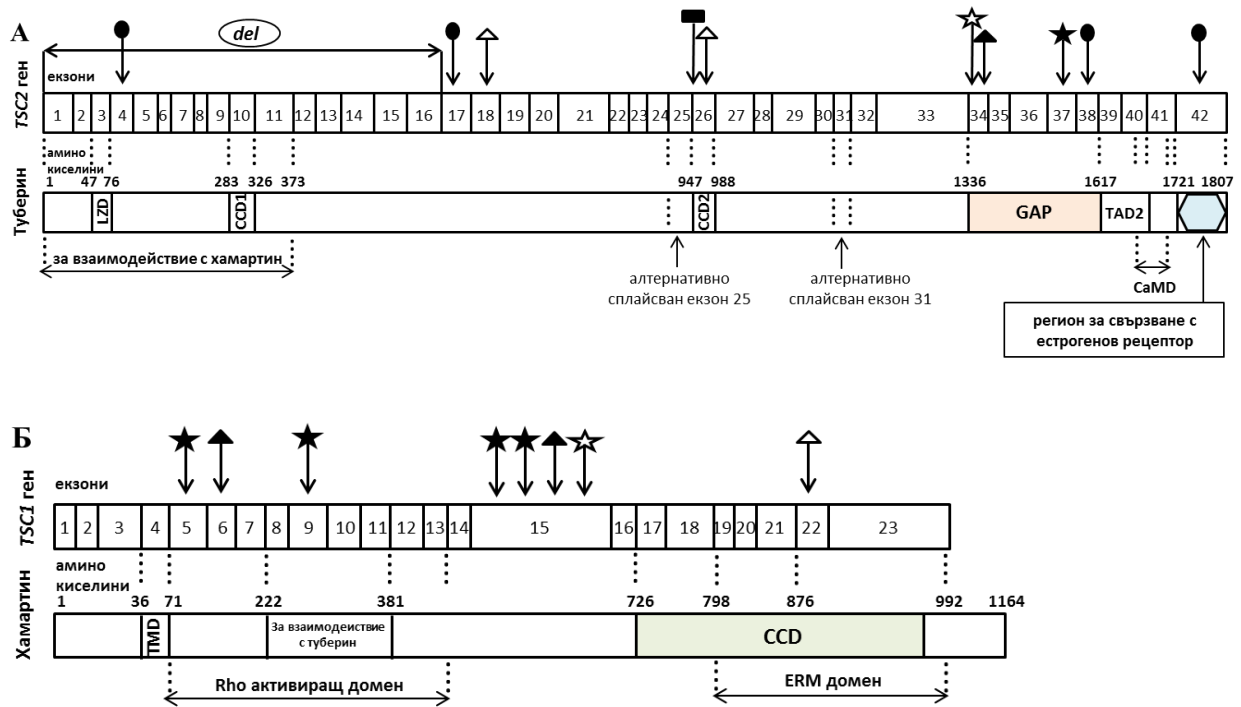
#### 4.2.3. Дискусия

До момента са открити и описани повече от 1700 мутации в *TSC2* и *TSC1* гените [http://www.lovd.nl]. Големи "геномни" реанжировки като големи делеции са много редки при *TSC1* гена и по-чести в *TSC2* гена, като възникват при около 6% от всички пациенти с TSC [Kozłowski *et al.*, 2007]. Мутациите в *TSC1* гена обикновено включват *frameshift* делеции или *nonsense* мутации (37 и 36%, респективно), докато *missense* мутациите са по-редки (3,1%) [Kwiatkowski, 2010]. *Frameshift* делеции, *nonsense* и *missense* мутациите се срещат с еднаква честота в *TSC2* гена (22-27%), докато *splice site* мутациите и мутациите инсериращи бази са по-рядко срещани (съответно 16% и 9%) [Slegtenhorst *et al.*, 1997; Astrinidis and Henske, 2005; Kwiatkowski, 2010].

До момента няма налична информация в световната литература за генетично верифицирани български случаи с TSC. Съобщавана е единствено честота и клиничните характеристики при български пациенти с TSC [Божинова и сътр., 2015].

Белтъчните продукти на двата гена *TSC2* и *TSC1*, хамартин (*TSC1*) съдържащ 1164 аминокиселини и туберин (*TSC2*) съдържащ 1807 аминокиселини, взаимодействат един с друг като формират хетеродимер и заедно функционират като тумор-супресорен комплекс. Те се експресират в едни и същи клетъчни линии в множество органи: мозък, бял дроб, бъбреци и панкреас, поради което клиничната изява на заболяването е изключително хетерогенна [Jones *et al.*, 1999; Jin *et al.*, 1996; Plank *et al.*, 1998]. GAP активността на туберин е от изключителна важност за функцията на белтъка, действащ като комплекс заедно с хамартин и е основна за тумор-супресорната му функция, докато хамартин е необходим за стабилизиране на туберин и за предпазване от убиквитин-медираната деградация [Jin *et al.*, 1996; Benvenuto *et al.*, 2000; Chong-Kopera *et al.*, 2006]. Част от генетичните промени засягащи GAP-домена на туберин са локализирани в С-терминалната част на белтъка, като е установено, че *missense* мутациите в двата гена обикновено дестабилизируют комплекса и водят до деградация на туберин [Nellist *et al.*, 2001].

След провеждане на молекулно-генетичен анализ в прицелната група с TSC бяха генетично верифицирани 90% (19/21) или 94% (18/19) с български произход. Проучването представлява първото по рода си молекулно-генетично изследване на двата гена в България. Откритите варианти в *TSC2* гена в нашата група са *missense* (36% при 4/11), *frameshift* (27% при 3/11), *nonsense* (18% при 2/11) мутации, една *splice site* мутация (10%) и една голяма делеция (10%), докато повечето от мутациите в *TSC1* гена са *nonsense* мутации (63% при 5/8) (Таблица 30 и 31), както е съобщавано преди в световната литература [Astrinidis and Henske, 2005]. Бяха открити и три *frameshift* мутации, една от които е при пациент от румънски произход, като общият процент е по-малък в сравнение с този на *nonsense* мутациите (38% при 3/8 или 29% при 2/7 с български произход) (Таблица 31). Мутациите в *TSC2* гена са разпръснати в екзоните на гена, като четири от тях – две *nonsense*, една *frameshift* и една *missense* бяха открити в GAP-домена на туберин (Фигура 44А), докато четири от мутациите в *TSC1* гена - три *nonsense* и една *frameshift* са локализирани в екзон 15, един от най-големите екзони в гена (Фигура 44Б). Разпределението на откритите мутации в двата гена е представено на Фигура 44А и 44Б.



**Фигура 44. Разпределение на откритите мутации в *TSC2* и *TSC1* гените и тяхната локализация в домените на белтъците туберин и хамартин** А) Графично представяне на екзоните на *TSC2* гена и домените на белтъка туберин: LZD - leucine zipper domain; CCD1/CCD2 - coil-coil домен 1/2; GAP - ГТФ-активиращ белтък; TAD2 – транскрипционно-активиращ домен; CaMD – калмодулин свързващ домен; Б) Графично представяне на екзоните на *TSC1* гена и домените на белтъка хамартин: TMD – трансмембранен домен; CCD - coil-coil домен; ERM домен – езрин-радиксин-мозин. **Легенда:** запълнена звезда *nonsense* мутация, запълнен кръг *missense* мутация, запълнен триъгълник *frameshift* мутация, правоъгълник *splice site* мутация, празни символи нови, непубликувани до момента мутации. Горизонтална линия с елипса отгоре показва герминативна делеция на екзони 1-16.

В нашето проучване бяха детектирани сравнително по-голям брой мутации в *TSC1* гена (42% при 8/19 или 37% при 7/19 с български произход) в сравнение с литературните данни, където процентът на мутации в този ген е 31% [Dabora *et al.*, 2001; Sancak *et al.*, 2005].

*TSC1-TSC2* комплексът функционира в няколко пътища за клетъчна сигнализация като път за регулация на растежа и транслацията (PI3K/PKB път), път за клетъчна адхезия/миграция/белтъчен транспорт (GSK3/FAK/Rho път) и път за клетъчен растеж и пролиферация (MAPK път) [Au *et al.*, 2004]. Комплексът е критичен негативен регулатор на сигнализацията действаща след PI3K/PKB пътят (downstream) [Langkau *et al.*, 2002]. Нарушения във функцията на PI3K/PKB пътя в резултат на мутации би могла да бъде спасена ако е налице и загуба на едно от функционалните копия на *TSC1* или *TSC2*. PKB се активира от PI3K, която директно фосфорилира *TSC2*, превръщайки го в неактивна форма, която повлиява активирането на Rheb и следователно и на mTOR комплекс 1 (mTORC1) [Costa-Mattioli and Monteggia, 2013;

Tee *et al.*, 2016; Huang and Manning, 2008]. Установено е, че TSC1-TSC2 комплексът действа в сигнализацията преди mTORC1 (upstream). Той е критичен негативен регулатор на активацията на mTORC1 и при загуба на TSC тумор-супресорната функция води до абнормно увеличаване на mTORC1 медирана транслация, за която е описвано, че е отговорна за фенотипната изява корелираща със симптоматика от аутистичния спектър, като интелектуален дефицит и аутизъм. Такъв тип фенотипна изява се наблюдава при 7 от случаите с генетично верифицирана диагноза TSC (Таблица 30, 31; Пациенти 5, 7, 8, 10, 12, 13 и 16). Дефекти в регулацията на TSC1-TSC2 комплекса допринасят и за туморогенеза [Costa-Mattioli and Monteggia, 2013].

Герминативни мутации в *TSC2* и *TSC1* гените често причиняват съществени изменения в кодираните от тях протеини. Продуктът на *TSC2* гена, туберин, включва 7 домена (Фигура 44А) [Luo *et al.*, 2015; Hodges *et al.*, 2001]. Четири от откритите мутации са локализирани в GAP-домена, включващ аминокиселинните остатъци от 1336 до 1617 на туберин, като всеки един от тези пациенти е с фенотипна изява включваща типичните клинични симптоми на TSC (Таблица 30, Фигура 44А, Пациенти 2, 5, 6 и 7). Единствено при Пациент 2 налице са само 2 ХПа и ФЕ, тъй като пациентката е само на 2 г.в., но се очаква прогресия в заболяването поради типа мутация, която е *frameshift* и поради нейната локализация, а именно GAP-домена.

Първата нова мутация в *TSC2* гена, открита от нашия екип е *nonsense* мутация с.4051G>T, p.(Glu1351\*) при Пациент 6, който е единствен от нашата група с билатерални ретинални хамартоми (Таблица 30, Фигура 44А). Мутацията е унаследена от неговата майка, която клинично покрива критериите за TSC, като фенотипната изява при нея включва и бъбречен ангиомиолипом. От литературата е известно, че пациенти с мутации в GAP-домена на туберин имат ниска GAP активност и невъзможност за инхибиране на Rheb, причиняващи високи нива на mTORC1 сигнализация, което би обяснило тежката клиника в това семейство [Jones *et al.*, 1999; Costa-Mattioli and Monteggia, 2013].

Втората нова мутация в *TSC2* гена е с.2954\_2957dupATGT, p.(Val987Cysfs\*19), открита при Пациент 13. Това е *frameshift* мутация локализирана в екзон 26, който попада в CCD2 домена (947-988 аминокиселинни остатъци) на туберин (Таблица 30, Фигура 44А). Мутацията е унаследена от бащата на пациентката, който също покрива клиничните критерии за TSC. Известно е, че при *frameshift* мутациите се очаква синтез на скъсен или липсващ белтък, резултат от функционирането на път наречен nonsense-mediated mRNA decay (NMD), който селективно разгражда mRNAs, съдържащи

преждевременно терминиращи кодони (ПТКи) [Hug *et al.*, 2016]. Тази генетична промяна най-вероятно води до неконтролируем клетъчен растеж и туморогенеза, които се наблюдават и във фенотипната изява на нашия пациент с множество субependимни нодули с калцификация (Таблица 30, Пациент 13).

Третата нова мутация в *TSC2* гена е c.2066\_2073del8, insACGGGCAGGGACCTCGCTGGGfs\*18, p.(Leu689Hisfs\*17), открита в екзон 18 (Таблица 30, Пациент 10). Мутацията е *de novo*. За момента няма информация в литературата в кой домен попада екзон 18 на *TSC2* гена, но е очевидно, че такива сложни реанжировки като тази мутация представляващи *indel* - делеция на 8 бази и инсерция на 21 бази водят до преждевременно прекратяване на белтъчния синтез 18 аминокиселини след замяната и получаване на скъсен продукт, който вероятно се разгражда. Също така, мутации нарушаващи взаимодействието между туберин и хамартин намаляват GAP активността, което показва, че връзката между двата белтъка е от изключително значение за GAP активността на туберин и неговата туморна супресия [Astrinidis and Henske, 2005; Jones *et al.*, 1999; Nellist *et al.*, 2005b]. Фенотипната изява при този пациент е изключително тежка, включваща освен кожно засягане и засягане на ЦНС с развитие на СЕГА, субependимни нодули и субкортикални тубери, интелектуален дефицит и ГТКП (Таблица 30, Пациент 10).

Четвъртата нова мутация е голяма делеция на екзони от 1 до 16 на *TSC2* гена при Пациент 11 с изключително тежка клинична симптоматика (Таблица 30, Пациент 11). Първите екзони на туберин са важни за взаимодействието на туберин с хамартин (Фигура 44А). Мутацията е *de novo*. Добре известно в литературата е, че *de novo* мутациите в *TSC2* гена са открити в голям процент от пациентите с тежка клинична картина в сравнение с *de novo* мутациите в *TSC1* гена [Astrinidis and Henske, 2005].

В *TSC1* гена бяха открити също две нови непубликувани в литературата мутации.

При Пациент 12 беше открита нова *nonsense* мутация: c.1966G>T, p.(Gly656\*) в екзон 15. *Nonsense* мутациите водят до синтез на скъсен белтък. Загубата на С-терминалната част на хамартин, където е локализиран ERM-доменът вероятно нарушава връзката на важни мембранни белтъци с цитоскелетни белтъци [Lamb *et al.*, 2000; Astrinidis *et al.*, 2002]. Нарушаването на това взаимодействие предполага клетките да загубят способността си за адхезия към извънклетъчния матрикс, което да доведе до абнормна клетъчна миграция и формиране на хамартомни формации както се наблюдава и при нашия Пациент 4, при който клиничната картина включва

кортикална дисплазия и субependимни нодули (Таблица 31, Пациент 12 ) [Lamb *et al.*, 2000; Astrinidis *et al.*, 2002].

Втората нова мутация в *TSC1* гена е *frameshift* мутация: с.2698\_2699delCA, р.(Gln900Glufs\*2), която беше детектирана при Пациент 14. Мутацията е локализирана в екзон 22 на *TSC1* гена, попадащ в coiled coil - домена (CCD) на хамартин, включващ екзони от 17-ти до 23-ти [Astrinidis *et al.*, 2002]. Този домен участва в белтък-белтъчни взаимодействия на хамартин с други белтъци. Екзон 22 на *TSC1* гена кодира и TBC1D7 свързващо място [Santiago *et al.*, 2014]. То е важно за взаимодействието между TSC1 и TBC1D7, където TBC1D7 представлява третата субединица на TSC комплекса, и функционира като подпомага стабилизирането на TSC1-TSC2 комплекса [Qin *et al.*, 2016]. Тези функции най-вероятно са нарушени в резултат на *frameshift* мутацията открита при Пациент 14 в екзон 22. Този пациент е един от тримата с генетично верифицирана TSC, чиито фенотип включва наличие на сърдечен рабдомиом.

В *TSC2* гена бяха открити четири *missense* мутации (Таблица 30, Пациент 1, 5, 7 и 8). Патогенността на мутациите с.275A>T, р.Glu92Val; с.1769T>C, р.Leu590Pro; с.4949A>G, р.Tyr1650Cys и с.5228G>A, р.Arg1743Gln е представена на Фигура 45, като е използван софтуер за математическа обработка на данните и оценка на патогенен ефект (PolyPhen-2 (v2.2.2r398)).



**Фигура 45. Резултати от онлайн предиктор, който използва два различни модела за предсказване. А) Пациент 1 с мутация с.275A>T, р.Glu92Val; Б) Пациент 5 с мутация с.1769T>C, р.Leu590Pro; В) Пациент 7 с мутация с.4949A>G, р.Tyr1650Cys; Г) Пациент 8 с мутация с.5228G>A, р.Arg1743Gln (Таблица 30). [http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/].**

При Пациент 1 *missense* вариантът с.275A>T, p.Glu92Val след обработка с предикторната програма се определя като вероятно патогенен, докато в базата данни clinvar той е описван като непатогенен вариант [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>]. Поради това, че клиничната симптоматика на пациентката не отговаря на клиничните критерии за TSC, а предикторната програма определя открития вариант като вероятно патогенен, ние заключаваме, че откритият вариант е с конфликтна интерпретация (Таблица 30, Пациент 1). Изчислените коефициенти на патогенност за останалите три варианти са съответно: за вариант с.1769T>C, p.Leu590Pro е 0.99 (Фигура 45Б), за вариант с.4949A>G, p.Tyr1650Cys е 1.00 (Фигура 45В) и за вариант с.5228G>A, p.Arg1743Gln е 1.00 (Фигура 45Г). Тези стойности определят висока вероятност за патогенност (Фигура 36).

При 19 от изследваните пациенти (90% при 19/21 или 95% при 18/20 български пациенти) диагнозата TSC беше генетично верифицирана и само при двама от всички изследвани не беше намерен патологичен вариант в двата анализирани гени. Единият случай е от български произход (Таблица 32, Пациент 20), представляващ фамилен случай на жена с типичната клинична симптоматика на TSC с клиника включваща ЛАи, УФ, субепендимни нодули и перивентрикуларни калцификати, множество бъбречни кисти, която покрива клиничните критерии. При нейният син клиничната картина включва тежък интелектуален дефицит с аутизъм. Индексният пациент има и дъщеря без клинична симптоматика на TSC, но дъщерята има син с интелектуален дефицит и аутизъм. При това семейство предстоят допълнителни генетични изследвания за установяване на патогенния дефект в семейството, тъй като точкови мутации, големи делеции и дупликации в *TSC2* и *TSC1* гените не бяха открити. Като диференциална диагностика се предполага *PKD1/PKD2* гените, поради наличието на множество бъбречни кисти при прицелния пациент.

Вторият случай с генетично неизяснена диагноза е от румънски произход (Таблица 32, Пациент 21). Този пациент покрива два главни критерия, при което се очакваше да бъде открит генетичен дефект в един от двата анализирани гени, но такъв не беше намерен. Предстои диагнозата на този пациент да бъде преразгледана.

### **Генотип-фенотипни корелации**

Най-често откриваният тип мутации в *TSC2* гена при български пациенти са *missense* замените, които представляват 36% от всички мутации в този ген. Този тип

мутация се открива при пациенти на възраст от 1 година до 35 години с разнообразна фенотипна изява, покриваща клиничните критерии.

Вторият тип най-чести мутации в *TSC2* гена в нашата група са *frameshift* мутациите, които представляват 27%. Този тип мутации се откриват при пациенти на възраст от 2 години до 16 години. Една от откритите мутации е *de novo* (Таблица 30, Пациент 10), докато другите две са унаследени в единия случай от майката на пациента, която има единствено 2 ХПа (Таблица 30, Пациент 2), а в другия от бащата на пациента, който има ХПа и ЛАи (Таблица 30, Пациент 9).

*Nonsense* мутациите в *TSC2* гена се откриват при двама пациенти, единият на възраст 4 месеца, а другият на 15 години и представляват 18% от всички мутации в този ген. При пациента на 3 месечна възраст клиниката е изключително тежка, а мутацията е *de novo* (Таблица 30, Пациент 4). Втората *nonsense* мутация е открита за първи път от нашия екип и е унаследена от майката на пациента, която е с бъбречно засягане (Таблица 30, Пациент 6). И двете мутации са локализирани в GAP-домена на туберин, което би могло да обясни тежката фенотипна изява при тях.

Беше открита дълбоко-интронна, патогенна *splice site* мутация в *TSC2* гена представляваща 10% от всички открити мутации в гена. Тази мутация е публикувана и от други автори [Nellist *et al.*, 2015]. Клиниката на пациента датира от раждането му, а към момента на генетичното изследване той е на 43 г.в. (Таблица 30, Пациент 3).

Беше открита една голяма делеция на екзони от 1-ви до 16-ти, при пациент на 15 г.в., която представлява 10% от всички открити мутации. Това е единствения пациент от прицелната група с фенотипна изява включваща бъбречни ангиомиолиптоми. Мутацията е *de novo*.

При 91% (10/11) от пациентите с детектирани мутации в *TSC2* гена се наблюдава епилепсия, което корелира с литературните данни (90% от случаите на TSC) [Jülich and Sahin, 2014]. При 36% (4/11) от пациентите с мутации в *TSC2* гена фенотипната изява включва интелектуален дефицит с или без аутизъм.

В *TSC1* гена 63% (5/8) или 71% (5/7 от български произход) от мутациите са *nonsense* мутации, които се откриват при пациенти на възраст от 5 години до 15 години. Три от тези 5 мутации са локализирани в екзон 15, докато останалите две в Rho-активиращия домен. Останалите 35% (3/8) или 29% (2/7 от български произход) представляват *frameshift* мутации, открити при пациенти на възраст от 2 години до 36 години. Едната мутация при Пациент 17 е *de novo*, при който се наблюдава изключително тежка клиника за възрастта (2 г.в.), включваща освен кожно засягане и

КД, субependимни нодули с калцификация и епилепсия (Таблица 31, Пациент 17). При 88% (7/8) или 100% (7/7 от български произход) от пациентите с мутации в *TSC1* гена фенотипната изява включва епилепсия, докато интелектуален дефицит с или без аутизъм е налице при 38% (3/8) или 43% (3/7 от български произход) от изследваните пациенти.

По литературни данни 90% от пациентите с TSC развиват епилепсия [Jülich and Sahin, 2014], което корелира и с нашите данни според които 89% (17/19) или 94% (18/19 от български произход) от пациентите с генетично верифицирана TSC имат епилепсия. При 50% от пациентите с TSC е налице АСД [Jülich and Sahin, 2014], като в нашата група това се наблюдава при 37% (7/9) или 39% (7/18 от български произход) от пациентите с доказана диагноза.

При получените резултати е изключително трудно да бъдат направени генотип-фенотипни корелации в прицелната група с клинична диагноза TSC, тъй като при всеки един от пациентите е налице тежка фенотипна изява, независимо от типа на откритата мутация и от локализацията ѝ в белтъчните домени, съответно на туберин и хамартин. Всеки един от пациентите е добре клинично охарактеризиран и покрива необходимите критерии за поставяне на диагнозата TSC, включващи два главни или два второстепенни и един главен критерии. В литературата е съобщавано, че герминативните мутации не повлияват фенотипната изява [Au *et al.*, 1998], което се наблюдава и в нашата извадка от пациенти с TSC. Би било интересно в бъдеще да се проследи възможна корелация между типа мутация, нейната локализация и засегнат ген (*TSC2* или *TSC1*) и резултатите от провежданата терапия, включваща прилагането на mTOR инхибитори.

Отново се наблюдава, че при част от родословията е налице тежка антисипация при предаването на една и съща мутация в поколението (пример е семейството с мутация c.4473delA, p.Val1492Cysfs\*84), което прави генетичното изследване и провеждането на пренатална диагностика от съществено значение.

#### **4.2.4. Обобщение на резултатите от TSC**

Настоящото проучване представлява първата стъпка по посока на молекулно-генетично охарактеризиране на Комплекс туберозна склероза при български пациенти. Диагноза беше потвърдена при 90% (19/21) или 94% (18/19 от български произход) от анализирания прицелна група. При четирима пациенти бяха открити нови

непубликувани *TSC2* мутации в световната литература, от които две *frameshift*, една *nonsense* и една голяма делеция на 16 екзона. В *TSC1* гена бяха открити две непубликувани мутации, една *nonsense* и една *frameshift*. В допълнение, бяха открити и 13 описвани в литературата, патогенни варианти в двата гена, от които 7 в *TSC2* гена и 6 в *TSC1* гена. Откритите варианти в *TSC2* гена в нашата група са *missense* (36% при 4/11), *frameshift* (27% при 3/11), *nonsense* (18% при 2/11) мутации, една *splice site* мутация (10%) и една голяма делеция (10%). Повечето от мутациите в *TSC1* гена са *nonsense* мутации (63% при 5/8). Останалите са *frameshift* мутации, една от които е открита при пациент от румънски произход, като общият процент на *frameshift* мутациите е по-малък в сравнение с този при *nonsense* мутациите (38% при 3/8 или 29% при 2/7 от български произход). Не беше направена ясна генотип-фенотипна корелация поради генетично и клинично хетерогенната група, обект на настоящото изследване.

Ранната детекция на мутации в *TSC2* и *TSC1* гените и навременната терапия включваща прилагането на mTOR инхибитори би подпомогнала лечението на заболяването при засегнатите пациенти и техните семейства.

### **4.3. Синдром на von Hippel-Lindau**

#### **4.3.1. Изследвана група пациенти**

В рамките на настоящия труд бяха изследвани 12 пациента с клинична диагноза VHL от общо 12 семейства. В анализираната група бяха открити 5 мутации във *VHL* гена, като една от тях е нова за световната литература, представляваща първото комплексно мутационно събитие (КМС) във *VHL* гена описано от нашия екип. Останалите четири мутации, открити при изследваните български пациенти са добре известни и описани в световната литература, свързани с типичната клинична картина на VHL. Клиничните характеристики на 5-те генетично верифицирани случая с открити мутации в кодиращите последователности на *VHL* гена са представени в Таблица 33.

**Таблица 33. Клинични и молекулно-генетични данни на пациентите с диагноза VHL, с открити мутации в кодиращите последователности на VHL гена.**

№	Клинични характеристики	Мутации във VHL гена / локализация	Фамилност/история на заболяването	VHL тип	Възраст/пол
1	рХБ + единичен ХБ на С6 прешлен	c.254_283del30, p.Leu85_Glu94del екзон 1	липсва фамилност; билатерални рХБ (оперирани), ХБ на С6 прешлен	1	14 г.в./ Ж
2	Фео + рХБ	c.500G>A, p.Arg167Gln екзон 3	позитивна майка с билатерални Фео + рХБ; първоначално диагностициран билатерален Фео и опериран; 4 години по-късно билатерален рХБ – лекуван	2а	31 г.в./ Ж
3	цХБ	<b>c. [516_517dupGTCAAGCCT; 532_542delCTGGACATCGTinsATTA], p. (Glu173Serfs*4)</b> екзон 3	положителна фамилна история - баща с рХБ и цХБ (оперирани) - починал	1	27 г.в./ Ж
4	2 БКК + 2 цХБ	c.481C>T, p.Arg161* екзон 3	положителна фамилна история - баща с множество цХБ, брат с 2 цХБ и БКК, племенник с цХБ; опериран и лекуван за БКК, след което за цХБ (неналични)	1	48 г.в./ М
5	цХБ; панкреатични и бъбречни кисти; БКК	c.332G>A, p.Ser111Asn екзон 1	положителна фамилна история, засегнати дъщеря и вчук; рХБ (опериран), БКК (опериран)	1	60 г.в./ Ж

**Легенда:** рХБ – ретинален хемангиобластом; цХБ – хемангиобластом на централната нервна система; Фео – феохромоцитом; БКК – бъбречен клетъчен карцином; в червено – КМС открито от нашия екип

Пациентите с диагноза VHL, при които не бяха открити мутации след провеждане на секвениране по Sanger бяха подложени на скрининг за големи делеции и дупликации, посредством MLPA анализ, който не доведе до откриване на такъв тип дефекти във VHL гена. Негативните случаи са представени в Таблица 34.

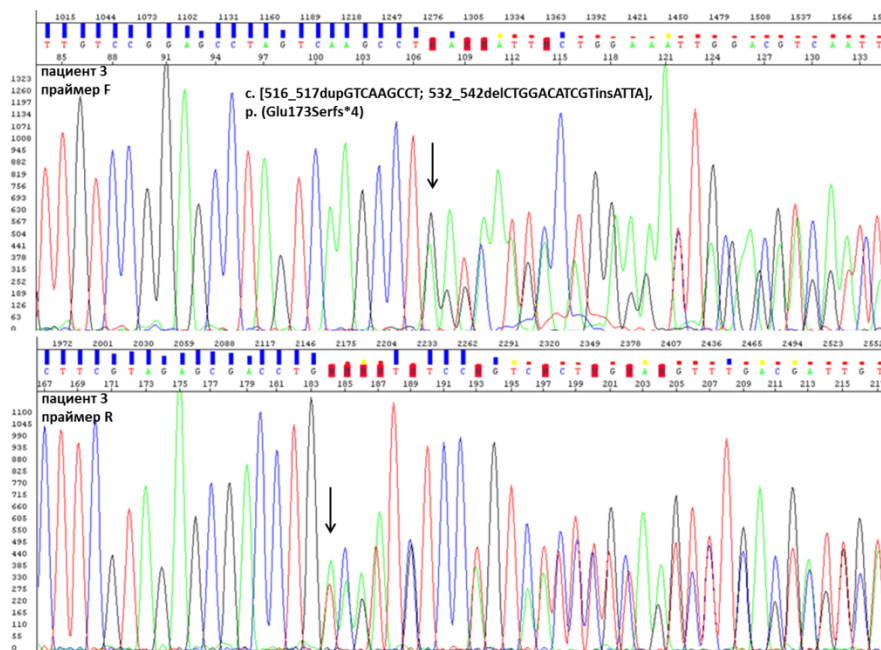
**Таблица 34. Клинични данни на случаите негативните за мутации във VHL гена.**

№	Диагноза	Клинични характеристики	Други открити варианти	Фамилност	Възраст/ Пол	Диференциална диагноза
6	VHL	Насочен от лекар специалист	няма	-	25 г.в./ Ж	
7	VHL	Насочен от лекар специалист	няма	-	35 г.в./ Ж	
8	VHL	Насочен от лекар специалист	няма	-	17 г.в./ М	
9	VHL	множество хиперденсни лезии – най-голямата (14x17mm), фронтално субкортикално (10x10mm), окципиталният рог на ляв вентрикул (10x13mm); несиметрични фромации в бялото и сивото мозъчно вещество в ствола, малкия мозък и голямомозъчните сфери	-61_-51dupCCCCGCGTCCG 5'-UTR на VHL гена в хетерозиготно състояние	Липса на изменението при сина му (33г.в.) с множество ангиоми и Гранд мал епилепсия	77 г.в./ М	
10	VHL	цХБ	няма	-	31 г.в./ Ж	
11	VHL	2 бъбречни тумора, множество метастази в бъбреците	няма	-	70 г.в./ Ж	
12	VHL	диспластичен ганглиоцитом; множество хамартоми в различни органи; множество кожни неврофиброми; атаксия; Хашимото; мастопатия и миомектомия	c.598C>T, p.Arg200Thr във VHL гена в хетерозиготно състояние	-	65 г.в./ Ж	Cowden syndrome Няма мутации в PTEN1 и SDHB гените

При един от негативните случаи беше открит вариант намиращ се в 5'-UTR региона на *VHL* гена, преди ATG старт кодона. Вариантът представлява дупликация на 10 бази и е описван в литературата като вариант с неясно значение (Таблица 34, Пациент 9) [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/166559/>; Zatyka *et al.*, 2002]. При Пациент 12 беше открит хетерозиготен вариант с.598C>T, р.Arg200Thr (Таблица 34, Пациент 12). Вариантът е описван в литературата като патогенен в хомозиготно състояние при пациенти с Чувашки тип конгенитална полицитемия [Pastore *et al.*, 2003; Gordeuk *et al.*, 2004; Maher *et al.*, 2011].

#### 4.3.2. Резултати от молекулно-генетичен анализ

Мутацията с.[516\_517dupGTCAAGCCT; 532\_542delCTGGACATCGTinsATTA], р.(Glu173Serfs\*4) открита във *VHL* гена е докладвана за първи път от нашия екип и представлява първото КМС в този ген (Таблица 33, Пациент 3). Секвенционен профил на КМС във *VHL* гена е представен на Фигура 46.

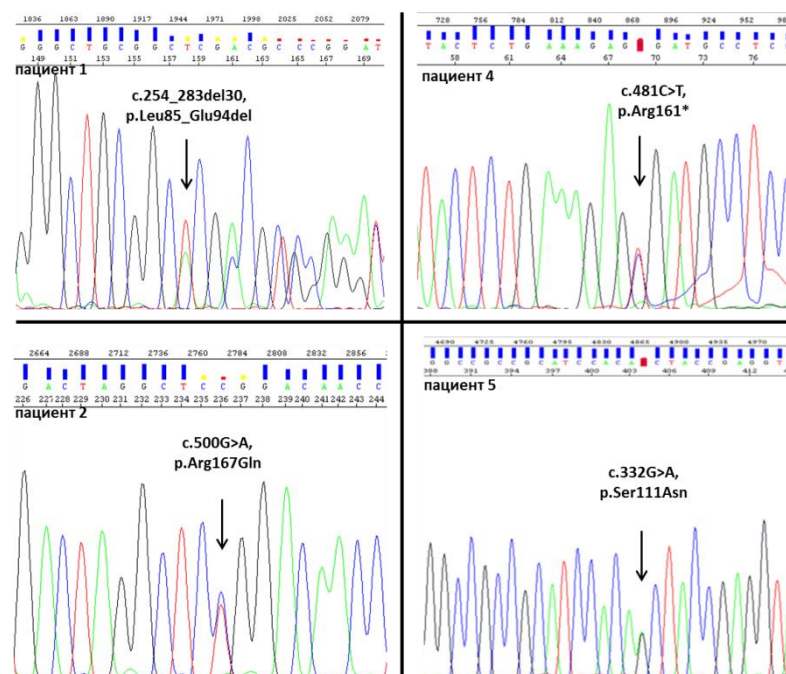


**Фигура 46. Секвенционен профил на новооткритата мутация във *VHL* гена.**

Откритото от нашия екип КМС комбинира дупликация и *indel*, и представлява мутация водеща до реанжировка на екзон 3 на *VHL* гена - с.[516\_517dupGTCAAGCCT; 532\_542delCTGGACATCGTinsATTA], р.(Glu173Serfs\*4). Мутацията е открита при 27-годишна жена (Таблица 33, Пациент 3) с инфратенториален тумор, първоначално считан за епендимом или хемахиоперицитом след провеждане на ЯМР, но с

типичните характеристики на цХБ. След операция на туморната формация, намираща се в малкия мозък предполагаемият цХБ е бил хистологично доказан. По данни на лекуващите лекари семейната история включва засегнат баща с цХБ и рХБ, но за съжаление семейството му никога не е било информирано, че неговото заболяване е VHL и че това е наследствено заболяване, при което поколението има 50% риск да бъде засегнато. В такива случаи при рисковите лица е препоръчително извършване на редовен скрининг на ЦНС чрез провеждане на ЯМР, като е най-удачно този скрининг да започне още през юношеските години [Maher *et al.*, 2011; Shuin *et al.*, 2006]. Индексният пациент се класифицира като VHL тип 1, с фенотипна изява включваща рХБ и цХБ, но с нисък риск за развитие на БКК, който се свързва с типа открита мутация, причиняваща делеция на целия или част от *VHL* гена [Maher *et al.*, 2011]. Бащата не е достъпен за молекулно-генетично изследване тъй като е починал на ранна възраст.

На Фигура 47 са представени секвенционните профили на останалите патологични варианти открити във *VHL* гена. Всички тези генетични варианти са известни и описани в световната литература като патогенни [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>].



**Фигура 47.** Секвенционни профили на четирите открити мутации във *VHL* гена известни в литературата.

Делецията на 30 базови двойки в екзон 1 с.254\_283del30, p.Leu85\_Glu94del беше открита при момиче на 14 г.в. с клинична картина включваща билатерални рХБ и единичен ХБ на С6 прешлен, което я причислява към VHL тип 1b (Таблица 33, Пациент 1).

*Missense* мутацията p.Arg167Gln в екзон 3 беше открита при жена на 31 г.в. и нейната майка (Таблица 33, Пациент 2), и двете са развили Фео и рХБ, което ги причислява към VHL тип 2a.

Стоп кодон мутацията с.481C>T, p.Arg161\* (известна още като: с.694C>T, p.Arg232\* по стара номенклатура), локализирана в екзон 3, беше открита при мъж на 46 г.в. (Таблица 33, Пациент 4), чиято фенотипна изява включва два БКК и два ЦХБ. Фамилната история е положителна, тъй като бащата на пациента е бил опериран от множество големи по размер цХБ, но не е наличен за извършване на генетично изследване. Братът на пациента също е бил опериран от множество цХБ и е починал от БКК. Племенникът на индексния пациент също е опериран от голям цХБ.

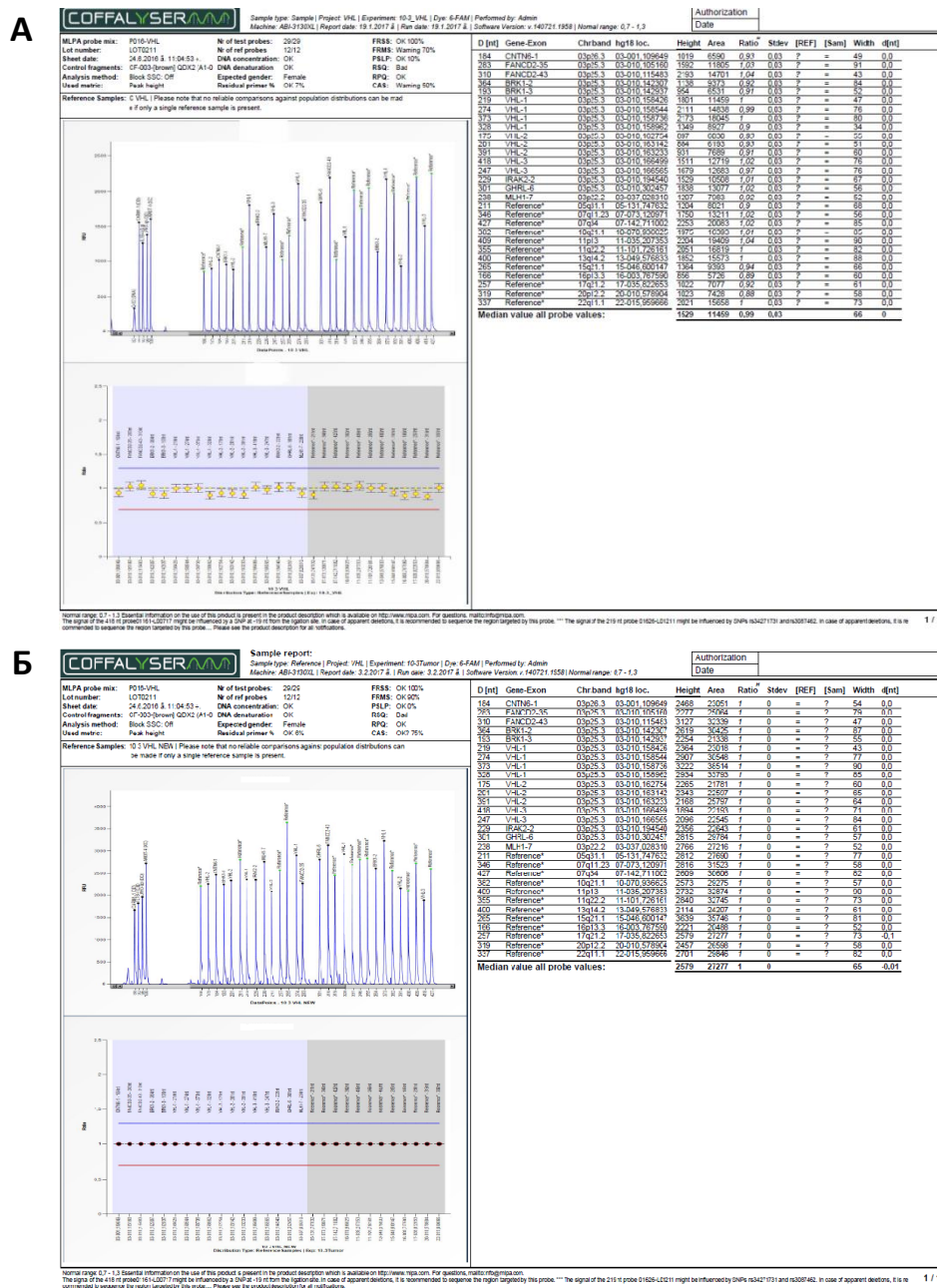
*Missense* мутацията с.332G>A, p.Ser111Asn, локализирана в екзон 1 на *VHL* гена беше открита при жена на 60 г.в. (Таблица 33, Пациент 5). Клиничната картина включва цХБ, панкреатични и бъбречни кисти и БКК.

Откритата дупликация в промоторния регион на *VHL* гена е с неясна значимост и влияние върху промоторната активност на гена. Вариантът беше открит при мъж на 77 години (Таблица 34, Пациент 9) с клинична картина включваща множество кавернозни ангиоми в церебралната хемисфера и една в краниоспиналния дял, аденом на надбъбречната жлеза, две кисти в ляв бъбрек и лимфангиом на шия. Фамилната история е позитивна, тъй като при сина на пациента също се откриват множество церебрални и церебрално кавернозни ангиоми, както и фокална епилепсия. Вероятно поради множеството лезии, засягащи няколко органа и позитивна фамилност, пациентът е бил насочен за молекулно-генетично изследване на *VHL* гена от лекуващия лекар.

Беше открит и хетерозиготен вариант p.Arg200Thr с неясна значимост при 65 годишна жена (Таблица 34, Пациент 12). Пациентката е оперирана за макрокистозен тумор в лявата церебрална хемисфера, който след хистологично изследване е определен като диспластичен ганглиоцитом. За съжаление е трудно да се установи точната медицинска история от миналото поради липсата на медицинска документация, както и ЯМР на церебралната лезия, но налице са хамартомни кожни лезии (множество фиброми по ръцете). Жената страда и от заболяване на щитовидната

жлеза. Претърпяла е предходни операции на фиброаденоми на гърдата и лейомиом. След хистологичното изследване на материалите като диференциална диагностика беше обсъден синдром на Cowden-Lhermitte-Duclos, поради което беше проведено генетично изследване на *PTEN* и *SDHB* гените, но резултатите бяха негативни.

При негативните случаи беше извършен скрининг за големи делеции и дупликации чрез MLPA анализ, но не бяха открити дефекти от този тип във *VHL* gena. На Фигура 48 е представен резултат от MLPA анализ на един от негативните пациенти.



Фигура 48. (А) MLPA профил на пациент: нормален резултат по отношение на делеции и дупликации във *VHL* gena; (Б) MLPA профил на нормална контрола.

Полиморфизмът с.870A>G в екзон 4 на *CCND1* ген, по литературни данни се приема като модификатор на VHL заболяването: била е открита асоциация между G-алел и рискът за развитие на ренални ангиоми и цХБ при пациенти с VHL [Zatyka *et al.*, 2002b] [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/13755/>]. Всички наши пациенти с генетично верифицирана диагноза VHL бяха скринирани за този полиморфизъм в *CCND1* гена. Резултатите от изследването на полиморфизма с.870A>G са представени в Таблица 35.

**Таблица 35. Резултати от генетичен анализ на полиморфизма с.870A>G в екзон 4 на *CCND1* гена.**

№	Клинични характеристики	Мутации във <i>VHL</i> гена	с.870A>G в <i>CCND1</i> ген
1	рХБ + единичен ХБ на С6 прешлен	с.254_283del30, p.Leu85_Glu94del	A/G
2	ФЕО + рХБ	с.500G>A, p.Arg167Gln	A/G
3	цХБ	с. [516_517dupGTCAAGCCT; 532_542delCTGGACATCGTinsATTA], p. (Glu173Serfs*4)	A/G
4	2 БКК + 2 цХБ	с.481C>T, p.Arg161*	G/G
5	цХБ; панкреатични и бъбречни кисти; БКК	с.332G>A, p.Ser111Asn	G/G

*Легенда:* рХБ – ретинален хемангиобластом; цХБ – хемангиобластом на централната нервна система; Фео – феохромоцитом; БКК – бъбречен клетъчен карцином

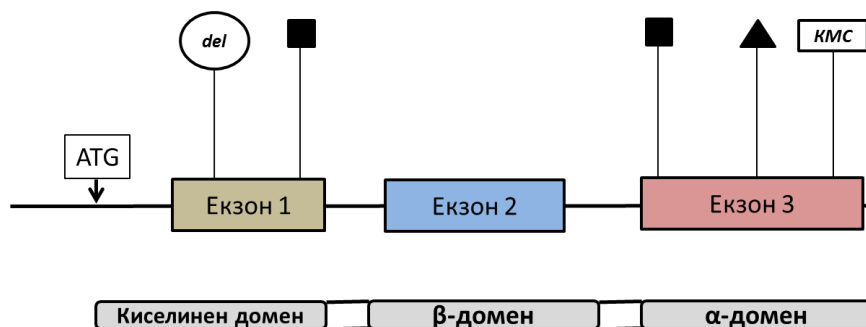
Резултатите показват наличие на високо рисковия G-алел в хомозиготно (2-ма пациента) или в хетерозиготно състояние (3-ма пациента) при всички пациенти с генетично верифициран VHL (Таблица 35).

### 4.3.3. Дискусия

Позовавайки се на световни бази данни установихме, че в световен мащаб са описани повече от 500 герминативни мутации във *VHL* гена [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>; <http://www.hgmd.org>]. Най-често срещаните мутации са *missense* замените (52%), следвани от *frameshift* мутациите (13%), *nonsense* замените (11%), докато делеции на целия ген се откриват в около 10%, *splice site* мутациите са 7% и най-редки са *in-frame* делеции/инсерции (6%). По отношение на разпределението на мутациите в екзоните на *VHL* гена, честотата на мутациите в екзон 1 е 43,2%, като екзон 1 попада в аминокиселинен домен на белтъка, честотата в екзон 2 е 17%, който попада в  $\beta$ -домена и 39,8% е честотата на мутации в екзон 3, който попада в  $\alpha$ -домена на белтъка [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010; Ong *et al.*, 2007]. До момента е съобщаван един случай на български пациент с генетично верифициран VHL, при който клиничната картина е изключително тежка включваща

летален миокарден инфаркт поради наличие на билатерален Фео/интраадrenalен параганглиом. Първоначално пациентът е бил изследван за мутации в *SDHB*, *SDHD* и *RET* гените, но не са били открити такива, а в следствие е била открита мутация с.499C>T, p.Arg167Trp във *VHL* гена [Bachurska *et al.*, 2014].

В прицелната група от български пациенти две от детектираните мутации попадат в аминокиселинния домен (Пациент 1 и 5), докато останалите три попадат в  $\alpha$ -домена на белтъка. Разпределението на детектираните мутации е представено на Фигура 49.



**Фигура 49.** Разпределение на детектираните мутации в екзоните на *VHL* гена.

**Легенда:**

del (делеция с.254\_283del130, p.Leu85\_Glu94del)

■ с.500G>A, p.Arg167Gln

■ с.332G>A, p.Ser111Asn

▲ с.481C>T, p.Arg161\*

KMC c.[516\_517dupGTCAAGCCT;532\_542delCTGGACATCGTinsATTA], p. (Glu173Serfs\*4), първото KMC във *VHL* гена

Макар, че прицелната група е малка, резултатите от молекулно-генетичния анализ показват разпределение, според което три от детектираните мутации попадат в екзон 3, което го прави “hot spot” в нашата извадка от български пациенти (Таблица 33, Фигура 49). Известно е, че в дивия тип белтък, фосфорилирането на киселинния домен е важно за тумор-супресорната функция на белтъка, докато  $\alpha$ -хеликазният домен е важен за свързването на Елонгин В и С [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010]. Следователно, тези функции на белтъка най-вероятно са засегнати от мутациите, открити при нашите пациенти. На тази база се оценява патогенния характер на тези мутационни варианти и връзката им с фенотипната изява при пациентите.

*Missense* замените във *VHL* гена са най-чести, около 50%. Като най-често засяган и описван като “hot spot” кодон е кодон 167, в който аминокиселината аргинин (Arg) е заменена с глутамин (Gln), както се наблюдава при Пациент 2 от настоящото

изследване. Съществува и друг вариант на замяна, при която Arg може да бъде заменена с триптофан (Trp) [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010]. В проучване на Nordstrom и сътрудници, се установява, че при пациенти носещи *missense* замяна в този кодон съществува 63% риск за развитие на Фео [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010]. Мутацията с.500G>A (p.Arg167Gln) възниква в 35,3% от семействата с VHL тип 2 и при 9,5% от всички семейства с VHL. Като вероятно обяснение за високата мутационна честота в този кодон се предполага наличието на CpG острови в близките и заобикалящи кодона райони [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010]. Обикновено *missense* мутациите се асоциират с риск за развитие на Фео или VHL тип 2 [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010], както се наблюдава и при нашия Пациент 2, носител на мутацията с.500G>A, p.Arg167Gln, чиито фенотип включва Фео и рХБ. Идентична фенотипна изява е наблюдавана в две поредни поколения на това семейство, което на базата на клиничната картина се причислява към VHL тип 2a (Таблица 4 от раздел „Литературен обзор“; Таблица 33, Пациент 2).

Втората *missense* мутация с.332G>A, p.Ser111Asn във VHL гена беше открита при Пациент 5 на 60 г.в., чиято клиника включва БКК и цХБ. Тази мутация е свързана с развитието на VHL тип 1, без наличие на Фео. Мутацията е добре известна и описвана в световната литература [Ruiz-Llorente *et al.*, 2004]. Ser111 попада в рамките на  $\beta$ -домена на pVHL и действа като водород-свързващ партньор на специална хидроксилна група от HIF1- $\alpha$  (субединица от хетеродимерен транскрипционен фактор HIF1), участваща във формирането на убиквитиниращ комплекс [Kim *et al.*, 2005; Jimenez *et al.*, 2009; Maher *et al.*, 2011]. Замяната на хидрокси- аминокиселината серин (Ser) с amidната- аминокиселината аспарагин (Asn), вероятно повлиява физико-химичните свойства на белтъка и функцията му да се свързва към HIF1- $\alpha$ .

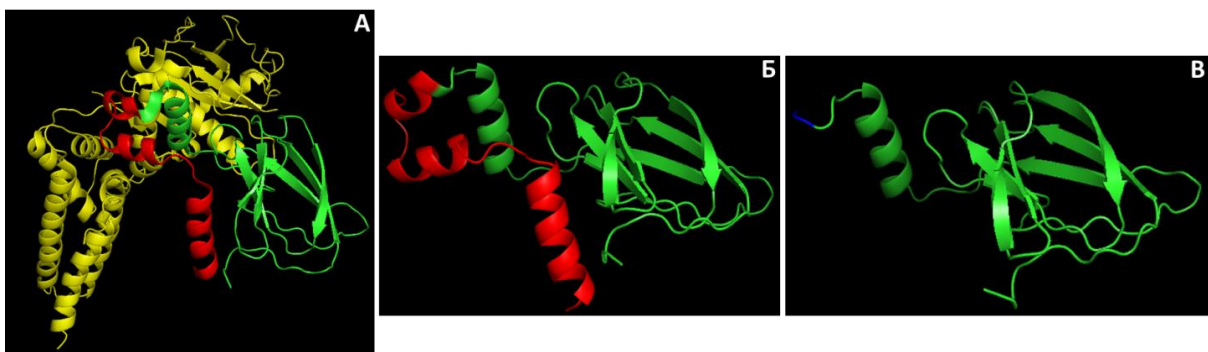
Интерес представлява откритият хетерозиготен *missense* вариант с.598C>T, p.Arg200Thr (Таблица 34, Пациент 12). В литературата хомозиготно носителство на този вариант се асоциира с рядко състояние известно като Чувашки тип конгенитална полицитемия [Pastore *et al.*, 2003; Gordeuk *et al.*, 2004; Maher *et al.*, 2011] и не се свързва с класическото състояние на неопластичен растеж характерен за пациенти с VHL. При нашия Пациент 12 не се наблюдава еритроцитоза, тромбоза или аномалии на кръвоносните съдове. В резултат на което при този пациент заключихме, че откритият вариант в хетерозиготно състояние е с неясна клинична значимост. Като диференциална диагностика беше предположен Cowden-Lhermitte-Duclos синдром, поради наблюдаваната фенотипна изява на пациента, след което беше проведен

молекулно-генетичен анализ на *PTEN* и *SDHB* гените, но не бяха открити генетични варианти в тях. Като бъдеща следваща стъпка би могло да се премине към извършване на MLPA анализ на тези гени.

Мутациите водещи до преждевременно спиране на белтъчния синтез като *frameshift* и *nonsense* са свързани с развитие на VHL тип 1 [Zhang *et al.*, 2015]. Те са асоциирани с по-висок риск за развитието на цХБ в сравнение с *missense* мутациите [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010]. Герминативни мутации, водещи до скъсен pVHL се асоциират с 40% по-висок риск за развитие на БКК в сравнение с пациенти носещи герминативни *missense* мутации [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010]. При нашия Пациент 1 с делеция на 30 базови двойки в екзон 1 на *VHL* гена, фенотипната изява включва билатерални рХБ и единичен ХБ на С6 прешлен в ранна тинейджърска възраст, което го отнася към VHL тип 1. В допълнение, според типа на откритата мутация при този пациент предполагаме по-висок риск за развитие на допълнителни неоплазми с напредване на възрастта (Таблица 33, Пациент 1) [Lonser *et al.*, 2014].

Откритата *nonsense* мутация с.481C>T, p.Arg161\* в екзон 3 на *VHL* гена, при Пациент 4 предполага загуба на функционален pVHL. Това би довело до високи нива на неразграден HIF, което ще увеличи транскрипционната активност на VEGF, PDGF и TGF- $\alpha$  и ще предизвика последващо развитие на микроваскуларни съдове и ускорен клетъчен растеж в ХБи, БКК и други тумори свързани с VHL [Shuin *et al.*, 2006]. Клиничната картина на Пациент 4 включва именно такива туморни образувания: два цХБ и два БКК. Асоциацията между развитието на БКК и високите нива на ангиогенеза и полицитемия вероятно е резултат от адаптивния отговор към кислородната недостатъчност на клетките [Haase, 2006]. Според литературните данни се предполага, че мъжете имат по-висок риск за развитие на цХБ и по-тежка клинична картина, най-вероятно поради хормонално влияние върху развитието и растежа на този тип тумори [Lonser *et al.*, 2014], което е още едно обяснение за тежката клинична симптоматика при този пациент. По данни на лекуващия лекар, случаят е фамилен и в семейството има още засегнати членове от мъжки пол, което подкрепя гореизложената хипотеза. Членовете на семейството обаче са недостъпни, за да бъде извършено молекулно-генетично изследване и при тях. Интересно е, че Cho и сътрудниците му описват същата мутация p.Arg161\* при 22-годишно момче с позитивна фамилна история и изолиран рХБ [Cho *et al.*, 2009]. По-скорошно проучване съобщава за 48-годишен мъж с клинична картина включваща БКК, а неговата дъщеря е носител на фамилната мутация p.Arg161\* в мозаечен генотип [Corpin *et al.*, 2014].

Първото КМС във *VHL* гена беше съобщено в сетовната литература от нашия екип. Предполагаме, че КМС p.(Glu173Serfs\*4) води до скъсен белтък. Мутацията е локализирана в  $\alpha$ -хеликазния домен на pVHL, включващ аминокиселинни остатъци от 155 до 192 [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010]. Този домен е отговорен за свързването на Елонгин В и С, което се случва при аминокиселинни остатъци 158 до 184 [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010]. Като резултат от замяната на аминокиселината глутамин (Glu) в позиция 173 следва реанжировка на разположените след нея аминокиселини, при което се засягат именно местата за свързване на Елонгин В и С, причиняващо невъзможност за формиране на pVHL-ЕлонгинВ-С тумор-супресорен комплекс. Мутациите, които нарушават функцията на pVHL се очаква да са асоциирани със сериозен патогенен ефект поради загубата на  $\alpha$ -домена, който е изключително важен за формиране и стабилизиране на 3D конформацията на белтъка в този комплекс. Комплексът действа като негативен регулатор на растежни и васкулизиращи белтъци [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010; Feldman *et al.*, 1999], а когато е дестабилизирана или нарушена неговата структура тази негативна регулация също е нарушена или липсваща. 3D белтъчна структура на нормален pVHL и мутантен pVHL в резултат на мутацията p.(Glu173Serfs\*4) е представена на Фигура 50.



**Фигура 50. 3D белтъчни структури:**

А) Структура на VHL–ЕлонгинBC–Cul2 тумор-супресорен комплекс [Protein Data Bank в Европа; [www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/4WQO](http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/4WQO)];

Б) Нормален pVHL (див тип белтък) [<https://www.swissmodel.expasy.org/>; визуализиран в PyMol, <https://www.pymol.org/>];

В) Мутантен p.(Glu173Serfs\*4) pVHL [<https://www.swissmodel.expasy.org/>; визуализиран в PyMol, <https://www.pymol.org/>]. Във всеки един от моделите липсват първите 59 аминокиселинни остатъка, тъй като регионът е извън известната кристална структура на белтъка.

На генетично ниво КМС c.[516\_517dupGTCAAGCCT; 532\_542delCTGGACATCGTinsATTA] включва дупликация на 9 нуклеотида и *indel* 15 нуклеотида след делецията (downstream) включваща делеция на 11 базови двойки и

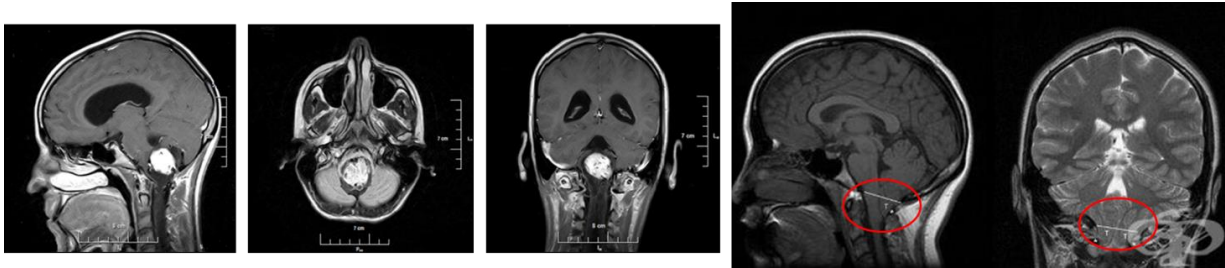
инсерция на 4 базови двойки. На Фигура 51 е представена схема на описаната реанжировка.



**Фигура 51. Схематично представяне на новооткритото КМС във VHL гена.**

**Легенда:** нв – нормална верига; мв – мутантна верига; dup – дупликация; del – делеция; ins - инсерция

Тази комплексна нуклеотидна реанжировка е интересна и от хромозомна гледна точка. Сравнихме региона, който е засегнат от КМС като използваме базата данни на Genome Browser и опцията „Blat“, където въведохме 20 базови двойки от региона на мутацията и получихме съвпадение от 100% с регион от хромозома 21 (21q21.1), използвайки за референтна геномна секвенция GRCh37/hg19 [<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>]. Идентичният регион включващ 20-те базови двойки се разполага между четвърти и пети екзон на *MIR99AHG* гена (известен още като *MONC*), който продуцира зряла (процесирана) дълга интергенна некодираща РНК (long intergenic noncoding RNA, lincRNA) и 3 интронни микроРНКи (microRNA). Интрон 6 на *MONC* продуцира три малки ядрени РНКи (miRNAs) - MIR99A, LET7C и MIR125B2. LincRNA и miRNA произлизащи от *MONC* гена и MIR100HG се експресират във висока степен в клетъчни линии при акутна мегакариобластна левкемия (acute megakaryoblastic leukemia, АМКЛ) в сравнение с други клетъчни линии при левкемии [Emmrich *et al.*, 2014]. Като възможен механизъм за възникване на това сложно мутационно събитие предполагахме протичането на кросингоувър между хромозоми 21 и хромозома 3, където е локализиран генът *VHL*. Както беше споменато по-горе *frameshift* мутациите, към които се причислява и откритото от нашия екип КМС при Пациент 3 предизвиква промяна в рамката на четене на генетичната информация и е асоциирано с тежка клинична симптоматика, включваща цХБ. Интересно е да се отбележи, че възрастта на поява на цХБ е около 29 години ( $\pm 10$  години) [Maher *et al.*, 1990], докато при нашия Пациент 3 след провеждането на образна диагностика, когато се открива туморното образуване, пациентката е на 27 г.в., когато става ясно, че образуването е с изключително големи размери за тази възраст. На Фигура 52 е представен резултат от ЯМР на Пациент 3 (Таблица 33).



**Фигура 52.** Гадолинно-белязан T1-засилен аксиален ЯМР при Пациент 3. Подчертан хиперинтензивен лобуларен тумор с микрокистозни компоненти, който се вижда в долната четвърта камера. Налице е перифокален едем в продълговатия мозък и в церебралния вермис.

В прицелната група беше проведен и скрининг на вариант с.870A>G в *CCND1* гена, описван като модификатор на VHL [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/13755/>]. За *CCND1* гена се предполага, че повлиява циклин D1 (Cyclin D1) сплайсинга. Свърхекспресията на циклин D1 причинява абнормен изход на клетъчния цикъл поради липса на арест в G1 фазата, което се свързва с развитието на различни типове рак включително първични тумори и БКК [Zatyka *et al.*, 2002b]. Известно е, че G-алелът е асоцииран с по-ранна поява на цХБ и увеличен риск за по-голям брой ретинални ангиоми в сравнение с хомозиготните A/A носители [Zatyka *et al.*, 2002b]. Всеки един от нашите генетично верифицирани случаи с VHL е носител на рисковия G - алел, което би могло да бъде използвано като евентуален прогностичен маркер за развитие на заболяването. Необходимо е обаче извършване на бъдещо асоциативно проучване върху по-голяма бройка засегнати пациенти и сравнение с контролна група. Наблюдава се също, че само при пациентите носители на вариант с.870A>G в хомозиготно състояние фенотипната изява включва и БКК в сравнение с останалите пациенти, които са хетерозиготни по рисковия алел G и не развиват БКК (Таблица 35, Пациент 4 и 5).

#### **Генотип-фенотипни корелации**

В прицелната група от български пациенти бяха открити общо 5 различни генетични варианти, два от които са *missense* мутации, докато останалите 3 са от различен тип – една *nonsense*, една делеция на 30 нуклеотида и едно КМС, включващо делеция и *indel*. Малката бройка от изследвани и верифицирани случаи затруднява извършването на ясни генотип-фенотипни корелации. От литературата е известно, че мутациите водещи до преждевременно спиране на белтъчния синтез като *frameshift* и *nonsense* са свързани с развитие на VHL тип 1 [Zhang *et al.*, 2015]. Четири от петте генетично верифицирани случаи се отнасят към VHL тип 1 (без Фео) (Таблица 33),

като детектираните мутации покриват пълния мутационен спектър включващ *missense* мутация, *nonsense* мутация, голяма делеция и КМС, нарушаващо рамката на четене на генетичната информация. По литературни данни е известно, че *frameshift* и *nonsense* мутациите са асоциирани с по-висок риск за развитите на цХБ в сравнение с *missense* мутациите [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010]. При двама от нашите пациенти откриваме *missense* мутации, само единият от които обаче освен цХБ има и БКК (Таблица 33, Пациент 5), докато другият се отнася към VHL тип 2а, тъй като фенотипната изява включва рХБ и Фео (Таблица 33, Пациент 2). Герминативни мутации, водещи до скъсен pVHL се асоциират с 40% по-висок риск за развитие на БКК в сравнение с пациенти носещи герминативни *missense* мутации, което се наблюдава при нашия пациент с *nonsense* мутация. БКК обаче както стана ясно има и при единия от пациентите с *missense* мутация, жена на 60 г.в (Таблица 33, Пациент 5). Известно е, че БКК се развива на възраст около 44 години ( $\pm 10,9$  години) [Maher *et al.*, 1990], както е и при двамата наши пациенти с БКК. Те към датата на генетичното изследване са били на възраст 46 и 60 години, респективно. Необходимо е увеличаване на групата генетично-верифицирани случаи, за да могат да бъдат интерпретирани по-детайлно генотип-фенотипните корелации.

#### 4.3.4. Обобщение на резултатите от VHL

В изследваната група от български пациенти с предполагаема клинична диагноза VHL, след извършване на молекулно-генетичен анализ на *VHL* гена бяха открити 5 различни генетични мутации. Една от мутациите представлява първото открито КМС във *VHL* гена, комбиниращо дупликация и *indel*. Диагнозата беше потвърдена при 42% от изследваните пациенти (5/12). Заболяването е изключително хетерогенно и от голямо значение е лекарите специалисти в областта да познават добре клиничните критерии за поставяне на диагнозата, което е добра платформа за извършване на молекулно-генетично изследване на *VHL* гена с цел генетично верифициране на клиничната диагноза. Своевременното и прецизно диагностициране на VHL би могло да подобри превенцията на заболяването и успешното лечение на злокачествените образувания. Ранната детекция и премахването на туморните образувания биха могли да предотвратят или минимизират развитието на неврологични симптоми, загуба на слух, загуба на зрение и нуждата от бъбречна заместителна терапия.

#### 4.4. ОБОБЩЕНИЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ И ЗАКЛУЧЕНИЕ

Настоящият дисертационен труд е посветен на Факоматози, група от наследствени мултисистемни заболявания, които се характеризират с развитие на туморни образувания засягащи централна и периферната нервна система, както и различни органи на човешкото тяло. Разработката включва охарактеризиране на молекулно-генетично ниво на заболяванията: Неврофиброматоза тип 1 и тип 2, Комплекс туберозна склероза и синдром на von Hippel-Lindau. До момента наличните данни за генетично верифицирани случаи на български пациенти с тези заболявания са изключително оскъдни. Попаднахме само на едно съобщение в световната литература, касаещо един български пациент с генетично верифициран VHL [Bachurska *et al.*, 2014]. Настоящото проучване има пилотна роля по отношение на въвеждане на молекулно-генетична диагностика на тези заболявания в България. Нашият екип приложи модерни, но същевременно и утвърдени за диагностични цели методи с цел идентификация на патогенните варианти, в наследствената информация на изследваните пациенти, имащи отношение към фенотипната изява на заболяванията.

При извършване на молекулно-генетичния анализ чрез секвениране по Sanger и MLPA анализ на *NF1* гена клинично поставената диагноза беше потвърдена при двадесет и пет от тридесет и пет изследвани семейства или общо при 71% от прицелната група. Пет от откритите 25 генетични варианти в *NF1* гена са нови за световната литература: две мутации засягащи сплайсинга, малка делеция на пет нуклеотида и дупликация на един нуклеотид. Петият нов вариант беше открит след провеждането на допълнителен анализ на 20 дълбоко интронни варианти в *NF1* гена. Идентифицирането на мутацията, причиняваща характерната фенотипната изява, позволява проследяване на дефекта в семейството, дори и пренатално, както беше направено в едно от засегнатите семейства. Като най-чести типове генетични дефекти в изследваната прицелна група се наблюдават *nonsense* мутациите (32%), след тях са *frameshift* мутациите (24%), следвани от *splice site* мутации (20%) и *missense* мутации (16%). Точковите мутации представляват 92% от генетично верифицираните български случаи, докато 8% от мутациите са големи делеции, което съответства на литературните данни за разпределение на мутациите в *NF1* гена. Общо 72% от генетично верифицираните случаи засягат жени и само 28% засягат мъже. При един от негативните случаи диагнозата беше преразгледа и след допълнителен анализ беше

открит патологичен вариант в *TSC2* гена, което потвърждава важността от покриване на клиничните критерии за всяко едно от заболяванията попадащи в групата на Факоматозите. Генотип-фенотипните корелации при пациенти с NF1 са трудни за интерпретиране, поради изключително комплексния фенотип на засегнатите пациенти, представляващ комбинация от много типични клинични характеристики, различна възраст на поява на различните симптоми и огромна генетична хетерогенност по отношение на патогенните мутации.

При извършване на молекулно-генетичен анализ чрез секвениране по Sanger и MLPA анализ на *NF2* гена клинично поставената диагноза беше потвърдена при трима от шест изследвани пациенти или общо 50%. За България това е първото по рода си проучване на това заболяване. Една от откритите мутации е нова за световната литература представляваща *in-frame* делеция локализирана в  $\alpha$ -хеликазния домен на мерлин, мутации в който са изключително редки. Като най-чести типове генетични дефекти в изследваната група се наблюдават *nonsense* мутациите 67% (2/3), следвани от *in-frame* мутациите 33% (1/3). Около 67% от генетично верифицираните случаи засягат жени и 33% засягат мъже.

Съществува относително строга генотип-фенотипна корелация при клиничната изява на NF2 в зависимост от типа и позицията на мутацията. Мутации, засягащи началните екзони на гена се свързват с по-тежка клинична изява. Също така най-често срещаните мутации са *nonsense* в CpG острови, което се вижда при два от нашите генетично верифицирани случаи, при които бяха детектирани *nonsense* мутации със заменена азотна база цитозин. Тези генетични варианти са локализирани в екзони 6 и 8, и фенотипната изява включва множество различни туморни образувания характерни за NF2. Това показва, че *nonsense* мутациите в началните участъци на NF2 гена при български пациенти също се свързват с по-тежка фенотипна изява.

Настоящото проучване представлява и първата стъпка по посока на молекулно-генетично охарактеризиране на Комплекс туберозна склероза при български пациенти. При извършване на генетичен анализ чрез секвениране по Sanger и MLPA анализ първо на *TSC2* гена и след това на *TSC1* гена диагнозата беше потвърдена при 90% (19/21) или 94% (18/19 от български произход) от анализирания прицелна група включваща общо 21 индексни пациенти (двама от румънски произход). Бяха открити общо 19 мутации: 11 в *TSC2* гена и 8 в *TSC1* гена. Четири от 11-те мутации в *TSC2* гена са нови, от които 2 са *nonsense*, 1 *frameshift* и 1 голяма делеция, а останалите 7 са известни и описвани в световната литература. Две от 8-те мутации в *TSC1* гена са нови мутации,

от които 1 е *nonsense* и 1 е *frameshift*, останалите 6 са известни и описвани в световната литература. Детектираните варианти в *TSC2* гена в нашата група са *missense* (36% при 4/11), *frameshift* (27% при 3/11), *nonsense* (18% при 2/11) мутации, една *splice site* мутация (10%) и една голяма делеция (10%), докато повечето от мутациите в *TSC1* гена са *nonsense* мутации (63% при 5/8) и *frameshift* мутации, една от които е при пациент от румънски произход, като общият процент е по-малък в сравнение с този при *nonsense* мутациите (38% при 3/8 или 29% при 2/7 от български произход). Не беше направена ясна генотип-фенотипна корелация поради изключително хетерогенната клинична изява на това заболяване в изследваната прицелна група.

В рамките на настоящия труд бяха изследвани 12 пациента с клинична диагноза *VHL*. В анализираната група бяха открити 5 мутации във *VHL* гена, като една от тях е нова за световната литература, представляваща първото комплексно мутационно събитие във *VHL* гена. Останалите четири мутации открити при изследваните български пациенти са добре известни и описани в световната литература, свързани с типичната клинична картина на *VHL*. Диагнозата беше потвърдена при 42% от изследваните пациенти (5/12). Тъй като *VHL* е изключително рядко заболяване недостатък на изследването е малкият брой анализирани индивиди, което затрудни интерпретацията на генотип-фенотипни корелации. Известно е, че заболяването се характеризира с изключително хетерогенна клинична изява и от голямо значение е лекарите, специалисти в областта да познават добре клиничните критерии необходими за поставяне на диагнозата. Това е важна предпоставка за извършване на адекватни генетични изследвания върху *VHL* гена с цел молекулно верифициране на поставената клиничната диагноза.

Молекулно-генетичният анализ на *NF1*, *NF2*, *TSC2*, *TSC1* и *VHL* гените ще даде възможност българските пациенти да бъдат рано и прецизно диагностицирани на ДНК ниво, което е от изключително значение за генетично верифициране на диагнозата и назначаване на адекватна терапия при заболявания с припокриваща се фенотипна изява, каквито са Факоматозите. Идентифицирането на генетичния вариант, причиняващ патологията е ключов момент и за изясняване на носителския статус на родствениците, които имат риск да развият и/или да предадат съответния генетичен дефект в поколението си. Това е важна предпоставка за адекватно семейното планиране и генетично консултиране на засегнатите семейства.

## 5. ИЗВОДИ

**5.1.** Въведените молекулно-генетични подходи за идентификация на патологични варианти в *NF1*, *NF2*, *TSC2*, *TSC1* и *VHL* гените са подходящи за генетично верифициране на пациенти с Неврофиброматоза тип 1, тип 2, Комплекс туберозна склероза и синдром на von Hippel-Lindau тъй като доведоха до изясняване на:

- 71% от пациентите в групата с Неврофиброматоза тип 1 (NF1)
- 50% от пациентите в групата с Неврофиброматоза тип 2 (NF2)
- 94% от пациентите в групата с Комплекс туберозна склероза (TSC)
- 42% от пациентите в групата със синдром на von Hippel-Lindau (VHL)

Тези данни предполагат много прецизно клинично подбрани пациентски групи.

**5.2.** Изследваните български NF1, NF2, TSC и VHL групи се характеризират с уникални генетични характеристики, за което свидетелстват новооткритите мутации в петте анализирани гени:

- *NF1* ген: 5 мутации, от които 2 засягащи сплайсинга; делеция на пет нуклеотида; дупликация на един нуклеотид и един дълбоко интронен вариант.
- *NF2* ген: *in-frame* делеция
- *TSC2* ген: 4 мутации, от които 2 *nonsense*, 1 *frameshift* и 1 голяма делеция
- *TSC1* ген: 2 мутации, от които 1 *nonsense* и 1 *frameshift*
- *VHL* ген: първото комплексно мутационно събитие (КМС) във *VHL* гена

**5.3.** Най-честите генетични дефекти в NF1 прицелната група са: *nonsense* мутациите (32%), след тях са *frameshift* мутациите (24%), следвани от *splice site* мутациите (20%) и *missense* мутациите (16%). Точковите мутации представляват 92% от генетично верифицираните български случаи, докато 8% от мутациите са големи делеции, което съответства с литературните данни за разпределение на мутации в *NF1* гена.

**5.4.** Най-честите генетични дефекти в NF2 прицелната група са: *nonsense* мутации (67%), следвани от *in-frame* мутации (33%).

- 5.5.** Най-честите генетични дефекти в TSC прицелната група, в *TSC2* гена са: *missense* мутации (36%), следвани от *frameshift* мутации (27%), *nonsense* мутации (18%), и по-рядко само в един случай *splice site* мутация (10%) и една голяма делеция (10%). За разлика от *TSC2*, повечето от детектираните варианти в *TSC1* гена са: *nonsense* мутации (63%), следвани от *frameshift* мутации, една от които е открита при пациент от румънски произход, като общият им процент е по-малък (38% или 29% при пациентите от български произход).
- 5.6.** В прицелната група от VHL пациенти бяха открити общо 5 различни генетични варианти: две *missense* мутации, докато останалите 3 са от различен тип – една *nonsense*, една 30 базова делеция и едно КМС, включващо дупликация и *indel*.
- 5.7.** Генотип-фенотипните корелации при пациенти с NF1 са трудни за интерпретиране, поради изключително комплексния фенотип на засегнатите пациенти, различна възраст на поява на клиничните симптоми и огромна генетична хетерогенност по отношение на типа и локализацията на патогенните мутации. В част от родословията обаче се наблюдава тежка антисипация при предаването на една и съща мутация в поколението.
- 5.8.** Съществува относително строга генотип-фенотипна корелация при клиничната изява на NF2 в зависимост от типа и локализацията на мутацията по дължината на гена.
- 5.9.** В изследваната прицелна група с Комплекс туберозна склероза клиничната изява е изключително хетерогенна, което не даде възможност да се извлече ясна генотип-фенотипна корелация. Констатирана беше тежка антисипация в част от засегнатите семейства.
- 5.10.** Поради малкия брой изследвани пациенти със синдром на von Hippel-Lindau не бяха забелязани ясни генотип-фенотипни корелации.

## 6. БИБЛИОГРАФИЯ

### 6.1. Чуждоезична литература

1. Abramowicz A and Gos M. (2014) Neurofibromin in neurofibromatosis type 1 – mutations in NF1 gene as a cause of disease. *Dev Period Med.* 18(3):297-306.
2. Andreas L. Serra, Olivier Bonny, Sarah Bürki, Thomas Dorn, Daniel Fuster, Raphael Guzman, Günther Hofbauer, Benoit Jenny, Christian Kätterer, Barbara Plecko-Startinig, Lisa Weibel, Patrick Roth, Maja Steinlin, Gabriele Wohlrab, Patricia E. Dill. (2013) Tu beröse Sklerose: Pathogenese, Klinik und neue Therapieansätze. *Curriculum. Schweiz Med Forum.* 13(36):696-702.
3. Asthagiri AR, Mehta GU, Zach L, Li X, Butman JA, Camphausen KA, Lonser RR. (2010) Prospective evaluation of radiosurgery for hemangioblastomas in von Hippel-Lindau disease. *Neuro Oncol.* 12(1):80-6.
4. Astrinidis A and Henske EP. (2005) Tuberous sclerosis complex: linking growth and energy signaling pathways with human disease. *Oncogene.* 24(50):7475-81.
5. Astrinidis A, Cash TP, Hunter DS, Walker CL, Chernoff J and Henske EP. (2002) Tuberin, the tuberous sclerosis complex 2 tumor suppressor gene product, regulates Rho activation, cell adhesion and migration. *Oncogene.* 21:8470–8476.
6. Au KS, Williams AT, Gambello MJ and Northrup H. (2004) Molecular genetic basis of tuberous sclerosis complex: from bench to bedside. *J Child Neurol.* 19(9):699-709.
7. Bachurska S, Staykov D, Belovezhov V, Sasano H, Gulinac M, Stefanov C, Neumann HP. (2014) Bilateral pheochromocytoma/intra-adrenal paraganglioma in von Hippel-Lindau patient causing acute myocardial infarction. *Pol J Pathol.* 65 (1): 78-82.
8. Bandipalliam P. (2005) Syndrome of early onset colon cancers, hematologic malignancies & features of neurofibromatosis in HNPCC families with homozygous mismatch repair gene mutations. *Fam Cancer.* 4:323–333.
9. Barbagallo JS, Kolodzieh MS, Silverberg NB, Weinberg JM. (2002) "Neurocutaneous disorders". *Dermatologic clinics* 20 (3):547–60, viii.
10. Baser ME, Kuramoto L, Woods R, Joe H, Friedman JM, Wallace AJ, Ramsden RT, Olschwang S, Bijlsma E, Kalamarides M, Papi L, Kato R, Carroll J, Lázaro C, Joncourt F, Parry DM, Rouleau GA, Evans DG. (2005) The location of constitutional neurofibromatosis 2 (NF2) splice site mutations is associated with the severity of NF2. *J Med Genet.* 42(7):540-6.
11. Ben-Skowronek I and Kozaczuk S. (2015) Von Hippel-Lindau Syndrome. *Horm Res Paediatr.* 84(3):145-52.
12. Benvenuto G, Li S, Brown SJ, Braverman R, Vass WC and Cheadle JP. (2000) The tuberous sclerosis-1 (TSC1) gene product hamartin suppresses cell growth and augments the expression of the TSC2 product tuberin by inhibiting its ubiquitination. *Oncogene.* 19:6306-6316
13. Best SL, Park SK, Youssef RF, Olweny EO, Tan YK, Trimmer C, Cadeddu JA. (2012) Long-term outcomes of renal tumor radio frequency ablation stratified by tumor diameter: size matters. *J Urol.* 187(4):1183-9.
14. Binderup ML, Bisgaard ML, Harbud V, Møller HU, Gimsing S, Friis-Hansen L, Hansen Tv, Bagi P, Knigge U, Kosteljanetz M, Bøgeskov L, Thomsen C, Gerdes AM, Ousager LB, Sunde L. (2013) Danish vHL Coordination Group. Von Hippel-Lindau disease (vHL). National clinical guideline for diagnosis and surveillance in Denmark. 3rd edition *Dan Med J.* 60(12):B4763.
15. Bishop JM. (1995) Cancer: The rise of the genetic paradigm. *Genes and Development.* 9(11):1309-1315.
16. Bissler JJ, Kingswood JC, Radzikowska E, Zonnenberg BA, Frost M, Belousova E, Sauter M, Nonomura N, Brakemeier S, de Vries PJ, Whittemore VH, Chen D, Sahmoud T, Shah G, Lincy J, Leibold D, Budde K. (2013) Everolimus for angiomyolipoma associated with tuberous sclerosis complex or sporadic lymphangiomyomatosis (EXIST-2): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 381:817–24.

17. Bollag G, McCormick F and Clark R. (1993) Characterization of full-length neurofibromin: tubulin inhibits Ras GAP activity. *EMBO J.* 12(5):1923-7.
18. Bourneville Dm. (1880) Sclerose Tubereuse Des Circonvolutions Cerebrales: Idiotie Et Epilepsie Hemiplegique. *Arch Neurol (Paris)*. 1:81-91.
19. Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C. (2004) *Rook's Textbook of Dermatology*. Wiley-Blackwell, Vol 4, pp5
20. Camposano SE, Major P, Halpern E, Thiele EA. (2008) Vigabatrin in the treatment of childhood epilepsy: a retrospective chart review of efficacy and safety profile. *Epilepsia*. 49:1186-91.
21. Carol L Shields, Jerry A Shields. (2013) Phakomatoses. In *Retina (Fifth Edition)*.
22. Cho HJ, Ki CS, Kim JW. (2009) Improved detection of germline mutations in Korean VHL patients by multiple ligation-dependent probe amplification analysis. *J Korean Med Sci*. 24(1):77-83.
23. Chong-Kopera H, Inoki K, Li Y, Zhu T, Garcia-Gonzalo FR, Rosa JL et al. (2006) TSC1 stabilizes TSC2 by inhibiting the interaction between TSC2 and the HERC1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*. 281:8313-8316.
24. Consugar MB, Wong WC, Lundquist PA, Rossetti S, Kubly VJ, Walker DL, Rangel LJ, Aspinwall R, Niaudet WP, Ozen S, David A, Velinov M, Bergstralh EJ, Bae KT, Chapman AB, Guay-Woodford LM, Grantham JJ, Torres VE, Sampson JR, Dawson BD, Harris PC. (2008) Characterization of large rearrangements in autosomal dominant polycystic kidney disease and the PKD1/TSC2 contiguous gene syndrome. *Kidney Int*. 74:1468-79.
25. Cooper J, Giancotti FG. (2014) Molecular insights into NF2/Merlin tumor suppressor function. *FEBS Lett*. 588(16):2743-52.
26. Coppin L, Grutzmacher C, Crépin M, Destailleur E, Giraud S, Cardot-Bauters C, Porchet N, Pigny P. (2014) VHL mosaicism can be detected by clinical next-generation sequencing and is not restricted to patients with a mild phenotype. *Eur J Hum Genet*. 22(9):1149-52.
27. Costa-Mattioli M and Monteggia LM. (2013) mTOR complexes in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*. 16(11):1537-43.
28. Cox R, Vang R, Epstein JI. (2014) Papillary cystadenoma of the epididymis and broad ligament: morphologic and immunohistochemical overlap with clear cell papillary renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 38(5):713-8.
29. Crino Pb, Nathanson KI, Henske Ep. (2006) The Tuberous Sclerosis Complex. *N Engl J Med*. 355:1345-1356.
30. Crowe FW, Schull WJ and Neel JV. (1956) *Clinical, pathological, and genetic study of multiple neurofibromatosis*. Springfield (IL): Charles C Thomas, 181.
31. Curatolo P, Bjørnvold M, Dill PE, Ferreira JC, Feucht M, Hertzberg C, Jansen A, Józwiak S, Kingswood JC, Kotulska K, Macaya A, Moavero R, Nabbout R, Zonnenberg BA. (2016) The Role of mTOR Inhibitors in the Treatment of Patients with Tuberous Sclerosis Complex: Evidence-based and Expert Opinions. *Drugs*. 76(5):551-65.
32. Curatolo P, Bombardieri R, Jozwiak S. (2008) Tuberous Sclerosis. *Lancet*. 372:657-668.
33. Curto M and Mc Clatchey Al. (2008) Nf2/Merlin: A coordinator of receptor signalling and inter cellular contact. *Brit J Cancer*. 98(2):256-62.
34. D'Arco F, D'Amico A, Caranci F, Di Paolo N, Melis D, Brunetti A. (2014) Cerebrovascular stenosis in neurofibromatosis type 1 and utility of magnetic resonance angiography: our experience and literature review. *Radiol Med*. 119(6):415-21.
35. Dabora SL, Jozwiak S, Franz DN, Roberts PS, Nieto A, Chung J, Choy YS, Reeve MP, Thiele E, Egelhoff JC, Kasprzyk-Obara J, Domanska-Pakiela D, Kwiatkowski DJ. (2001) Mutational analysis in a cohort of 224 tuberous sclerosis patients indicates increased severity of TSC2, compared with TSC1, disease in multiple organs. *Am J Hum Genet*. 68(1):64-80.
36. Dasgupta B, Dugan LL, Gutmann DH. (2003) The neurofibromatosis 1 gene product neurofibromin regulates pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-mediated signaling in astrocytes. *J Neurosci*. 23(26):8949-54.
37. Datta AN, Hahn CD, Sahin M. (2008) Clinical presentation and diagnosis of tuberous sclerosis complex in infancy. *J Child Neurol*. 23:268-273.
38. DeBella K, Poskitt K, Szudek J, Friedman JM. (2000) Use of "unidentified bright objects" on MRI for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *Neurology*. 54(8):1646-51.

39. DeClue JE, Cohen BD, Lowy DR. (1991) Identification and characterization of the neurofibromatosis type 1 protein product. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88(22):9914-8.
40. Deo M, Huang JL, Fuchs H, de Angelis MH, Van Raamsdonk CD. (2013) Differential effects of neurofibromin gene dosage on melanocyte development. *J Invest Dermatol*. 133(1):49-58.
41. Dimitrova V, Yordanova I, Pavlova V, Valtchev V, Gospodinov D, Parashkevova B, Balabanov C. (2008) A CASE OF NEUROFIBROMATOSIS TYPE 1. *Journal of IMAB - Annual Proceeding (Scientific Papers)*, vol. 14, book 1. DOI: 10.5272/jimab.14-1-2010.63.
42. Dollfus H, Massin P, Taupin P, Nemeth C, Amara S, Giraud S, Bérout C, Dureau P, Gaudric A, Landais P, Richard S. (2002) Retinal hemangioblastoma in von Hippel-Lindau disease: a clinical and molecular study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 43(9):3067-74.
43. Dow G, Biggs N, Evans G, Gillespie J, Ramsden R, King A. (2005) Spinal tumors in neurofibromatosis type 2. Is emerging knowledge of genotype predictive of natural history? *J Neurosurg Spine*. 2:574-9
44. Emmrich S, Streltsov A, Schmidt F, Thangapandi VR, Reinhardt D, Klusmann JH. (2014) LincRNAs MONC and MIR100HG act as oncogenes in acute megakaryoblastic leukemia. *Mol Cancer*. 13:171.
45. European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium. (1993) "Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16". *Cell*. 75(7):1305-15.
46. Evans DG, Baser ME, McGaughran J, Sharif S, Howard E, Moran A. (2002) Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J Med Genet*. 39:311-314.
47. Evans DG, Huson SM, Donnai D et al. (1992) A genetic study of type 2 neurofibromatosis in the United Kingdom. II. Guidelines for genetic counselling. *Med Genet*. 29(12):847-52.
48. Evans DG. (2009) Neurofibromatosis type 2 (NF2): a clinical and molecular review. *Orphanet J Rare Dis*. 19:4-16.
49. Evans DGR, Trueman L, Wallace A et al. (1998) Genotype phenotype correlations in NF2. *J Med Genet*. 35(6):450-5.
50. Feldman DE, Thulasiraman V, Ferreyra RG, Frydman J. (1999) Formation of the VHL-elongin BC tumor suppressor complex is mediated by the chaperonin TRiC. *Mol Cell*. 4(6):1051-61.
51. Feliciano DM, Lin TV, Hartman NW, Bartley CM, Kubera C, Hsieh L, Lafourcade C, O'Keefe RA, Bordey A. (2013) A circuitry and biochemical basis for tuberous sclerosis symptoms: from epilepsy to neurocognitive deficits. *Int J Dev Neurosci*. 31(7):667-78.
52. Ferner RE and Gutmann DH. (2013) Neurofibromatosis type 1 (NF1): diagnosis and management. *Handb Clin Neurol*. 115:939-55.
53. Ferner RE. (2010) The neurofibromatoses. *Pract Neurol* 10(2):82-93.
54. Feucht M, Griffiths B, Niemüller I, Haase W, Richard G, Mautner VF. (2008) Neurofibromatosis 2 leads to higher incidence of strabismic and neuro-ophthalmological disorders. *Acta Ophthalmol* 86:882-6.
55. Fryer AE, Chalmers A, Connor JM et al. (1987) Evidence that the gene for tuberous sclerosis is on chromosome 9. *Lancet*. 1(8534):659-61.
56. Fv Recklinghausen. (1882) Über die multiplen Fibrome der Haut und ihre Beziehung zu den multiplen Neuromen. Recklinghausen, Friedrich von, 1833-1910.
57. Gammel JA. (1931) Localized neurofibromatosis. *Arch Dermatol Syph*. 24:712-5.
58. Garcia-Linares C, Fernández-Rodríguez J, Terribas E, Mercadé J, Pros E, Benito L, Benavente Y, Capellà G, Ravella A, Blanco I, Kehrer-Sawatzki H, Lázaro C, Serra E. (2011) Dissecting loss of heterozygosity (LOH) in neurofibromatosis type 1 associated neurofibromas: Importance of copy neutral LOH. *Hum Mutat*. 32(1):78-90.
59. García-Romero MT, Parkin P and Lara-Corrales I. (2016) Mosaic Neurofibromatosis Type 1: A Systematic Review. *Pediatr Dermatol*. 33(1): 9-17.
60. Giacoia GP. (1992) Fetal rhabdomyoma: a prenatal echocardiographic marker of tuberous sclerosis. *Am J Perinatol*. 9:111-114.
61. Giannini C, Scheithauer BW, Hellbusch LC, Rasmussen AG, Fox MW, McCormick SR, Davis DH. (1998) Peripheral nerve hemangioblastoma. *Mod Pathol*. 11(10):999-1004.
62. Goodman M, Lamm SH, Engel A, Shepherd CW, Houser OW, Gomez MR. (1997) Cortical tuber count: a biomarker indicating neurologic severity of tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol*. 12: 85-90.

63. Gordeuk VR, Sergueeva AI, Miasnikova GY, Okhotin D, Voloshin Y, Choyke PL, Butman JA, Jedlickova K, Prchal JT, Polyakova LA. (2004) Congenital disorder of oxygen sensing: association of the homozygous Chuvash polycythemia VHL mutation with thrombosis and vascular abnormalities but not tumors. *Blood*. 103(10):3924-32.
64. Gorlin R, Cohen MM Jr and Levine M. (1992) The neurofibromatoses (NfI Recklinghausen type, NfII acoustic type, other types). In: Gorlin R, Cohen MM Jr, Levine M (ed) *Syndromes of the head and neck*, Oxford: Oxford University Press, pp 392–399.
65. Goutagny S and Kalamarides M. (2010) Meningiomas and neurofibromatosis. *J Neurooncol*. 99:341–7.
66. Gutmann DH, Collins FS. (1993) The neurofibromatosis type 1 gene and its protein product, neurofibromin. *Neuron*. 10(3):335-43.
67. Haase VH. (2006) The VHL/HIF oxygen-sensing pathway and its relevance to kidney disease. *Kidney Int*. 69(8):1302-7.
68. Henske EP, Scheithauer BW, Short MP, Wollmann R, Nahmias J, Hornigold N, Slegtenhorst M, et al. (1996) Allelic loss is frequent in tuberous sclerosis kidney lesions but rare in brain lesions. *Am J Hum Genet*. 59, pp. 400-406.
69. Hexter A, Jones A, Joe H et al. (2015) Clinical and molecular predictors of mortality in neurofibromatosis 2: AUK national analysis of 1192 patients. *J Med Genet* 52:699-705.
70. Hirbe AC and Gutmann DH. (2014) Neurofibromatosis type 1: a multidisciplinary approach to care. *Lancet Neurol*. 13(8):834-43.
71. Hodges AK, Li S, Maynard J, Parry L, Braverman R, Cheadle JP et al. (2001) Pathological mutations in TSC1 and TSC2 disrupt the interaction between hamartin and tuberlin. *Hum Mol Genet*. 10:2899-905.
72. Hsieh HY, Fung HC, Wang CJ, Chin SC, Wu T. (2011) Epileptic seizures in neurofibromatosis type 1 are related to intracranial tumors but not to neurofibromatosis bright objects. *Seizure* 20:606–11.
73. Huang J and Manning BD. (2008) The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J*. 412(2):179-90.
74. Hug N, Longman D and Cáceres JF. (2016) Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. *Nucleic Acids Res*. 44:1483-95.
75. Huson SM. (2008) The Neurofibromatoses: Classification, Clinical Features and Genetic Counselling. *Monographs in Human Genetics in Kaufmann D (ed): Neurofibromatoses. Monogr Hum Genet. Basel, Karger, vol 16, pp 1–20.*
76. Ilyas AM, Nourissat G and Jupiter JB. (2007) Segmental neurofibromatosis of the hand and upper extremity: a case report. *J Hand Surg Am*. 32(10):1538-42.
77. Jansen FE, Braams O, Vincken KL et al. (2008) Overlapping neurologic and cognitive phenotypes in patients with TSC1 or TSC2 mutations. *Neurology*. 70: 908–915.
78. Jansen FE, Vincken KL, Algra A et al. (2008) Cognitive impairment in tuberous sclerosis complex is a multifactorial condition. *Neurology*. 70: 916–923.
79. Jett K, Friedman JM. (2010) Clinical and genetic aspects of neurofibromatosis 1. *Genet Med*. 12: 1-11.
80. Jimenez C, Cabanillas ME, Santarpia L, Jonasch E, Kyle KL, Lano EA, Matin SF, Nunez RF, Perrier ND, Phan A, Rich TA, Shah B, Williams MD, Waguespack. (2009) Use of the tyrosine kinase inhibitor sunitinib in a patient with von Hippel-Lindau disease: targeting angiogenic factors in pheochromocytoma and other von Hippel-Lindau disease-related tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 94(2):386-91.
81. Jin F, Wienecke R, Xiao GH, Maize Jr JC, DeClue JE and Yeung RS. (1996) Suppression of tumourigenicity by the wild-type tuberous sclerosis 2 (Tsc2) gene and its C-terminal region. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:9154-9159.
82. Jones AC, Shyamsundar MM, Thomas MW, Maynard J, Idziaszczyk S, Tomkins S, Sampson JR, Cheadle JP. (1999) Comprehensive mutation analysis of TSC1 and TSC2 and phenotypic correlations in 150 families with tuberous sclerosis. *Am J Hum Genet*. 64(5):1305-15.
83. Jozwiak S, Schwartz Ra, Janniger Ck, Bielicka-Cymerman J. (2000) Usefulness of Diagnostic Criteria Of Tuberous Sclerosis Complex In Pediatric Patients. *J Child Neurol*. 15(10):652-9.

84. Jülich K, Sahin M. (2014) Mechanism-based treatment in tuberous sclerosis complex. *Pediatr Neurol.* 50(4):290-6.
85. Kaelin WG. (2007) Von Hippel-Lindau disease. *Annu Rev Pathol.* 2:145-73.
86. Karajannis MA, Legault G, Hagiwara M et al. (2014) Phase II study of everolimus in children and adults with neurofibromatosis type 2 and progressive vestibular schwannomas. *Neuro Oncol.* 16:292-297.
87. Karajannis MA, Legault G, Hagiwara M et al. (2012) Phase II trial of lapatinib in adult and pediatric patients with neurofibromatosis type 2 and progressive vestibular schwannomas. *Neuro Oncol.* 14:1163-1170.
88. Kim HA, Ratner N, Roberts TM and Stiles CD. (2001) Schwann cell proliferative responses to cAMP and Nf1 are mediated by cyclin D1. *J Neurosci.* 21(4):1110-6.
89. Kim HJ, Butman JA, Brewer C, Zalewski C, Vortmeyer AO, Glenn G, Oldfield EH, Lonser RR. (2005) Tumors of the endolymphatic sac in patients with von Hippel-Lindau disease: implications for their natural history, diagnosis, and treatment. *J Neurosurg.* 102(3):503-12.
90. Korf BR. (2005) The phakomatoses. *Clin Dermatol.* 23(1):78-84.
91. Kozłowski P, Roberts P, Dabora S et al. (2007) Identification of 54 large deletions/duplications in TSC1 and TSC2 using MLPA, and genotype-phenotype correlations. *Hum Genet.* 121:389-400.
92. Kros J, de Greve K, van Tilborg A, Hop W, Pieterman H, Avezaat C, Lekanne Dit Deprez R, Zwarthoff E. (2001) NF2 status of meningiomas is associated with tumour localization and histology. *J Pathol.* 194:367-72.
93. Krueger DA, Care MM, Holland K, Agricola K, Tudor C, Mangeshkar P, Wilson KA, Byars A, Sahmoud T, Franz DN. (2010) Everolimus for subependymal giant-cell astrocytomas in tuberous sclerosis. *N Engl J Med.* 363:1801-11.
94. Kruijzinga RC, Sluiter WJ, de Vries EG, Zonnenberg BA, Lips CJ, van der Horst-Schrivers AN, Walenkamp AM, Links TP. (2013) Calculating optimal surveillance for detection of von Hippel-Lindau-related manifestations. *Endocr Relat Cancer.* 21(1):63-71.
95. Kweh F, Zheng M, Kurenova E, Wallace M, Golubovskaya V, Cance WG. (2009) Neurofibromin physically interacts with the N-terminal domain of focal adhesion kinase. *Mol Carcinog.* 48(11):1005-17.
96. Kwiatkowski D and Short P. (1994) Tuberous Sclerosis. *Arch Dermatol.* 130:348-354.
97. Kwiatkowski DJ, Whittamore VH and Thiele EA. (2010) Tuberous Sclerosis Complex: Genes, Clinical Features, and Therapeutics. Wiley-Blackwell. pp 29-31.
98. Kwon T, Jeong IG, Pak S, You D, Song C, Hong JH, Ahn H, Kim CS. (2014) Renal tumor size is an independent prognostic factor for overall survival in von Hippel-Lindau disease. *J Cancer Res Clin Oncol.* 140(7):1171-7.
99. Laczmańska I, Szczepaniak M, Jakubiak A, Stembalska A. 2014. Exonic deletions in the NF1 gene in patients with neurofibromatosis type 1 from the lower Silesian region of Poland. *Adv Clin Exp Med.* 23(4):517-21.
100. Lamb RF, Roy C, Diefenbach TJ, Vinters HV, Johnson MW, Jay DG et al. (2000) The TSC1 tumour suppressor hamartin regulates cell adhesion through ERM proteins and the GTPase Rho. *Nat Cell Biol.* 2:281-287.
101. Langkau N, Martin N, Brandt R, Zugge K, Quast S, Wiegele G, Jauch A, Rehm M, Kuhl A, Mack-Vetter M, Zimmerhackl LB, Janssen B. (2002) TSC1 and TSC2 mutations in tuberous sclerosis, the associated phenotypes and a model to explain observed TSC1/TSC2 frequency ratios. *Eur J Pediatr.* 161(7):393-402.
102. Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, et al. (1993) Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science.* 260:1317-1320.
103. Le LQ and Parada LF. (2007) Tumor microenvironment and neurofibromatosis type I: connecting the GAPs. *Oncogene.* 26(32):4609-16.
104. Li W, Cooper J, Karajannis MA, Giancotti FG. (2012) Merlin: a tumour suppressor with functions at the cell cortex and in the nucleus. *EMBO Rep.* 13(3):204-15.
105. Lim S and deSouza P. (2013) Imatinibin neurofibromatosis type2. *BMJ Case Rep.* doi: 10.1136/bcr-2013-010274.

106. Lin N, Baird L, Koss M, Kopecky KE, Gone E, Ullrich NJ, Scott RM, Smith ER. (2011) Discovery of asymptomatic moyamoya arteriopathy in pediatric syndromic populations: radiographic and clinical progression. *Neurosurg Focus*. 31(6):E6.
107. Lindau A. (1926) Studien über Kleinhirncysten. Bau, Pathogenese und Beziehungen zur Angiomatosis retinae. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1:1–128.
108. Lonser RR, Butman JA, Huntoon K, Asthagiri AR, Wu T, Bakhtian KD, Chew EY, Zhuang Z, Linehan WM, Oldfield EH. (2014) Prospective natural history study of central nervous system hemangioblastomas in von Hippel-Lindau disease. *J Neurosurg*. 120(5):1055-62.
109. Lopes Ferraz Filho JR, Munis MP, Soares Souza A, Sanches RA, Goloni-Bertollo EM, Pavarino-Bertelli EC. (2008) Unidentified bright objects on brain MRI in children as a diagnostic criterion for neurofibromatosis type 1. *Pediatr Radiol*. 38:305-310.
110. Lott IT, Richardson EP Jr. (1981) Neuropathological findings and the biology of neurofibromatosis. *Adv Neurol*. 29:23-32.
111. Luo G, Kim J, Song K. (2014) The C-terminal domains of human neurofibromin and its budding yeast homologs Ira1 and Ira2 regulate the metaphase to anaphase transition. *Cell Cycle*. 13(17):2780-9.
112. Luo R, Cai Q, Mu D. (2015) A Chinese tuberous sclerosis complex family and a novel tuberous sclerosis complex-2 mutation. *Chin Med J (Engl)*. 128(1):128-30.
113. Maher ER, Iselius L, Yates JR, Littler M, Benjamin C, Harris R, Sampson J, Williams A, Ferguson-Smith MA, Morton N. (1991) Von Hippel-Lindau disease: a genetic study. *J Med Genet*. 28(7):443-7.
114. Maher ER, Neumann HP, Richard S. (2011) von Hippel-Lindau disease: a clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet*. 19:617–23.
115. Maher ER, Yates JR, Harries R, Benjamin C, Harris R, Moore AT, Ferguson-Smith MA. (1990) Clinical features and natural history of von Hippel-Lindau disease. *Q J Med*. 77(283):1151-63.
116. Masoud GN and Li W. (2015) HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 5(5):378-389.
117. Miller RM and Sparkes RS. (1977) Segmental neurofibromatosis. *Arch Dermatol*. 123:837-8.
118. Mole DR, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. (2001) Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor: implications for cellular oxygen sensing. *IUBMB Life*. 52(1-2):43-7.
119. Morrison H, Sherman LS, Legg J, Banine F, Isacke C, Haipek CA, Gutmann DH, Herrlich P. (2001) The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes Dev*. 15(8):968-80.
120. Neau JP, Godeneche G, Mathis S, Guillet G. (2014) "Neurodermatology". *Handbook of clinical neurology* 121:1561–94.
121. Nellist M, Brouwer RW, Kockx CE, et al. (2015) Targeted Next Generation Sequencing reveals previously unidentified TSC1 and TSC2 mutations. *BMC Med Genet*. doi: 10.1186/s12881-015-0155-4.
122. Nellist M, Sancak O, Goedbloed MA, Rohe C, van Netten D, Mayer K et al. (2005b) Distinct effects of single amino-acid changes to tuberin on the function of the tuberin-hamartin complex. *Eur J Hum Genet*. 13:59-68.
123. Nellist M, Verhaaf B, Goedbloed MA, Reuser AJ, van den Ouweland AM and Halley DJ. (2001) TSC2 missense mutations inhibit tuberin phosphorylation and prevent formation of the tuberin-hamartin complex. *Hum Mol Genet*. 10:2889-2898.
124. NIH Consensus Development Conference. (1988) Neurofibromatosis. Conference statement. *Arch Neurol*. 45(5):575-8.
125. Nordstrom-O'Brien M, van der Luijt RB, van Rooijen E, van den Ouweland AM, Majoor-Krakauer DF, Lolkema MP, van Brussel A, Voest EE, Giles RH. (2010) Genetic analysis of von Hippel-Lindau disease. *Hum Mutat*. 31(5):521-37.
126. Northrup H and Krueger DA. (2013) International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Group. Tuberous sclerosis complex diagnostic criteria update: recommendations of the 2012 International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference. *Pediatr Neurol*. 49:243–54.
127. Ong KR, Woodward ER, Killick P, Lim C, Macdonald F, Maher ER. (2007) Genotype-phenotype correlations in von Hippel-Lindau disease. *Hum Mutat*. 28(2):143-9.

128. Pastore Y, Jedlickova K, Guan Y, Liu E, Fahner J, Hasle H, Prchal JF, Prchal JT. (2003) Mutations of von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene and congenital polycythemia. *Am J Hum Genet.* 73(2):412-9.
129. Patel NB and Stacy GS. (2012) Musculoskeletal manifestations of neurofibromatosis type 1. *AJR Am J Roentgenol.* 199:W99-106.
130. Payne JM, Pickering T, Porter M, Oates EC, Walia N, Prelog K, North KN. (2014) Longitudinal assessment of cognition and T2-hyperintensities in NF1: an 18-year study. *Am J Med Genet A.* 164A:661–5.
131. Perry A, Giannini C, Raghavan R, Scheithauer BW, Banerjee R, Margraf L, Bowers DC, Lytle RA, Newsham IF, Gutmann DH. (2001) Aggressive phenotypic and genotypic features in pediatric and NF2-associated meningiomas: a clinicopathologic study of 53 cases. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60:994–1003.
132. Plank TL, Yeung RS and Henske EP. (1998) Hamartin, the product of the tuberous sclerosis 1 (TSC1) gene, interacts with tuberin and appears to be localized to cytoplasmic vesicles. *Cancer Res.* 58:4766-70.
133. Plotkin SR, Stemmer-Rachamimov AO, Barker FG 2nd et al. (2009) Hearing improvement after bevacizumab in patients with neurofibromatosis type 2. *N Engl J Med.* 361(4):358-67.
134. Povey S, Burley MW, Attwood J, Benham F, Hunt D, Jeremiah SJ et al. (1994) Two loci for tuberous sclerosis: one on 9q34 and one on 16p13. *Ann Hum Genet.* 58:107-127.
135. Qin J, Wang Z, Hoogeveen-Westerveld M, Shen G, Gong W, Nellist M et al. (2016) Structural Basis of the Interaction between Tuberous Sclerosis Complex 1 (TSC1) and Tre2-Bub2-Cdc16 Domain Family Member 7 (TBC1D7). *J Biol Chem.* 291:8591-601.
136. Ratner N, Lloyd, Shyra J and Miller A. (2015) RASopathy gene commonly mutated in cancer: the neurofibromatosis type 1 tumour suppressor. *Nature Reviews Cancer.* 15:290–301.
137. Riccardi VM. (1982) Neurofibromatosis: clinical heterogeneity. *Curr Probl Cancer.* 7(2):1-34.
138. Ridler K, Bullmore ET, De Vries PJ et al. (2001) Widespread anatomical abnormalities of grey and white matter structure in tuberous sclerosis. *Psychol Med.* 31:1437–1446.
139. Roach Es and Sparagana Sp. (2004) Diagnosis Of Tuberous Sclerosis Complex. *J Child Neurol.* 19:643-649.
140. Roach Es, Gomez Mr, Northrup H. (1998) Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference: Revised Clinical Diagnostic Criteria. *J Child Neurol.* 13(12):624-8.
141. Rosser T and Packer RJ. (2002) Intracranial neoplasms in children with neurofibromatosis 1. *J Child Neurol.* 17:630-7; discussion 646-51.
142. Roth RR, Martinez R and James WD. (1987) Segmental neurofibromatosis. *Arch Dermatol.* 123:917-20.
143. Rott HD, Ballhausen W, Mayer K. (1999) Klinik und Genetik der tuberösen Sklerose. *Pädiat Prax.* 56:233-244.
144. Rouleau GA, Merel P, Lutchman M, et al. (1993) Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neurofibromatosis type 2. *Nature* 363:515-21.
145. Ruggieri M and Praticò AD. (2015) Mosaic Neurocutaneous Disorders and Their Causes. *Semin Pediatr Neurol.* 22(4):207-33.
146. Ruggieri M, Iannetti P, Polizzi A, La Mantia I, Spalice A, Giliberto O, Platania N, Gabriele AL, Albanese V, Pavone L. (2005) Earliest clinical manifestations and natural history of neurofibromatosis type 2 (NF2) in childhood: a study of 24 patients. *Neuropediatrics.* 36(1):21-34.
147. Ruggieri M, Praticò AD, Evans DG. (2015) Diagnosis, Management, and New Therapeutic Options in Childhood Neurofibromatosis Type 2 and Related Forms. *Semin Pediatr Neurol.* 22(4):240-58.
148. Ruggieri M. (1999) The different forms of neurofibromatosis. *Childs Nerv Syst.* 15(6-7): 295-308.
149. Ruiz-Llorente S, Bravo J, Cebrián A, Cascón A, Pollan M, Tellería D, Letón R, Urioste M, Rodríguez-López R, de Campos JM, Muñoz MJ, Lacambra C, Benítez J, Robledo M. (2004) Genetic characterization and structural analysis of VHL Spanish families to define genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat.* 23(2):160-9.

150. Sabbagh A, Pasmant E, Imbard A, Luscan A, Soares M, Blanché H, Laurendeau I, Ferkal S, Vidaud M, Pinson S, Bellanné-Chantelot C, Vidaud D, Parfait B, Wolkenstein P. (2013) NF1 molecular characterization and neurofibromatosis type I genotype-phenotype correlation: the French experience. *Hum Mutat.* 34(11):1510-8.
151. Sabol Z, Resić B, Gjergja Juraski R, Sabol F, Kovac Sizgorić M, Orsolčić K, Ozretić D, Sepić-Grahovac D. (2011) Clinical sensitivity and specificity of multiple T2-hyperintensities on brain magnetic resonance imaging in diagnosis of neurofibromatosis type 1 in children: diagnostic accuracy study. *Croat Med J.* 52:488–96.
152. Sancak O, Nellist M, Goedbloed M, Elfferich P, Wouters C, Maat-Kievit A, Zonnenberg B, Verhoef S, Halley D, van den Ouweland A. (2005) Mutational analysis of the TSC1 and TSC2 genes in a diagnostic setting: genotype-phenotype correlations and comparison of diagnostic DNA techniques in Tuberous Sclerosis Complex. *Eur J Hum Genet.* 13(6):731-41.
153. Santiago Lima AJ, Hoogeveen-Westerveld M, Nakashima A, Maat-Kievit A, van den Ouweland A, Halley D et al. (2014) Identification of regions critical for the integrity of the TSC1-TSC2-TBC1D7 complex. *PLoS One* 9. doi: 10.1371/journal.pone.0093940.
154. Schwartz Ra, Fernandez G, Kotulska K, Jozwiak S. (2007) Tuberous Sclerosis Complex: Advances In Diagnosis, Genetics, And Management. *J Am Acad Dermatol.* 57(2):189-202.
155. Selvanathan SK, Shenton A, Ferner R et al. (2010) Further genotype-phenotype correlations in neurofibromatosis type 2. *Clin Genet.* 77:163-170.
156. Shamji M F and Benoit BG. (2007) Syndromic and sporadic pediatric optic pathway gliomas: review of clinical and histopathological differences and treatment implications. *Neurosurg Focus.* 23(5):E3.
157. Sheela S, Riccardi VM, Ratner N. (1990) Angiogenic and invasive properties of neurofibroma Schwann cells. *J Cell Biol.* 111:645-653.
158. Shuin T, Yamasaki I, Tamura K, Okuda H, Furihata M, Ashida S. (2006) Von Hippel-Lindau disease: molecular pathological basis, clinical criteria, genetic testing, clinical features of tumors and treatment. *Jpn J Clin Oncol.* 36:337–343.
159. Slattery WH. (2015) Neurofibromatosis type 2. *Otolaryngol Clin North Am.* 48(3):443-60.
160. Slegtenhorst M, de Hoogt R, Hermans C, Nellist M, et al. (1997) Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science.* 277(5327):805-8.
161. Smith MJ, Higgs JE, Bowers NL et al. (2011) Cranial meningiomas in 411 neurofibromatosis type 2 (NF2) patients with proven gene mutations: Clear positional effect of mutations, but absence of female severity effect on age at onset. *J Med Genet.* 48:261-265.
162. Soucek T, Pusch O, Wienecke R, DeClue JE, Hentschschläger M. (1997) Role of the tuberous sclerosis gene-2 product in cell cycle control. *J Biol Chem.* 272(46):29301-29308.
163. Staley BA, Vail EA, Thiele EA. (2011) Tuberous sclerosis complex: diagnostic challenges, presenting symptoms, and commonly missed signs. *Pediatrics.* 127: e117-25.
164. Svaasand EK, Engebretsen LF, Ludvigsen T, Brechan W and Sjursen W. (2015) A Novel Deep Intronic Mutation Introducing a Cryptic Exon Causing Neurofibromatosis Type 1 in a Family with Highly Variable Phenotypes: A Case Study. *Hereditary Genet.* Doi: 10.4172/2161-1041.1000152.
165. Tchevkina E and Komelkov A. (2012) Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. Protein Phosphorylation in Human Health. Chapter 1. Protein Phosphorylation as a Key Mechanism of mTORC1/2 Signaling Pathways. Book edited by Cai Huang DOI: 10.5772/48274.
166. Tee AR, Sampson JR, Pal DK and Bateman JM. (2016) The role of mTOR signalling in neurogenesis, insights from tuberous sclerosis complex. *Semin Cell Dev Biol.* 52:12-20.
167. Troffater JA, MacCollin MM, Rutter JL, et al. (1993) A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis. *Cell.* 75(4):826.
168. Trovó-Marqui AB and Tajara EH. (2006) Neurofibromin: a general outlook. *Clin Genet.* 70(1):1-13.
169. Ullrich NJ, Raja A I, Irons MB, Kieran MW, Goumnerova L. (2007) Brainstem lesions in neurofibromatosis type 1. *Neurosurgery.* 61(4):762-6.
170. Valero MC, Martín Y, Hernández-Imaz E, Marina Hernández A, Meleán G, Valero AM, Javier Rodríguez-Álvarez F, Tellería D, Hernández-Chico C. (2011) A highly sensitive genetic protocol to detect NF1 mutations. *J Mol Diagn.* 13(2):113-22.

171. Van der Hoeve J. (1932) Eye Symptoms in phakomatoses. *Trans Ophthalmol Soc UK*. 52:380-401.
172. Vogelstein B and Kinzler KW. (1993) The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics*. 9(4):138-141.
173. Vogt H. (1908) Zur Diagnostik Der Tuberosen Sklerose. *Enforsch Behandl Jugendl Schwachsinn*. 2:1-12.
174. Von Hippel E. (1911) Die anatomische Grundlage der von mir beschriebenen 'sehr seltenen Erkrankung der Netzhaut'. *Graefes Arch Ophthalmol*. 79:350-377.
175. Walter J, Kuhn SA, Brodhun M, Reichart R, Kalff R. (2009) Pulmonary meningioma and neurinoma associated with multiple CNS tumours in a patient with neurofibromatosis type 2. *Clin Neurol Neurosurg*. 111(5):454-9.
176. Wataya-Kaneda M, Nakamura A, Tanaka M, Hayashi M, Matsumoto S, Yamamoto K, Katayama I. (2017) Efficacy and Safety of Topical Sirolimus Therapy for Facial Angiofibromas in the Tuberous Sclerosis Complex: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol*. 153(1):39-48.
177. Weinberg RA. (1996) How Cancer Arises. *Scientific American*. 62-70.
178. Wentink M, Nellist M, Hoogeveen-Westerveld M, Zonnenberg B, van der Kolk D, van Essen T, Park SM, Woods G, Cohn-Hokke P, Brussel W, Smeets E, Brooks A, Halley D, van den Ouweland A, Maat-Kievit A. (2012) Functional characterization of the TSC2 c.3598C>T (p.R1200W) missense mutation that co-segregates with tuberous sclerosis complex in mildly affected kindreds. *Clin Genet*. 81(5):453-61.
179. Wienecke R, König A, De Clue JE. (1995) Identification of tuberin, the tuberous sclerosis-2 product. *J Biol Chem*. 270(27):16409-16414.
180. Wienecke R, Maize JC Jr, Shoarinejad F, Vass WC, Reed J, Bonifacino JS, Resau JH, de Gunzburg J, Yeung RS, DeClue JE. (1996) Co-localization of the TSC2 product tuberin with its target Rap1 in the Golgi apparatus. *Oncogene*. 13:913-923.
181. Wilding A, Ingham SL, Laloo F, Clancy T, Huson SM, Moran A, Evans DG. (2012) Life expectancy in hereditary cancer predisposing diseases: an observational study. *J Med Genet*. 49(4):264-9.
182. Williams VC, Lucas J, Babcock MA, Gutmann DH, Korf B, Maria BL. (2009) Neurofibromatosis type 1 revisited. *Pediatrics*. 123(1):124-33.
183. Wimmer K, Yao S, Claes K, Kehrer-Sawatzki H, Tinschert S, De Raedt T, Legius E, Callens T, Beiglböck H, Maertens O, Messiaen L. (2006) Spectrum of single- and multiexon NF1 copy number changes in a cohort of 1,100 unselected NF1 patients. *Genes Chromosomes Cancer*. 45(3):265-76.
184. Yanoff M and Duker JS. (2009) *Ophthalmology*. Elsevier Health Sciences. pp. 937-.
185. Yohay KH. (2006) The genetic and molecular pathogenesis of NF1 and NF2. *Semin Pediatr Neurol*. 13(1):21-26.
186. Zatyka M, da Silva NF, Clifford SC, Morris MR, Wiesener MS, Eckardt KU, Houlston RS, Richards FM, Latif F, Maher ER. (2002b) Identification of cyclin D1 and other novel targets for the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene by expression array analysis and investigation of cyclin D1 genotype as a modifier in von Hippel-Lindau disease. *Cancer Res*. 62(13):3803-11.
187. Zatyka M, Morrissey C, Kuzmin I, Lerman MI, Latif F, Richards FM, Maher ER. (2002) Genetic and functional analysis of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor gene promoter. *J Med Genet*. 39(7):463-72.
188. Zhang J, Walsh MF, Wu G, Edmonson MN, et al. (2015) Germline Mutations in Predisposition Genes in Pediatric Cancer. *N Engl J Med*. 373(24):2336-2346.
189. Zhang M, Wang J, Jiang J, Zhan X, Ling Y, Lu Z, Guo J, Gao X. (2015) Von Hippel-Lindau disease type 2 in a Chinese family with a VHL p.W88X truncation. *Endocrine*. 48(1):83-8.

## 6.2. Българска литература

1. Божинова В., Денева Д., Томов В., Славкова Е., Миланов И. (2015) Туберозна склероза комплекс (TSC) – нови диагностични критерии и правила за проследяване и лечение. Честота и клинична характеристика при български пациенти с TSC. Педиатрия. брой 1/2015, стр. 26-30.
2. Еленкова А. (2010) Феохормоцитом: съвременни подходи и бъдещи тенденции. Наука Ендокринология 2/2010
3. Миланов И., Божинова В, Паскалев Е. (2016) Консенсус за диагностика, лечение и проследяване на пациенти с TSC – комплекс в България. Българско дружество по неврология, психиатрия и психология на детското развитие. 20-22 Октомври, 2016, София, България.
4. Тончева Д. (2014) Редки генетични болести – част втора. Генетични аспекти при наследствени солидните тумори в детска възраст.

## 6.3. Електронни източници

1. Coffalyser.Net. <https://coffalyser.wordpress.com/>
2. ENSEMBL. <http://www.ensembl.org/index.html>
3. Genetics home reference. <https://ghr.nlm.nih.gov/>
4. Human Genome Variation Society. <http://www.hgvs.org/mutnomen/>
5. Leiden Open Variation Database. <http://www.lovd.nl>
6. MRC-Holland. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MLPA. [www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)
7. National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
8. National Institute of Health. <https://www.nih.gov/>
9. PolyPhen-2: prediction of functional effects of human nsSNP2. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
10. PyMOL. <https://pymol.org/2/>
11. SWISS-MODEL. <https://swissmodel.expasy.org/>
12. The Human Gene Mutation Database. <http://www.hgmd.org/>
13. University of California Santa Cruz. BLAT. <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>
14. University of California Santa Cruz. In-Silico PCR. <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>
15. Wikipedia – the free encyclopedia. <https://en.wikipedia.org>

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

### 7.1. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Колева М, Божинова В, Славкова Е, Родопска Е, Илиева П, Богданова Д, Топалов Н, Миланов И, **Глушкова М**, Тодоров Т, Тодорова А, Митев В. (2017) Представяне на фамилен, клинично и генетично верифициран случай на неврофиброматоза тип 1 с установена нова мутация. Българска неврология, Том 18, брой 2:170-178.
2. **Glushkova M**, Yordanova I, Todorov T, Bojinova V, Koleva M, Dimova P, Tournev I, Angelova L, Todorova A, Mitev V. (2018a) Three novel NF1 gene mutations in a cohort of Bulgarian neurofibromatosis patients. Russian Journal of Genetics. 54(1):110-116. Импакт фактор: 0.550 (2016)
3. **Glushkova M**, Dimova P, Yordanova I, Todorov T, Tourtourikov I, Mitev V, Todorova A. (2018b) Molecular-genetic diagnostics of von Hippel-Lindau syndrome (VHL) in Bulgaria: first complex mutation event in the VHL gene. Int J Neurosci. 128(2):117-124. Импакт фактор: 1.750 (2016)
4. **Glushkova M**, Bojinova V, Koleva M, Dimova P, Bojidarova M, Litvinenko I, Todorov T, Iluca E, Calusaru C, Neagu E, Craiu D, Mitev V, Todorova A. (2018c) Molecular-genetic diagnostics of Tuberous sclerosis complex (TSC) in Bulgaria: six novel mutations in the TSC1 and TSC2 genes. Journal of Genetics [In press]. Импакт фактор: 0.995 (2016)

**ОБЩ ИМПАКТ ФАКТОР: 3.295**

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

1. **Glushkova M**, Bojinova V, Koleva M, Dimova P, Bojidarova M, Litvinenko I, Todorov T, Mitev V, Todorova A. (2017) Genetically verified tuberous sclerosis complex in a cohort of fifteen Bulgarian families. 12th Balkan Congress of Human Genetics, September 8-10, 2017, Plovdiv, Bulgaria. Session 8-II, Hall Plovdiv 1. Oral presentation
2. **Glushkova M**, Kadiyska T, Todorov T, Todorova A, Mitev V. (2017) STC2 gene variants in Bulgarian Tuberous sclerosis cases. ESHG Conference, 2017, E-P09.34. Copenhagen, Denmark, May 27-30, 2017. Electron poster
3. **Glushkova M**, Yordanova I, Todorov T, Todorova A, Mitev V. (2016) A novel frameshift mutation in Bulgarian patient with von Hippel-Lindau syndrome. ESHG Conference, 2016, E-P12.104. Barcelona, Spain, May 21 - 24, 2016. Electron poster
4. **Glushkova M**, Yordanova I, Todorov T, Todorova A, Mitev V. (2015) Novel and recurrent mutations in NF1 gene causing neurofibromatosis in Bulgarian patients. ESHG Conference, 2015, 23 (suppl. 1) J09.01. Glasgow, Scotland, United Kingdom, June 6 - 9, 2015. Published abstract
5. **Glushkova M**, Yordanova I, Todorov T, Todorova A, Mitev V. (2015) DNA diagnostics of von Hippel-Lindau disease in Bulgarian patients. 11th Balkan Congress of Human Genetics, September 17-20, 2015, Belgrade, Serbia, p.51. Poster presentation
6. **Проект №8337/06.12.2016; Договор № Д-131/2017г. от конкурс „Млад изследовател-2017“**; Тема: Молекулярно-генетичен анализ на TSC2 гена при български пациенти с Туберозна склероза, СМН, Медицински университет – София (водещ изследовател Мария Цанева Глушкова, докторант Катедра Медицинска Химия и Биохимия – МУ София)
7. **Проект № 251/13.01.2016; Договор № 1-Д/2016 г. от конкурс „Млад изследовател-2016“**; Тема: Молекулни характеристики на von Hippel-Lindau синдром при български пациенти, СМН, Медицински университет – София (водещ изследовател Мария Цанева Глушкова, докторант Катедра Медицинска Химия и Биохимия – МУ София)
8. **Проект № 4647/22.07.2015; Договор № 2-С/2015г. от конкурс “Стимулиране на научни изследвания в области с постигнати високи научни постижения“**; Тема: Генотип-фенотипни корелации при неврофиброматоза в България, СМН, Медицински университет – София (водещ изследовател доц. Албена Първанова Тодорова-Георгиева, дбн, Катедра Медицинска Химия и Биохимия – МУ София)

## 8. ПРИНОСИ

### **Методични приноси:**

С настоящия труд беше поставено началото на молекулно-генетичната диагностика на заболявания от групата на Факоматози в България – Неврофиброматоза тип 1 и тип 2, Комплекс туберозна склероза и синдром на von Hippel-Lindau.

### **Приложно-диагностични приноси:**

Беше постигнато генетично охарактеризиране на прицелните заболявания. Общо 50% от засегнатите семейства бяха генетично верифицирани, генетично консултирани и са подготвени за пренатална диагностика.

### **Научни приноси към световните бази данни:**

Беше открито първото по рода си, уникално комплексно мутационно събитие – дупликация и *indel* във *VHL* гена.

Бяха открити непубликувани мутации в гените *NF1*, *NF2*, *TSC2* и *TSC1*.