

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

\*\*\*\*\*

**МИХАЕЛА БОЙКОВА МЛАДЕНОВА**

**МОЛЕКУЛНИ ОСНОВИ НА РЕДКИ ЗАБОЛЯВАНИЯ С**  
**НАРУШЕНИЯ В СКЕЛЕТНАТА И СЪЕДИНИТЕЛНАТА ТЪКАН**

## **ДИСЕРТАЦИЯ**

**Област на висше образование:**

**4. Природни науки, математика и информатика**

**Професионално направление: 4.3. Биологически науки**

**Докторска програма: Молекулярна биология**

**НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:**

**Акад. Ваньо Иванов Митев, дм, дбн**

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

\*\*\*\*\*

**София, 2024**

---

<b>СЪДЪРЖАНИЕ</b>	стр.
<b>РЕЗЮМЕ</b>	1
<b>SUMMARY</b>	2
<b>ВЪВЕДЕНИЕ</b>	3
<b>ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР</b>	4
Молекулярно-генетични основи	8
Заболявания с нарушения в хрущялната тъкан	9
Ахондроплазия	10
Хипохондроплазия	16
Танатофорна дисплазия	17
Синдром на Muenke	19
<i>FGFR2</i> -свързани синдроми	20
Заболявания с нарушения в съединителната тъкан	23
Синдроми свързани с <i>COL1A1/A2</i>	24
Синдроми свързани с <i>COL11A1/COL2A1</i>	31
Бъдещи терапевтични стратегии	38
<b>ЦЕЛ И ЗАДАЧИ</b>	40
<b>МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ</b>	41
Клиничен материал	43
Биологичен материал	44
Преданалитична обработка на материала	44
Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв	45
Изолиране на високомолекулна днк от амниотична течност/хорионни въси	45
Директна спектрофотометрия	46

Аналитична обработка на материала	46
Намножаване на специфични фрагменти посредством	
Полимеразна верижна реакция (PCR)	47
Директно секвениране по Sanger с флуоресцентно белязани дидезокси нуклеотиди	48
Визуализация на намножените фрагменти на агарозен гел	49
Мултиплексна лигазно- зависима амплификация	50
Кариотипиране	52
Array- CGH анализ	54
Цялостно екзомно секвениране (WES)	55
QF PCR	55
<b>РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ</b>	59
Заболявания с нарушения в хрущялната тъкан	60
Ахондроплазия	61
Хипохондроплазия	66
Синдром на Muenke	70
<b>FGFR2-СВЪРЗАНИ СИНДРОМИ</b>	73
Пациенти със скелетна дисплазия и неизяснен молекулен дефект	77
Пренатална диагностика	83
Заболявания с нарушения в съединителната тъкан	90
Синдроми свързани с COL1A1/A2	91
Синдроми свързани с COL11A1/COL2A1	99
Заключение	101
<b>ИЗВОДИ</b>	106
<b>БИБЛИОГРАФИЯ</b>	109

**ПРИЛОЖЕНИЕ 1 -**

**ПРИЛОЖЕНИЕ 2 –**

## РЕЗЮМЕ

Скелетните дисплазии и заболяванията с нарушения в съединителната тъкан (колагенози) са две големи групи хетерогенни вродени състояния, които са социално-значими, тъй като са редки заболявания с тежко изявена клиника, която се отразява на цялостния психо-социален и обществено-икономически статус на индивида и неговото семейство.

**Скелетните дисплазии** са нарушения в хрущялната/скелетната тъкан, асоциирани с аномалии във формата и размера на скелета, диспропорция на дългите кости, гръбначния стълб и главата [Aravidis, Christos et al., 2014]. Известни са над 450 такива състояния и въпреки че всяко едно от тях е рядко, общо те се срещат с честота 1:5000 живородени деца [Barbosa et al., 2009]. Причините за скелетни дисплазии са толкова разнообразни, колкото е и броят на различните заболявания, но има и чести мутации в няколко специфични гена (напр. *FGFR3*, *FGFR2*).

**Заболяванията с нарушения на съединителната тъкан** се срещат с честота 1:20000 живородени деца и са свързани основно с нарушения на хрущялната тъкан, ставите, мускулите и растежа на костите, но могат да засягат и други органи и системи - включително очите, сърцето, белите дробове, бъбреците, стомашно-чревния тракт, кръвоносните съдове и др. [Uttarilli et al., 2019]. Понастоящем, повече от 200 гена са асоциирани със заболявания на съединителната тъкан и са разпределени в различни групи, според тежестта на клиничната изява [Nicol et al., 2019]. Обект на настоящия дисертационен труд бяха гените *COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1* и *COL11A1*, които се асоциират с тясна група наследствени заболявания - Osteogenesis imperfecta, Marshall syndrome и Stickler syndrome.

В хода на изпълнението на настоящата работа бяха въведени и оптимизирани методи за изследване на гени, свързани със скелетни дисплазии и с колагенози. Научната разработка беше фокусирана върху търсене на молекулни дефекти по дължината на гените *FGFR3*, *FGFR2*, *COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1*, *COL11A1*. Разработеният молекулярно-генетичен подход беше приложен за изследване на 75 пациенти - при 66 от случаите анализите са проведени постнатално, а при 9 е извършена дородова диагностика. На базата на предварително проведените клинични изследвания пациентите бяха разпределени в 3 групи: 1) пациенти, насочени с диагноза скелетна дисплазия, 2) пациенти с нарушения в съединителната тъкан и 3) бременности, насочени за пренатална диагностика.

В първата група от 41 **пациенти с диагноза скелетна дисплазия** бяха извършени изследвания за мутации във *FGFR3* и *FGFR2*. Бяха открити точкови мутации в тези гени при 24 от изследваните (63.42%), които се разпределят в следните подгрупи: 14 с предполагаема диагноза ахондроплазия (34.15%), 8 - с хипохондроплазия (19.51%) и 2-ма - с Apert синдром (4.88%). Като допълнение, при един пациент се касаеше за хромозомно преустройство с интерстициални трипликации в дългото рамо на 15-та хромозома, водещо до тетразомия, а при друг пациент беше открит генетичен вариант в *MNI* гена, водещ до поява на стоп кодон и до преждевременно термиране на белтъчния синтез.

В групата от 25 **пациенти, насочени с диагноза нарушения в съединителната тъкан** бяха открити патологични генетични варианти в гена *COL1A1* при 3-ма пациенти с диагноза Osteogenesis imperfecta тип I (12% от изследваните). При един пациент с диагноза синдром на Marshall-Stickler беше открит патологичен генетичен вариант в *COL11A1* гена (4% от изследваните). Като допълнение, при един пациент с предполагаема клинична диагноза Osteogenesis imperfecta се откри делеция на дългото рамо на X хромозомата с размер 870,743,253 кб, непубликувана в литературата.

---

Делцията включва гените *PLS3* (OMIM\*300131) и *SLC6A14* (OMIM\*300444), асоциирани със заболявания при човека.

При 31 от изследваните постнатално 66 пациента (47%) поставената клинична диагноза беше изяснена на молекулно ниво, като бяха открити както известни мутации, така и нови, непубликувани досега патогенни генетични варианти.

**Пренатална диагностика** беше проведена при 9 случая с УЗ данни за скелетни аномалии на плода или фамилна обремененост. При един от изследваните ембриони (12.5%), насочен по ултразвукови данни, беше открит молекулен дефект, водещ до Танатофорна дисплазия тип I.

Благодарение на въведената методика за диагностика на скелетните дисплазии и колагенози стана възможно провеждането на адекватна и навременна генетична консултация, профилактика и пренатална диагностика на засегнатите семейства.

## SUMMARY

The skeletal dysplasias and diseases with connective tissue disorders (collagenoses) are two large groups of heterogeneous congenital conditions that are socially significant, as they are rare diseases with severe clinical manifestations that affect the overall psycho-social and socio-economic status of the individual and his family.

Skeletal dysplasias are disorders of cartilage/skeletal tissue associated with abnormalities in the shape and size of the skeleton, disproportion of the long bones, spine and head [Aravidis, Christos et al.,2014]. There are over 450 known conditions, and although each one of them is rare, they collectively occur at a frequency of 1:5000 live births [Barbosa et al,2009]. The causes of skeletal dysplasias are as diverse as the number of different diseases, but there are known mutations in a few specific genes (eg, *FGFR3*, *FGFR2*).

Diseases with connective tissue disorders occur with a frequency of 1:20,000 live births and are mainly associated with disorders of cartilage tissue, joints, muscles and bones growth, but can also affect other organs and systems - including the eyes, heart, lungs, kidneys, gastrointestinal tract, blood vessels, etc [Uttarilli et al.,2019]. Currently, more than 200 genes are associated with connective tissue diseases and are divided into different groups, according to the severity of the clinical manifestation [Nicol et al.,2019]. The subject of this dissertation work were the genes *COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1* and *COL11A1*, which are associated with a narrow group of hereditary diseases - Osteogenesis imperfecta, Marshall syndrome and Stickler syndrome.

In the course of the implementation of the present work, optimized methods were also introduced for the research of genes, related to skeletal dysplasias and collagenoses. The scientific development was focused on searching for molecular defects along the length of the *FGFR3*, *FGFR2*, *COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1*, *COL11A1* genes. The developed molecular-genetic approach was applied for the study of 75 patients - in 66 of the cases, the analyses were performed postnatal, and in 9, prenatal diagnosis was performed. Based on the previously conducted clinical examinations, the patients were divided into 3 groups: 1) patients with a diagnosis of skeletal dysplasia, 2) patients with connective tissue disorders, and 3) pregnancies forwarded for prenatal diagnosis.

In the first group of 41 patients diagnosed with skeletal dysplasia, studies were performed for mutations in *FGFR3* and *FGFR2*. Point mutations in these genes were found in 24 of the patients (63.42%): in 14 with a suspected diagnosis of achondroplasia (34.15%), 8 with hypochondroplasia (19.51%), and in 2 with Apert syndrome (4.88%). In addition, one patient had a chromosomal rearrangement with interstitial triplications in the long arm of chromosome 15, leading to tetrasomy, and in another patient was found a genetic variant in the *MNI* gene, leading to a stop codon generation and to the premature termination of protein synthesis.

In the group of 25 patients with a diagnosis of connective tissue disorders, pathological genetic variants in the *COL1A1* gene were found in 3 patients with a diagnosis of Osteogenesis imperfecta type I (12% of the examined). In one patient diagnosed with Marshall-Stickler syndrome, a pathological genetic variant in the *COL11A1* gene was found (4% of the examined). In addition, in one patient with a suspected clinical diagnosis of Osteogenesis imperfecta a deletion of the long arm of the X chromosome, with the size of 870,743,253 kb, unpublished in the literature, was found. The deletion includes the *PLS3* (OMIM\*300131) and *SLC6A14* (OMIM\*300444) genes associated with human disease.

In 31 of the 66 patients examined postnatal (47%), the presumed clinical diagnosis was clarified at the molecular level, as there were detected both known mutations and new, previously unpublished pathogenic genetic variants.

The prenatal diagnosis was performed in 9 cases with ultrasound evidence for fetal skeletal anomalies or family burden. In one of the embryos studied (12.5%), forwarded for

---

analyses on the bases of an ultrasound data, a molecular defect leading to Thanatophoric dysplasia type I was found.

Thanks to the introduced methodology and systematic approach for the diagnosis of skeletal dysplasias and collagenoses, it became possible to conduct an adequate and timely genetic counseling prevention, and prenatal diagnosis of the affected families.

## ВЪВЕДЕНИЕ

**С**келетните дисплазии и заболяванията с нарушения в съединителната тъкан (колагенози) са две големи групи хетерогенни вродени състояния, които са социално-значими, тъй като са редки заболявания с тежко изявена клиника, която се отразява на цялостния психосоциален и обществено-икономически статус на индивида и неговото семейство.

**Скелетните дисплазии** са генетични заболявания, които се дължат на мутации в специфични гени. Това е хетерогенна група от заболявания, асоциирани с аномалии в скелета, по-точно с нарушения на хрущялната тъкан и растежа на костите, което води до патологична форма и размер на скелета и диспропорция на дългите кости, гръбначния стълб и главата. Въпреки че, всяко едно от заболяванията е рядко, общо те се срещат с честота 1:5000 живородени деца [Ogioli, 2017]. Заболяванията варират като тежест от преждевременни артропатии до тежък дуарфизъм и в някои случаи перинатална смърт. Като съпровождащи симптоми може да се наблюдават множество ортопедични, неврологични, слухови, зрителни, белодробни, сърдечни, бъбречни и физиологични усложнения.

**Заболяванията с нарушения на съединителната тъкан** представляват друга голяма група нарушения, включващи богатата на протеин тъкан, която поддържа различни органи и части на тялото. Заболяванията на съединителната тъкан са свързани с нарушения на костите и хрущялите причинени от генетични нарушения. Общо те се срещат с честота 1:20 000 живородени деца [Byers, 2012]. Понастоящем, повече от 200 гена са асоциирани със заболявания на съединителната тъкан и са разпределени в различни групи според ефекта, който проявяват. Обект на настоящия дисертационен труд са гените, които се асоциират с тясна група съединителнотъканни наследствени заболявания - Osteogenesis imperfecta, Marshall syndrome и Stickler syndrome.

- 1. Фамилната история** (включително спонтанни аборти или мъртвородени деца) при скелетните дисплазии е от особена важност за оценка на естеството и наследствения модел на заболяването. Родители, братя, сестри и други роднини, трябва да бъдат внимателно изследвани за леки прояви на болестта, поради променливата клинична пенетрантност и експресивност на заболяванията и поради факта, че чрез рутинно ултразвуково изследване, пренатално не винаги могат да бъдат диагностицирани.

## ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Скелетните дисплазии и заболяванията с нарушения в съединителната тъкан (колагенози) са две големи групи хетерогенни вродени състояния, които са социално-значим, тъй като са редки заболявания с тежко изявена клиника, която се отразява на цялостния психо-социален и обществено-икономически статус на индивида и неговото семейство.

**Скелетните дисплазии** са нарушения в хрущялната/скелетната тъкан, асоциирани с аномалии във формата и размера на скелета, диспропорция на дългите кости, гръбначния стълб и главата. Известни са над 450 известни състояния и въпреки че всяко едно от тях е рядко, общо те се срещат с честота 1:5000 живородени деца. Тези разстройства се проявяват в най-ранните етапи от ембрионалното развитие. С оглед на големия брой скелетни дисплазии е създадена система за класификация, в която генетични нарушения на костите са категоризирани в 40 основни групи на базата на молекулни, биохимични и/или рентгенографски критерии [Warman et al., 2010].

Понастоящем, повече от 220 гена са асоциирани със скелетните дисплазии и са разпределени в различни групи според ефекта, който проявяват. Обект на настоящия дисертационен труд са някои от гените, които се асоциират със скелетни дисплазии. Причините за скелетни дисплазии са толкова разнообразни, колкото е и броят на различните заболявания, но са известни мутации в няколко специфични гена (напр. *FGFR3*, *FGFR2*).

**Заболяванията с нарушения на съединителната тъкан (колагенози)** се срещат с честота 1:20000 живородени деца и са свързани основно с нарушения на съединителната тъкан, ставите, мускулите и растежа на костите, но могат да засягат и други органи и системи, включително очите, сърцето, белите дробове, бъбреците, стомашно-чревния тракт, кръвоносните съдове и др. [Vodolay et al., 2009]. Понастоящем, повече от 200 гена са асоциирани със заболявания на съединителната тъкан и са разпределени в различни групи, според тежестта на клиничната изява. Обект на настоящия дисертационен труд бяха гените *COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1* и *COL11A1*, които се асоциират с тясна група наследствени заболявания - Osteogenesis imperfecta, Marshall syndrome и Stickler syndrome.

Като цяло, причините за възникване на заболяванията свързани с нарушения в хрущялната и съединителната тъкан могат да бъдат разделени в три основни групи:

- Наследствени - унаследени автозомно доминантно, рецесивно или X-свързано;
- В резултат на спонтанни мутации;
- Тератогенен ефект - като например вторично излагане на токсични вещества или инфекциозни агенти, което води до нарушаване на нормалното развитие на скелета.

Почти половината от документираните случаи на скелетна дисплазия и колагенози са причинени от генетични мутации, които ако се познават, биха дали възможност за пренатална диагностика чрез генетични тестове.

Пренаталната диагностика включва комплекс от техники и методи за диагностика с цел изясняване здравословното състояние на фетуса преди раждането му.

Преди да се пристъпи към пренаталната диагностика (ПД) е необходимо да се обсъдят и разяснят някои фактори:

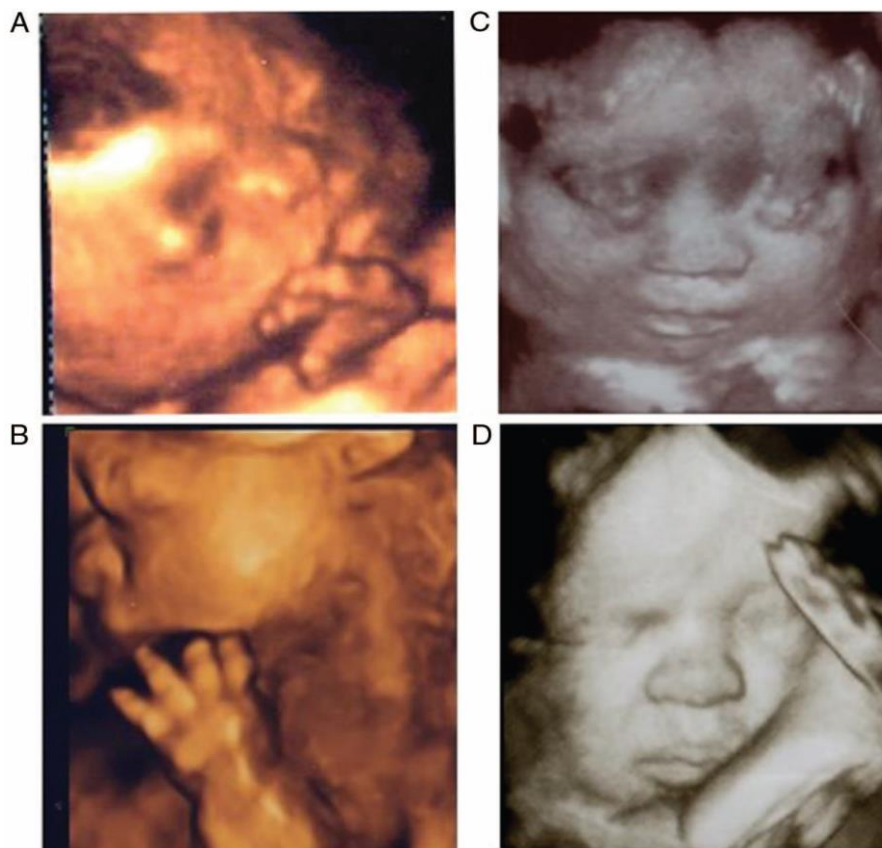
- ✓ Трябва да се прецени и изясни тежестта на заболяването, дали то е летално или води до мъртво раждане. В такива случаи ПД е повече от необходима.
- ✓ При заболявания с по-голяма продължителност на живота (напр. синдром на Даун), които изискват специални грижи, или болести, за които има ефективна терапия като фенилкетонурията, или деца с малформации, които оперативно могат да бъдат коригирани, като например наследствена несиндромна глухота, се извършва пренатална диагностика с цел ранно предприемане на нужните действия или терапия, без молекулната диагноза задължително да означава термиране на бременността. При липса на достатъчно надежден метод, пренаталната диагностика може да не е препоръчителна.

Необходимо е да се вземе предвид фамилната история на всеки конкретен случай, да се оценят спонтанните аборти и мъртвородени деца във фамилията и на тази база да се преценят рисковете за наследствения характер на дадено заболяване като например скелетни дисплазии и колагенозите. Това са моногенни заболявания, чието унаследяване

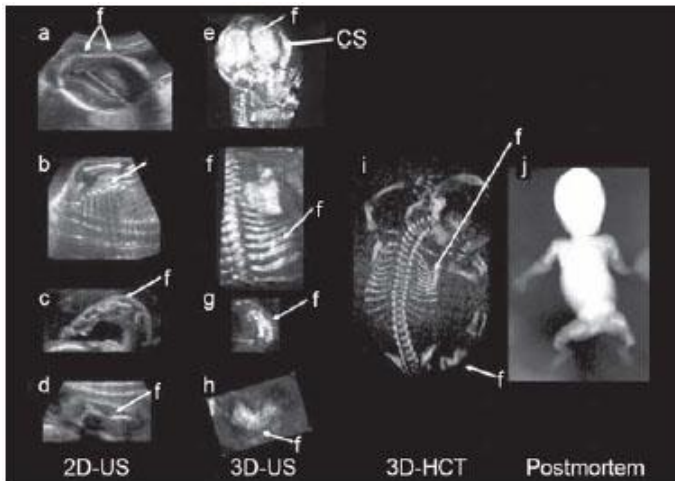
се подчинява на законите на Мендел. И тук при доказан генетичен дефект е възможна пренатална диагностика в семейството. Основание за пренатална диагностика има в случаите на:

- ✓ Фамилна обремененост
- ✓ Генетично верифицирана мутация, отговаряща за даденото заболяване
- ✓ Родители, братя, сестри и други родственици могат да бъдат внимателно изследвани за леки прояви на болестта, поради променливата клинична пенетрантност и експресивност на заболяванията.

Пренаталната диагностика може да включва и неинвазивни методи (ултразвуково изследване, което в някои случаи е с нисък капацитет на детекция; неинвазивен тест в кръв на майката за конкретни добре познати мутации) и инвазивни методи за извличане на ДНК материал от ембриона (хорион биопсия или амниоцентеза), последвани от генетичен анализ.



**Фигура 1.** 3D ултразвуково изследване на фетус. А-фетус с Танатофорна дисплазия; В-Танатофорна дисплазия, като е показана назалната кухина и брахидактилия на горния крайник; С-изменения в лицевите показатели; D-фетус с ахондроплазия.



**Фигура 2.** Пренатална диагностика на *Osteogenesis imperfecta* в 33-та гестационна седмица с 2D-US и 3D-US (ултразвуково изследване). (a) 2D-US: напречен разрез на глава на плода с фрактура на черепа (f), б) 2D-US: гръден кош на плода, показващ нерегулярни ребра (стрелка); (c) 2D-US: сагитален участък на дясната ръка, показващ къса и сгъната ръка (f); (d) 2D-US: сагитален разрез на фетална бедрена кост с фрактура (f); (e) 3D-US: 3D образ на костен режим, показващ страничен изглед на фетален череп с фрактура (f), която се различава от нормален коронарен шев (CS) ;(f) 3D-US: рендерен режим на кост, показващ задния изглед на гръдния кош на плода, с ребрени фрактури и неправилно ситуирани ребра (f); g) 3D-US: изображение на рендерен режим на кост, показващо къс радиус и наклон, и кубитус (f); (h) 3D-US: изображение на костен режим, показващо фрактурирана бедрена кост (f); (i) 3D-НСТ: поглед отзад на целия плод, потвърждаващ фрактури на ребра и бедрена кост (f), както и намалена минерализация на черепа. j) Радиологично изследване след смъртта: потвърждаване на скъсяване и фрактура на дълги кости. [Ruano et al., *Ultrasound Obstet Gynecol* 2004]

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ ОСНОВИ НА СКЕЛЕТНИТЕ ДИСПЛАЗИИ И КОЛАГЕНОЗИ:

Гените, асоциирани със скелетни дисплазии и заболяванията с нарушения на съединителната тъкан, които са обект на настоящия дисертационен труд са представени в Таблица 1

Гени, асоциирани със скелетни дисплазии	Гени, асоциирани със съединителнотъканни патологии
FGFR2	COL1A1
	COL1A2
FGFR3	COL2A1
	COL11A1

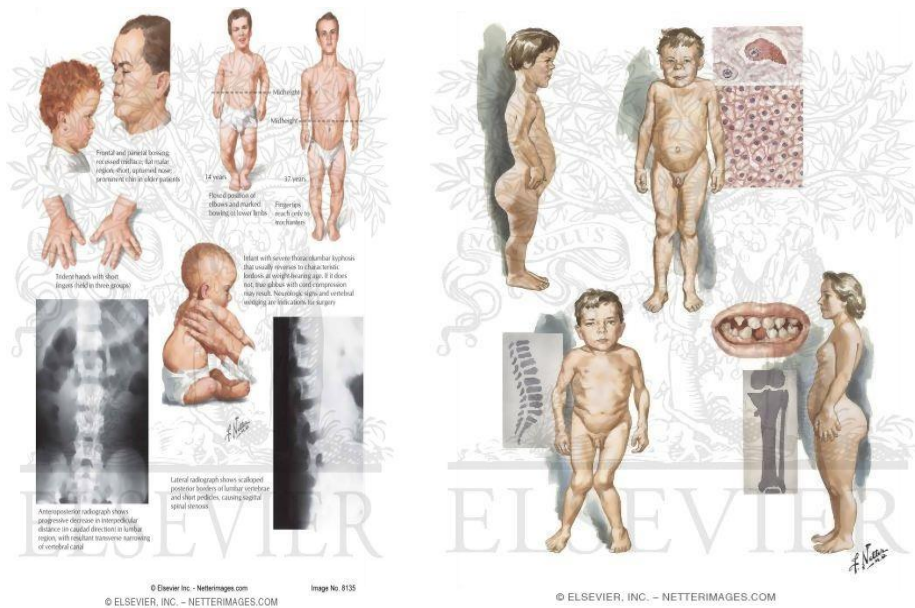
### 1.1. ЗАБОЛЯВАНИЯ С НАРУШЕНИЯ В ХРУЩЯЛНАТА ТЪКАН

### **1.1.2. FGFR3-СВЪРЗАНИ СИНДРОМИ (*FGFR3* - СКЕЛЕТНИ ДИСПАЗИИ):**

Фибробластните растежни фактори (FGFs) са част от голямото семейството на полипептидните растежни фактори, които участват в множество процеси в клетка, включително митогенеза и ангиогенеза. FGF рецепторите, какъвто е и FGFR3 включват в структурата си извънклетъчен домен с 2 или 3 имуноглобулин подобни домена, трансмембранен домен и цитоплазмен тирозин киназен домен.

### **1.1.3. АХОНДРОПАЗИЯ**

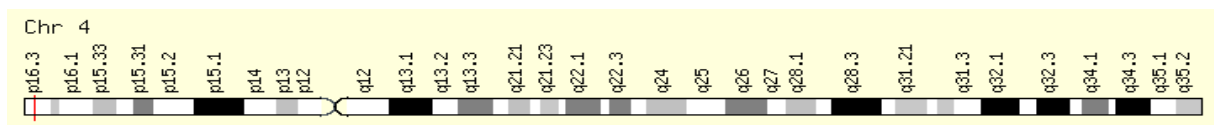
Това е най-честата нелетална скелетна диспазия (честота 1:20 000). Ахондропазия буквално означава "без формиране на хрущял." Хрущялът е тежка, но и гъвкава тъкан, която образува голяма част от скелета по време на ранното развитие. Въпреки това, при ахондропазията, проблемът не е във формирането на хрущяла, а в преминаването му към кост - процес наречен осификация, което е особено ясно изразено в дългите кости на ръцете и краката. Най-често болните се характеризират с непропорционално нисък ръст, къси крайници, голяма глава (Фигура 3). Повечето индивиди имат нормално интелектуално развитие и продължителност на живота. Средната височина при мъжете е 130 см, а при жените 125 см. Характерен е среден по размер гръден кош, къси крайници, включително пръстите, ограничени движения в лакътната става, макроцефалия, без прояви на интелектуален дефицит. Честите здравословни проблеми, свързани с ахондропазия включват епизоди, в които дишането се забавя или спира за кратки периоди (апнея), затлъстяване и рецидивиращи отити. В детството, хората с това състояние обикновено развиват по-силно изразена и постоянна извивка на долната част на гръбнака в посока напред (лордоза) и дъгообразни крака. Някои засегнати хора развиват необичайно изкривяване на предно-задната част на гръбначния стълб (кифоза) и болки в гърба. Потенциално сериозно усложнение на ахондропазията е спиналната стеноза, която представлява стесняване на гръбначния канал и може да прищипе гръбначния мозък в горната част. Спиналната стеноза е свързана с болка, изтръпване и слабост в крайниците, които причиняват затруднена походка. Друго рядко, но сериозно усложнение на ахондропазията е хидроцефалия, което довежда до увеличаване на размера на главата и съответно нарушения на мозъка.



**Фигура 3. Ахондроплазия**

Website: <http://www.netterimages.com/product/9781929007028/3-51.htm>

Заболяването е автозомно доминантно и се дължи на мутации в *FGFR3* гена, член на семейство рецептори за фибробластни растежни фактори. Генът е разположен на късото рамо на 4<sup>-та</sup> хромозома (4p13.3) (Фигура 4). Белтъчният продукт представлява мембранен тирозин-киназен рецептор, изграден от екстрацелуларен домен (съставен от 3 имуноглобулинови субдомена), трансмембранен домен и интрацелуларен тирозин-киназен домен [Laederich et al., 2010].



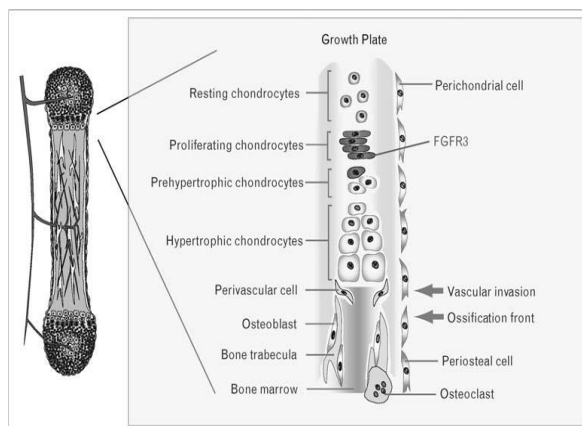
**Фигура 4. Локализация на гена *FGFR3* върху хромозома 4**

Website: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?org=human&maps=ideogr,morbid,pheno&zoom=100&chr=4>

Протеинът на *FGFR3* гена е част от семейството на четири рецептора за фибробластния растежен фактор, които имат подобна структура и функции. Тези протеини играят важна роля в няколко клетъчни процеса, включително регулиране на

клетъчния растеж и делене, пролиферацията, образуването на кръвоносни съдове, зарастване на рани, както и развитието на ембриона.

Продуктът на *FGFR3* гена – тирозин-киназен рецептор, е разположен на клетъчната мембрана, така че единият му домен остава вътре в клетката, а другият - от външната страна на мембраната на клетката. Това позициониране позволява на рецептора да взаимодейства със специфични растежни фактори извън клетката. Когато растежните фактори се свържат с рецептора на фибробластния растежен фактор 3, той се активира и предизвиква каскада от сигнални реакции вътре в клетката, които са отговорни за контрола на клетъчния растеж и развитие (Фигура 5).



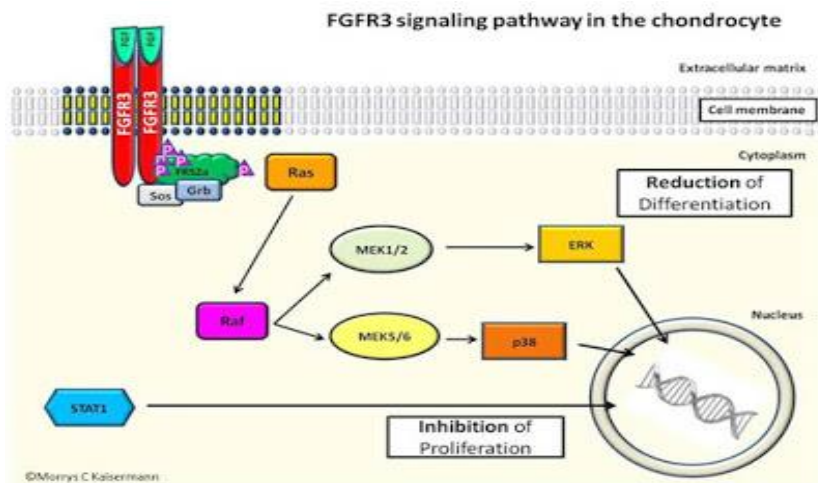
**Фигура 5.** *FGFR3* се експресира предимно в пролифериращите хондроцити, в които той строго регулира пролиферацията и прехода към крайна диференциация. Някои *FGFR3* се експресират в прехипертрофични хондроцити, в които мутантният *FGFR3* нарушава тяхната диференциация и води до преждевременно вкостяване на хрущялната тъкан.

[Laederich et al, 2010]

Чрез алтернативен сплайсинг се създават няколко тъканно специфични изоформи [Chellaiyah et al., 1994]. Те са локализирани в различни тъкани на тялото и взаимодействат с различни растежни фактори. Много от изоформите се намират в хондроцитите. Белтъчният продукт на гена *FGFR3* в костните клетки регулира растежа им чрез ограничаване образуването на кост от хрущяла (процес наречен осификация), особено в дългите кости.

Рецепторът *FGFR3* се активира от различни фибробластни растежни фактори [Ornitz et al., 2005]. При свързването с лиганда рецепторът димеризира, активира

тирозин-киназните си активни центрове и предава сигнала към вътрешността на клетката [Plotnikov et al., 1999]. Активирането на FGFR3 включва MAPK сигналната каскада и отговаря за негативната регулация на костния растеж [Dailey et al., 2003]. Негативната регулация на FGFR3 в хондроцитите се осъществява във фазата на растежа, като редуцира нивото на формиране на хрущялната тъкан, което е необходимо за нарастването на костта. Проучвания доказват, че сигнализацията на рецептора на фибробластния растежен фактор води до намалена пролиферация и диференциация на хондроцитните клетки в нарастващите кости (Фигура 5). Схема на FGFR3 сигналния път в хондроцити е показана на Фигура 6.



**Фигура 6.** Схема на *FGFR3* сигналния път

website: <http://tratando-acondroplasia.blogspot.com/2013/04/new-evidence-of-mechanism-of-action-of.html>

При свръхактивиране на сигналния път, хондроцитите не могат да пролиферират и диференцират нормално, и в резултат се образува по-малко количество костна тъкан, водещо до по-къси кости. На база на това може да се очаква, че мутациите във *FGFR3* гена са свързани с повишена активност на кодируания рецептор, при което краищата на нарастващите кости се вкостяват, не могат да нарастват и остават къси, симптоматика наблюдавана при скелетните дисплазии.

Две от откритите мутации в *FGFR3* гена се срещат с много висока честота (повече от 90%) при пациентите с ахондроплазия. И двете мутации засягат един и същ кодон, който кодира аминокиселината глицин в позиция 380 на белтъка (Таблица 2).

**Таблица 2.** Мутации в *FGFR3* гена свързани с Ахондроплазия.

Нуклеотидна замяна в ДНК	Замяна на протеиново ниво	Референтна секвенция
c.1138G>A	p.Gly380Arg	NM_000142.4
c.1138G>C	p.Gly380Arg	NP_000133.1

Мутацията p.Gly380Arg причинява свръхактивиране на FGFR3, което води до инхибиране на пролиферацията и диференциацията на хондроцитите [Horton et al., 2009].

Автозомно-доминантната мутация p.Gly380Arg е локализирана в трансмембрания домен на FGFR3 рецептора и се среща с честота 97% от случаите на Ахондроплазия [Shiang et al., 1994; Wilkin et al., 1998; Vajo et al., 2000]. При пациенти, при които не се открива мутацията p.Gly380Arg, се установяват други доста по-рядко срещани патологични варианти в *FGFR3* гена като p.Ser217Cys, Ser279Cys, p.Ser344Cys и p.Gly375Cys [Superti et al., 1995; Zhang et al., 2007; Xue et al., 2014; Takagi et al., 2015]. Тези рядко срещани мутации, водят до генерирането на цистеинов остатък в FGFR3, който активира конститутивно рецептора. Генетичните промени, водещи до Ахондроплазия, са със 100% пенетрантност. Редките хомозиготни случаи на заболяването са с летален изход [Stanescu et al., 1990; Tavormina et al., 1995]. Мутационният анализ на пациенти с Ахондроплазия показва, че почти всички мутации възникват върху бащиното копие на гена. Бащиният произход на мутациите в *FGFR3* гена корелира с напреднала възраст на бащата във всички разгледани случаи в световен мащаб [Wilkin et al., 1998]. Произходът на активиращите мутации в FGF рецепторите се дължи на положителната селекция и клоналното разрастване на сперматогониалните стволови клетки с възрастта [Goriely et al., 2012; Shinde et al., 2013]. Мутациите, причиняващи Ахондроплазия, водят до активиране на FGFR3 и неговите сигнални пътища, които могат да бъдат допълнително засилени в присъствието на FGF лиганди [Naski et al., 1996; Webster et al., 1996; Komla et al., 2016]. Повишената активност може да бъде резултат от нарушена интернализация и разграждане на рецептори [Monsonogo et al., 2000; Cho et al., 2004]. Биохимичният анализ показва, че мутациите повишават фосфорилирането на рецепторите в отсъствие на лиганд [Henry et al., 2012].

#### 1.1.4. ХИПОХОНДРОПАЗИЯ

Заболяването е сходно с ахондроплазията, но фенотипната изява е по-лека. Поставянето на диагнозата чрез рентгеногравски находки и характерни клинични прояви е трудно, поради това, че при деца под три годишна възраст тенденцията на скелетната диспропорция е лека. Диагнозата се поставя категорично чрез ДНК-тестове и около 70% от децата с предполагаема диагноза хипохондроплазия се оказват хетерозиготни носители на мутация във *FGFR3* гена. Медицинските усложнения като обструктивна апнеа, спинална стеноза и др. се срещат с по-ниска честота.

Заболяването е автозомно доминантно, като в този случай кодон 540 на *FGFR3* гена е засегнат преимуществено. Този кодон кодира аминокиселината аспарагин, която е локализирана в тирозин-киназия домен на рецептора (Таблица 3).

**Таблица 3.** Мутации в *FGFR3* гена свързани с Хипохондроплазия.

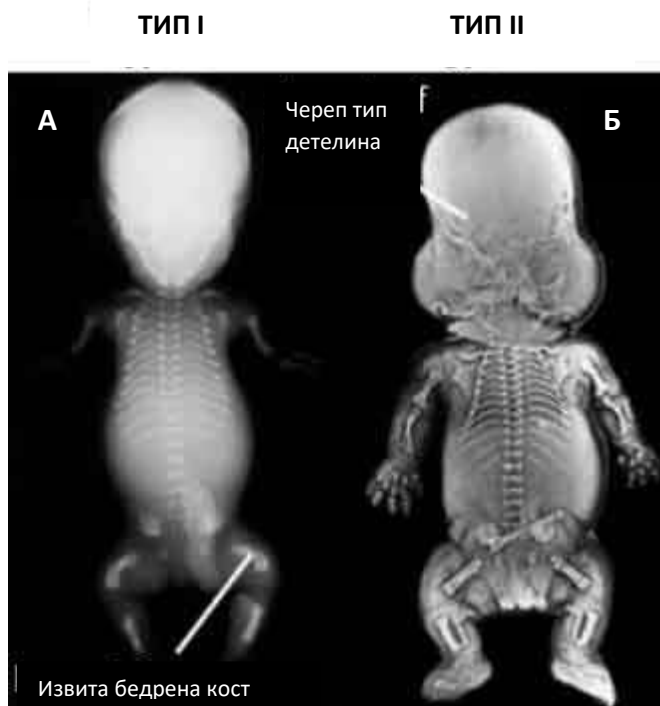
Нуклеотидна замяна в ДНК	Замяна на протеиново ниво
c.1620C>A	p.Asn540Lys
c.1620C>G	p.Asn540Lys

Тези две мутации се откриват при около 70% от пациентите с хипохондроплазия. Въпреки честите мутации във *FGFR3* гена, около 30% от пациентите с хипохондроплазия са с все още неустановен генетичен дефект, което говори за голяма генетична хетерогенност на заболяването.

#### 1.1.5. ТАНАТОФОРНА ДИСПАЗИЯ (Thanatophoric dysplasia)

Танатофорната дисплазия е тежка форма на скелетна дисплазия, характеризираща се с множество скелетни малформации като например изключително късите крайници и допълнителните кожни гънки на ръцете и краката. Други характеристики на това състояние включват тесен гръден кош, къси ребра, недоразвити бели дробове, уголемена глава с голямо чело и широко разположени очи. Описани са две форми на танатофорна дисплазия-тип I и тип II (Фигура 7).

## Танатофорна дисплазия



**Фигура.7** Танатофорна дисплазия

**А-** Танатофорна дисплазия тип I

Със стрелка е показана извитата бедрена кост.

**Б-** Танатофорна дисплазия тип II

Със стрелка е показана черепната деформация, известна като череп тип детелина.

Website: <http://www.sonoworld.com/>

Танатофорната дисплазия тип I се отличава с наличието на извити бедрени кости (Фигура 7А). Тип II танатофорна дисплазия се характеризира с прави бедрени кости и умерена до тежка черепна аномалия - череп тип детелина (Фигура 7Б). Бебета с този синдром обикновено са мъртвородени или умират скоро след раждането от дихателна недостатъчност. Танатофорната дисплазия се унаследява по автосомно доминантен начин. В таблица 4 са представени мутациите в *FGFR3* гена, които са отговорни за изява на този вид дисплазия.

**Таблица 4.** Мутации в *FGFR3* гена свързани с Танатофорна дисплазия.

Фенотип	Нуклеотидна замяна в ДНК	Замяна на протеиново ниво	Референтна секвенция
Тип I	c.742C>T	p.Arg248Cys <sup>3</sup>	NM_000142.3  NP_000133.1
	c.746C>T	p.Ser249Cys	
	c.1108G>C	p.Gly370Cys	
	c.1111A>T	p.Ser371Cys	
	c.1118A>G	p.Tyr373Cys	
	c.1949A>T	p.Lys650Met	
	c.2420G>T	p.*807Leuext*101	
	c.2419T>G	p.*807Glyext*101	
	c.2419T>C	p.*807Argext*101	
	c.2419T>A	p.*807Argext*101	
	c.2421A>T	p.*807Cysext*101	
	c.2421A>C	p.*807Cysext*101	
	c.2421A>G	p.*807Trpext*101	
Тип II	c.1948A>G	p.*Lys650Glu	

#### 1.1.6. SADDAN (SEVERE ACHONDROPLASIA WITH DEVELOPMENTAL DELAY AND ACANTHOSIS NIGRICANS)

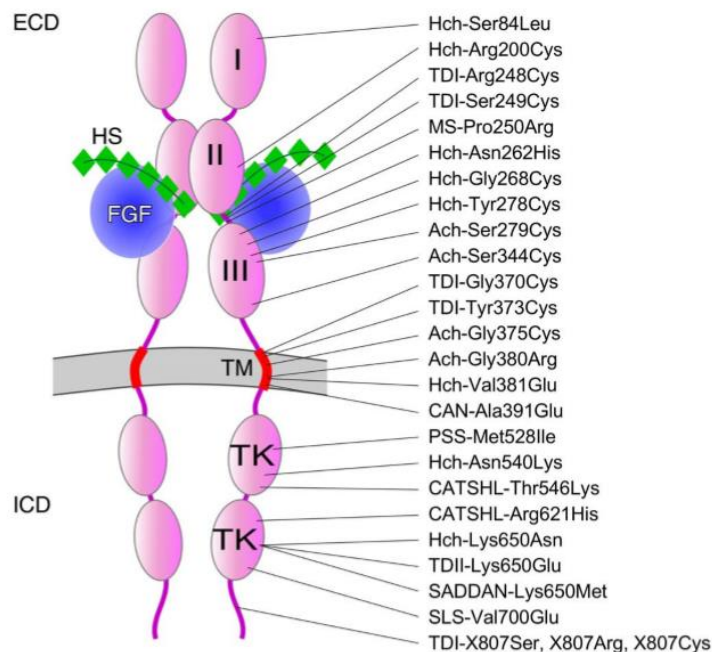
Заболяване, характеризиращо се с аномалии на скелета, мозъка и кожата. Acanthosis nigricans, прогресивно кожно заболяване, характеризиращо се с плътна, тъмна, кадифена кожа, е друга характерна черта на SADDAN, която се развива в ранна детска възраст. За момента е открита само една мутация във *FGFR3* гена, която се асоциира със SADDAN синдром – c.1949A>T, p.Lys650Met.

#### 1.1.7. СИНДРОМ НА MUENKE

Синдромът на Muenke е най-често срещаната краниосиностоза [Sabatino et al., 2004]. Синдромът на Muenke се среща при около 1 на 30 000 новородени. Това състояние представлява приблизително 4 % от всички случаи на краниосиностоза. Синдромът е с

автозомно доминантно унаследяване и се характеризира с преждевременно сливане на коронарните шевове, загуба на слуха, забавяне на развитието и интелектуален дефицит [Kruszka et al., 2016]. Синдромът на Muenke се причинява от мутацията p.Pro250Arg, локализирана в линкера на извънклетъчния домен на FGFR3 между имуноглобулиноподобните домени II и III (Фигура 9) [Bellus et al., 1996; Gripp et al., 1998].

Мутационният спектър на *FGFR3* гена включва патологични варианти, водещи до повишена функция или загуба на функция на рецептора, което е причина за скелетната дисплазия. Тези генетични промени са локализирани в целия кодиращ регион на гена. Някои от мутациите в *FGFR3* променят афинитета или специфичността на рецептора за различни FGF лиганди, докато други засягат активността на тирозин-киназата или разграждането на рецепторите. На фигурата по-долу е показано относителното разпределение на мутациите в рецептора (Фигура 8)



Ach, Achondroplasia  
 CAN, Crouzon syndrome with Acanthosis Nigricans  
 CATSHL, Camptodactyly, Tall stature, and Hearing loss  
 Hch, Hypochondroplasia  
 MS, Muenke syndrome  
 PSS, proportional short stature  
 SADDAN, Severe Achondroplasia with Developmental Delay and Acanthosis Nigricans  
 SLS, Spider lamb syndrome (Ovis aries *Fgfr3*)  
 TDI, Thanatophoric dysplasia type I  
 TDII, Thanatophoric dysplasia type II

**Фигура 8.** Мутационен спектър на *FGFR3* гена [Laederich et al., 2010].

Легенда: FGF лигандите са показани в синьо, кофакторите на хепаран сулфат - в зелено. ECD - извънклетъчен домен; ICD - вътреклетъчен домен; HS- хепаран сулфат; I, II, III, имуноглобулиноподобни домени; ТК – тирозин-киназни домени; ТМ - трансмембранен домен (червен).

## 1.2. FGFR2-СВЪРЗАНИ СИНДРОМИ (СКЕЛЕТНИ ДИСПЛАЗИИ FGFR2)

FGFR2-свързани скелетни дисплазии са група от 6 заболявания с автозомно доминантен тип на унаследяване. Към тях спадат Pfeiffer синдром, Apert синдром, Crouzon синдром, синдром на Beare-Stevenson, FGFR2-свързана изолирана коронарна синустоза, синдром на Jackson-Weiss.

Някои от отличителните клинични характеристики на синдромите са представени в Таблица 5.

**Таблица 5.** Клинични характеристики на FGFR2-свързани скелетни дисплазии

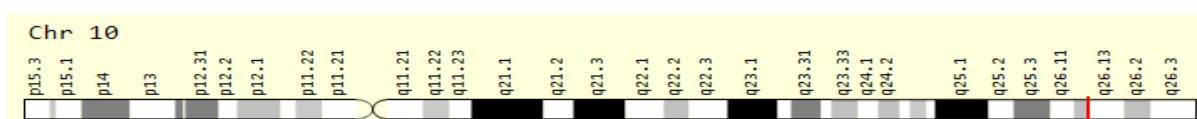
Заболяване	Палец	Ръце	Голям пръст на крака	Ходило
Crouzon синдром	Нормално	Нормално	Нормално	Нормално
Apert синдром	Синдактилия	Синдактилия на меки тъкани ± кости	Синдактилия	Синдактилия на меки тъкани ± кости
Pfeiffer синдром	Широк, медиално отклонен	Брахидактилия	Широк, медиално отклонен	Брахидактилия
Синдром на Jackson-Weiss	Нормално	Вариабилно	Широк, медиално отклонен	Абнормален глезен
Синдром на Beare-Stevenson	Нормално	Нормално	Нормално	Нормално
FGFR2-свързана изолирана коронарна синустоза	Нормално	Нормално	Нормално	Нормално

Crouzon синдром се характеризира с преждевременно срастване на някои черепни кости (краниосинустоза). Абнормалният растеж на тези кости води до зрителни проблеми, причинени от плитки очни кухини и недоразвита горна челюст, което е повод някои от пациентите да имат стоматологични проблеми. Понякога се наблюдава и загуба на слуха, дължащо се на тесни ушни канали. Тежестта на тези признаци и симптоми варира между засегнатите индивиди. Пациентите със синдром на Crouzon обикновено са с нормално интелектуално развитие.

При синдрома на Beare-Stevenson се наблюдават само кожни прояви и ранно сливане на определени черепни кости (краниосиностоза), която възпрепятства нормалния растеж на черепа и повлиява формата на главата и лицето.

С изключение на *FGFR2*-свързана изолирана коронарна синостоза, синдромите включват като клинична изява очен хипертелоризъм, среднолицева хипоплазия, малък чип нос и прогнатизъм. Често се среща и високо разположено небце, а по-рядко цепка на небцето [Stoler et al., 2009]. Може да се наблюдава стеноза или атрезия, както и сензорна загуба на слуха и зрителни проблеми, изоставане в развитието и/или интелектуален дефицит, хидроцефалия [Ranger et al., 2010]. Дихателни проблеми могат да се появят в първите няколко месеца от живота, поради запушване на горните дихателни пътища, свързани с хипоплазия, атрезия или стеноза [Chen et al., 2008]. При тежки случаи, тези проблеми могат да се проявят като животозастрашаваща респираторна недостатъчност [Freeman et al., 2008]. Рискът от интракраниална хипертония е най-голям при синдрома на Crouzon [Lajeunie et al., 2000; Renier et al., 2000b]. Най-висок риск за интелектуален дефицит се наблюдава при пациенти със синдром на Apert [Renier et al., 1996; Lajeunie et al., 2000].

***FGFR2*** генът е разположен на дългото рамо на 10<sup>-та</sup> хромозома (10q26.13) (Фигура 10) и съдържа приблизително 120 kb геномна ДНК с общо 18 екзона, от които 17 са кодиращи. В резултат на алтернативен сплайсинг се образуват две изоформи на иРНК-*FGFR2IIIb* и *FGFR2IIIc*, които се характеризират с различен брой аминокиселини. *FGFR2IIIb* се открива предимно в кожата и вътрешните органи. *FGFR2IIIc* се открива в мезенхима, който включва краниофациалната кост и поради този факт мутациите в този ген са свързани с краниосиностоза. Голяма част от мутациите във *FGFR2* са missense мутации, инсерции, делеции и splice-site мутации. Унаследяват се по автозомно доминантен механизъм. Мутации във *FGFR2* са свързани с проява на различни синдроми като Apert, Crouzon, Pfeiffer, Jackson-Weiss и Beare-Stevenson [Przylepa et al., 1996].



**Фигура 9.** Локализация на *FGFR2* гена върху 10<sup>-та</sup> хромозома. Website: <http://ghr.nlm.nih.gov/>

Всички заболявания от групата са моногенни, което значително улеснява молекулярно-генетичната диагностика.

### **1.3. ЗАБОЛЯВАНИЯ С НАРУШЕНИЯ В СЪЕДИНИТЕЛНАТА ТЪКАН**

#### **1.3.1. СИНДРОМИ СВЪРЗАНИ С COL1A1 / COL1A2 ГЕНИ (OSTEOGENESIS IMPERFECTA)**

Osteogenesis imperfecta (OI) представлява група редки заболявания причинени от генетични нарушения, които засягат главно костите (честота 1:20 000) [Edelu et al., 2014]. Терминът "osteogenesis imperfecta" означава несъвършена костна формация. При хората с това заболяване се наблюдават кости, които лесно се чупят, често от лека травма или без видима причина. Многобройните фрактури са чести и в тежките случаи могат да се появят още преди раждането. При по-леките форми на заболяването могат да се наблюдават само няколко фрактури през целия живот на човека.

Има поне осем описани форми на Osteogenesis imperfecta, означени като тип I до тип VIII [Marini et al., 2018]. Различните форми на OI могат да бъдат разграничени по техните признаци и симптоми, въпреки че техните характерни черти се припокриват. Тип I е най-леката форма на заболяването, а тип II е най-тежката; други видове на това състояние имат признаци и симптоми, които попадат някъде между тези два типа. Все по-често се използват генетични фактори за определяне на различните форми на остеогенезата.

Леките форми на Osteogenesis imperfecta, включително тип I, се характеризират с костни фрактури през детството и юношеството, които често са резултат от лека травма. Фрактури се срещат по-рядко в зряла възраст. Хората с леки форми на заболяването обикновено имат синьо или сиво оцветяване на склерата на окото, също така може да се наблюдава и загуба на слуха в зряла възраст. Засегнатите индивиди обикновено са с нормална или почти нормална височина [Hayes et al., 1999].

По-тежките форми на заболяването причиняват чести костни фрактури, които могат да започнат още преди раждането и са резултат от лека травма или без видима причина. Наблюдават се още и синя склера, нисък ръст, загуба на слуха, респираторни проблеми и нарушения в нормалното развитие на зъбите, наречено dentinogenesis imperfecta.

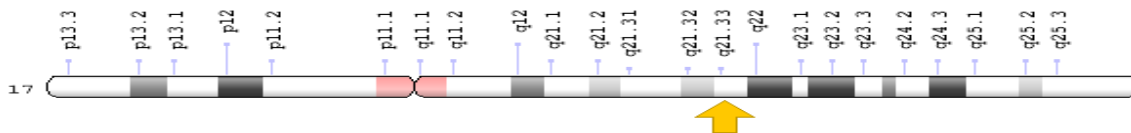
Най-тежките форми на Osteogenesis imperfecta - тип II, могат да включват необичайно малък, крехък гръден кош и недоразвити бели дробове. Децата с тези

аномалии имат животозастрашаващи проблеми с дишането и често умират малко след раждането [Faqeih et al., 2009].

Повечето случаи на *Osteogenesis imperfecta* имат автозомно доминантен модел на унаследяване, но не е малък процентът и на нововъзникналите мутации. Описаният до тук фенотип се причинява от мутации в гените *COL1A1* или *COL1A2*. ОI се среща с еднаква честота както при мъжете, така и при жените и във всички расови групи.

ОI проявява големи различия във фенотипната изява и тежестта на клиничните симптоми. Тежестта се описва като лека, умерена или тежка. Най-тежките форми водят до перинатална смърт. Клиничните характеристики като честота на фрактури, мускулна сила или екстраскелетни проблеми, варират значително не само между различните видове ОI, но и в рамките на типовете и дори в рамките на едно и също семейство (Таблица 6) [Ben Amor et al., 2011].

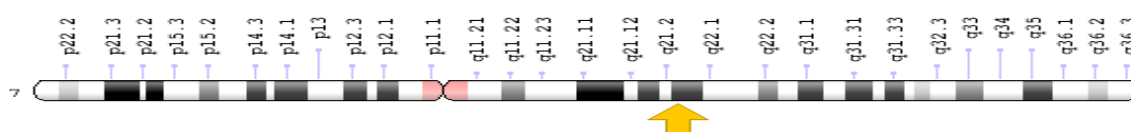
*COL1A1* генът е разположен на дългото рамо на 17<sup>-та</sup> хромозома (17q21.33) (Фигура 10).



**Фигура 10.** Локализация на гена *COL1A1* върху 17<sup>-ма</sup> хромозома.

Website: <http://ghr.nlm.nih.gov/>

*COL1A2* генът е разположен на дългото рамо на 7<sup>-ма</sup> хромозома (7q21.3) (Фигура 11).



**Фигура 11.** Локализация на гена *COL1A2* върху 7<sup>-ма</sup> хромозома.

Website: <http://ghr.nlm.nih.gov/>

По-рядко, Osteogenesis imperfecta има автозомно рецесивен модел на унаследяване. Тези случаи обикновено са резултат от мутации в гените *CRTAP* или *P3H1*.

**Таблица 6.** Клинична характеристика на *COL1A1/2* Osteogenesis Imperfecta по типове.

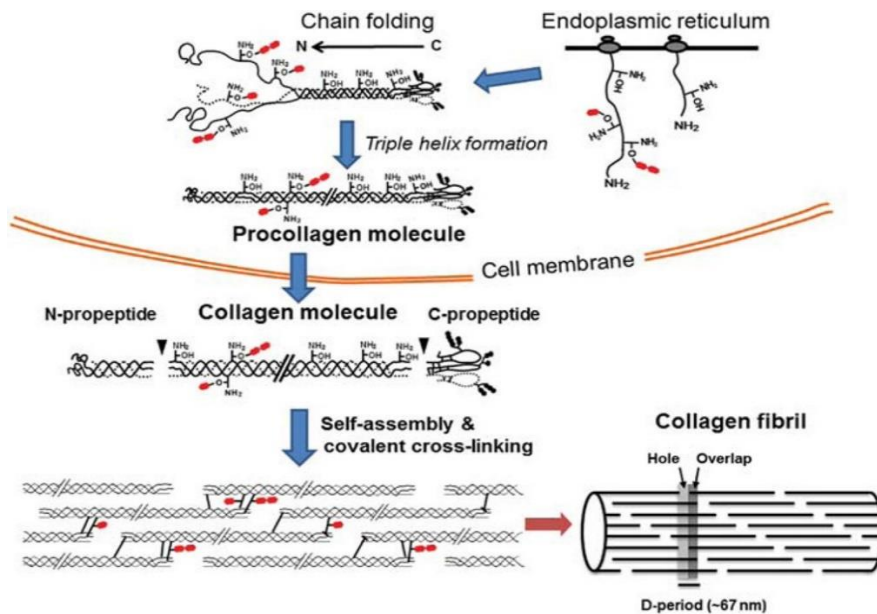
Тип	Унаследяване	Тежест на клиниката	Фрактури	Деформация на костите	Ръст	склери	DI*	Загуба на слуха
Класическа форма със синя склера	АД	Лека	~100	-	От нормален до нисък за фамилията	сини	рядко	50%
Перинатална форма	АД	Летална	Ребра, дълги кости	чести	нисък	Тъмно сини	+	-
Прогресивна	АД	Средна	Ребра, малки костици	Средни до чести	Много нисък	сини	+	често
Променлива форма с нормални склери	АД	Средна до лека	Множество	Леки до средни	нисък	Нормални и до сиви	+/-	понякога

**\*DI- Dentinogenesis imperfecta**

Колагените обхващат голямо семейство от тройно спирални протеини и са най-разпространените белтъци в гръбначните животни, представляващи ~ 30%. Понастоящем са идентифицирани най-малко 29 генетично различни вида колаген, които се кодират от най-малко 44 гена [Carter et al., 1999]. Колагенът е белтък, който укрепва и поддържа много тъкани в тялото, включително хрущяли, кости, сухожилия, кожа и склерата на окото. В зависимост от молекулярната структура и вида на асемблиране, колагените могат да бъдат разделени в няколко подгрупи [Hulmes et al., 2008]. Фибрил-образуващ колаген са най-голямата подгрупа, която включва типове I, II, III, V, XI, XXIV и XXVII. От всички видове колагени, колагенът от фибриларен тип I е най-разпространеният тип, който осигурява стабилност и форма на повечето тъкани и органи. В допълнение към структурните функции, тип I и други колагени също функционират като лиганди за специфични клетъчни рецептори като интегрини,

гликопротеин VI, семейство манозни рецептори и др. [Vogel et al., 1997; Bhadriraju et al., 2009; Jurgensen et al., 2011].

Биосинтезата на колагена е дълъг и сложен процес, включващ редица постранслационни модификации, нагъване, секреция, проколагенова обработка, самосглобяване и прогресивно омрежване с кръстосани връзки от типа глава-опашка (Фигура 12).

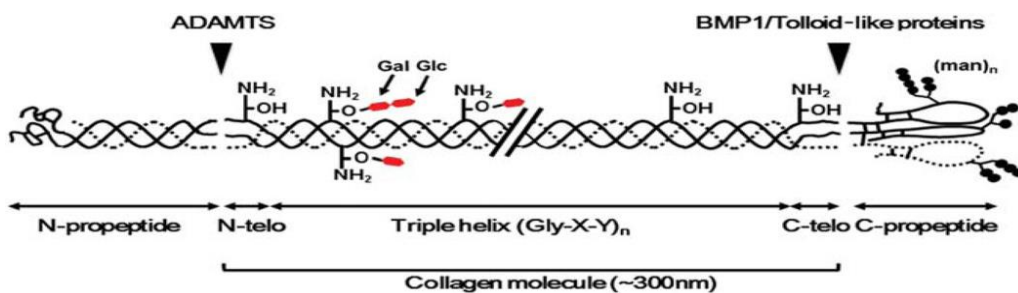


**Фигура 12.** Биосинтез на колаген от тип I и модификации на лизин. Горната част на фигурата (над клетъчната мембрана) илюстрира вътреклетъчните събития, а долната част на фигурата (под клетъчната мембрана) илюстрира извънклетъчните събития.

По време на синтеза на  $\text{pro}\alpha$  вериги в ендоплазмения ретикулум, специфичните остатъци от пептидил-лизин се хидроксилират, за да образуват хидроксилизин ( $-\text{OH}-\text{NH}_2$ ) и впоследствие специфични гликозилирани хидроксилизинови остатъци (О-свързано гликозилиране). За последния са прикрепени или единична галактоза (червен шестоъгълник), или глюкозо-галактоза (два червени шестоъгълника) (виж Фигура 12). След тези и други модификации (например хидроксилиране на пролин, аспарагин-свързано гликозилиране, показано като затворени кръгове в С-пропептида), две  $\text{pro}\alpha 1$  вериги (плътна линия) и една  $\text{pro}\alpha 2$  верига (пунктирна линия) се свързват една с друга и се усукват в тройна спирална молекула от С- до N-края, за да образува молекула проколаген, пакетирани и секретирани в извънклетъчното пространство. Впоследствие

N- и C-пропептидите се откъсват и освобождават колагеновата молекула. Колагеновите молекули след това спонтанно се самоорганизируют във фибрилата и се стабилизират чрез ковалентно вътре- и междумолекулно omрежване. По време на биосинтезата, молекулите на колагена са пакетирани и разположени така, че се формират две повтарящи се области-на припокриване и отвори в фибрилата наречен D период (~ 67 nm),. [Yamauchi et al., 2012].

Колагенът тип I е хетеротримерна молекула с дължина ~ 300 nm и дебелина ~ 1.5 nm. *COL1A1* генът кодира компонент от колаген тип I, наречен про $\alpha$ 1 (I) верига. Тази верига се комбинира с друга про $\alpha$ 1 (I) верига и също така с про $\alpha$ 2 (I) верига (кодирана от гена *COL1A2*), за да се получи молекула от проколаген тип I (Фигура 13). Три-верижният централен район на колагена има уникална протеинова структура като всяка полипептидна верига съдържа многократно повторен фрагмент от аминокиселини (gly-X-Y)<sub>n</sub>, където X е най-често пролин, а Y е хидроксипролин или хидроксилизин. Той е важен за стабилността на молекулата. След синтеза в ендоплазмения ретикулум (EP) тези тройно усукани, подобни на въже проколагенови молекули трябва да бъдат обработени от ензими извън клетката. Те се подреждат в дълги, тънки фибрили, като претърпяват множество пост-транслационни модификации, сред които хидроксилиране на специфични пролинови остатъци, хидроксилиране на специфични лизинови остатъци и гликозилиране на остатъци от хидроксилизин. Впоследствие молекулите на проколагена се транспортират от EP до апарата на Голджи и се секретират в извънклетъчното пространство, където се пакетират спонтанно в характерния модел на колагеновото влакно.



**Фигура 13.** Структурата на проколаген тип I

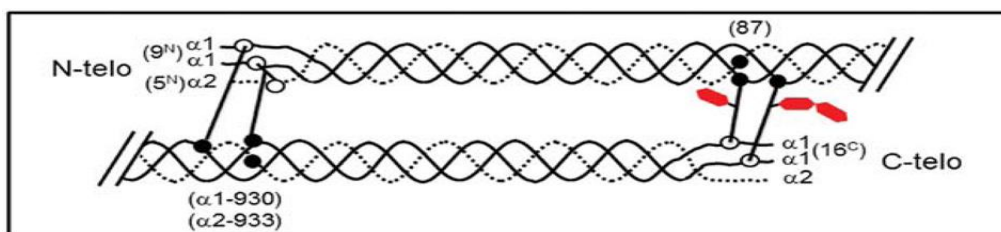
Проколаген тип I се състои от две про $\alpha$ 1 (I) вериги (плътна линия) и една про $\alpha$ 2 (I) верига (пунктирна линия), образуващи уникална тройна спирала.

N-пропептидът съдържа къса тройна спирала и вътрешни-дисулфидни връзки. Всяка верига на глобуларния C-пропептид е гликозилирана с манозен аспарагин-свързан олигозахарид и е стабилизирана чрез междуверижни дисулфидни връзки. Молекулата на проколагена се разцепва на специфични места в N- и C-крайните области (означени със стрелки) от ADAMTS и BMP1 / Tolloid-like протеинази.

Колагенът Тип I съдържаща три домена: N-телопептид (N-telo), непрекъснатата тройна спирала и C-telopeptide (C-telo). Всяка  $\alpha$  верига в молекулата се навива в удължена лявовъртяща спирала и след това три  $\alpha$  вериги са усукани в дясна тройна спирална структура.

Спиралните структури във фибрилите се стабилизират допълнително чрез ковалентно междумолекулно кръстосано свързване, което е критично за образуването на механично функционални колагенови фибрили. В този процес лизиновите модификации играят решаваща роля. Първоначално се образуват вътрешни и междумолекулни кръстосани връзки. След това те могат допълнително да се модифицират в многовалентни кръстосани връзки чрез включване на допълнителни аминокиселинни остатъци [Fujimoto et al., 1977; Fujimoto et al., 1978; Eyre et al., 1984; Yamauchi et al., 1988].

Наличието на такива сложни междумолекулни кръстосани връзки демонстрира високоспецифичното молекулно подреждане на фибрилите. Тези междумолекулни напречни връзки са предпоставка за физичните и механичните свойства на колагеновите фибрили и осигуряват стабилността и еластичността на мрежовата формация. Кръстосаните връзки глава-опашка водят до образуването на много здрави и еластични колагенови влакна от тип I (Фигура 14). Колагеновата функция включва ригидност и еластичност [Hulmes et al., 2008].



**Фигура 14.** Представени са свързващите места при кръстосано свързване тип глава опашка на колаген тип I. Плътните черни линии вътре и между молекулите посочват вътрешни и междумолекулни напречни връзки. Числата в скобите показват номера на телопептидил алдехидния остатък (плътните черни точки) и лизинови или

*хидроксизинови остатъци (неоцветените точки), които участват в омрежаването. Червеният шестоъгълник представлява молекула глюкоза или галактоза прикрепена към хидроксизин. Плътната линия представлява  $\alpha 1$  верига, пунктираната линия е  $\alpha 2$  верига*

### **1.3.2. СИНДРОМИ СВЪРЗАНИ С COL11A1 / COL2A1 ГЕНИ**

Синдромът на Stickler е автозомно доминантно заболяване, засягащо 1:7500 до 1:9000 новородени (MIM 108300), което се характеризира с типични лицеви, очни, ставни и слухови увреди [Cohen et al., 1974; Aymé et al., 1984; Shanske et al., 1997; Akawi et al., 2011]. Най-често съобщаваните симптоми са хипоплазия на средната част на лицето, отлепване на ретината, цепка на небцето, загуба на чувствителност, остеоартрит, висока миопия.

Синдромът на Stickler представлява група от наследствени заболявания, характеризиращи се с отличителен външен вид на лицето, аномалии на очите, загуба на слуха и проблеми със ставите. Тези признаци и симптоми варират в широки граници при засегнатите лица. Характерна особеност на синдрома е типичната лицева визия, която е резултат от недоразвити кости в средата на лицето, включително скулите и носа. Много от пациентите имат тежка миопия. Срещат се и редица аномалии на очите като глаукома, катаракта, отлепяне на ретината и др., които причиняват нарушено зрение или слепота в някои случаи. Засягането на слуха варира и може да стане по-тежко с течение на времето. Загубата на слуха може да бъде сензорна, което означава, че е в резултат от аномалии на средното ухо. Повечето пациенти имат скелетни аномалии, които засягат ставите. Могат да се наблюдават проблеми с гръбначния стълб, включително патологично изкривяване (сколиоза или кифоза) и сплеснати прешлени (платиспондилия), които могат да причинят болки в гърба. Изследователите са описали няколко вида синдром на Stickler, които се отличават по своите генетични и фенотипни характеристики. По-специално, аномалиите на очите и тежестта на загубата на слуха се различават при различните видове. Тип I има най-висок риск от отлепване на ретината. Тип II също включва аномалии на очите, докато такива не са характерни за тип III. Типовете II и III са по-рискови от тип I по отношение на значителна загуба на слуха. Типове IV, V и VI са много редки.

При синдрома на Marshall [MIM 154780] се наблюдават подобни фенотипни характеристики както при Stickler синдрома [Marshall et al., 1958; Herrmann et al., 1975] и все още е дебат, дали тези две състояния са различни синдроми или клинична проява на един и същи синдром [Majava M et.al.,2007, Shanske AL et.al.,2007,Stickler GB et. al., 2001, Stickler GB, Pugh DG 1961 ,Marshall D 2012]. Клиничните прояви на тези две състояния са обобщени в Таблица 7.

**Таблица 7.** Клинични характеристики на Marshall и Stickler синдрома [Shanske et al.,97]

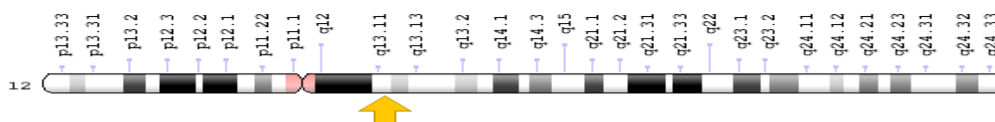
<b>Характеристика</b>	<b>Marshall синдром</b>	<b>Stickler синдром</b>
<i>Глава</i>	Брахицефалия, плътна calvaria	Нормоцефалия
<i>Средната част на лицето</i>	Плоска, скъсена	Вдлъбната, плоска
<i>Нос</i>	Малък къс нос, плосък в основата си	Дълъг нос с изпъкнала основа
<i>Очен хипертелоризъм/др. Очни</i>	Да/миопия, глаукома,нарушения на ретината, без астигматизъм	Не/миопия, витреоретинална дегенерация, астигматизъм
<i>Находки</i>	честа, невросензорна	Средна
<i>Загуба на слуха</i>	Нисък, набит	Нормален или висок и тънък
<i>Ръст</i>	Спондило-епифизарни аномалии	Стеохондро-дисплазия, Спондило-епифизарни аномалии
<i>Скелетни аномалии</i>	Хлабави	Хлабави, артропатия с дегенеративен артрит
<i>Връзки</i>	Автозомно доминантно	Автозомно доминантно
<i>Унаследяване</i>	Не	Да
<i>COL2A1 мутации</i>		

Всички гени, свързани със синдрома на Stickler и Marshall, кодират компоненти от колагени, които са сложни молекули, моделиращи структурата и силата на съединителната тъкан, поддържаща ставите и органите на тялото [Stratton et al., 1991]. В много различни части на тялото нерегулярните или редуцирани молекули на колаген увреждат развитието на съединителната тъкан, което води до голямо разнообразие от синдромни характеристики [Vintiner et al., 1991]. В гена *COL2A1* са открити няколко мутации, причиняващи синдром на Stickler. В допълнение, мутации, причиняващи синдром на Stickler и Marshall са открити и в гена *COL11A1*. Около 80 до 90% от всички случаи са причинени от мутации в гена *COL2A1*. Останалите 10 до 20% от случаите са резултат от мутации в гена *COL11A1* [Majava et al., 2007].

## **Колаген тип II**

Колаген тип II принадлежи към класа на колагените, образуващи фибрила. Това е хомотример на три еднакви вериги  $\alpha 1$  (II), които са кодирани от гена *COL2A1* [Vikkula

et al., 1995]. Генът се състои от 54 екзона и е с размер около 31 kb [Ala-Kokko et al., 1990]. *COL2A1* генът е локализиран на дългото рамо на 12<sup>-та</sup> хромозома (12q13.11-q13.12) [Takahashi et al., 1990] (Фигура 15). Колаген тип II е основен компонент на хиалиновия хрущял и също така преобладава в стъкловидното тяло. Среща се и в междупрешленните дискове и вътрешното ухо. [Vikkula et al., 1992, Oganessian et al., 1997]. Колаген тип II първоначално се синтезира като проколаген, съдържащ N- и C-крайни пропептиди, които впоследствие се отстраняват извънклетъчно от N- и C-протеази [Vuorio et al., 1990]. Информационната РНК на проколаген II претърпява алтернативен сплайсинг, което води получаването на две различни форми, тип IIA (дълга форма), който включва екзон 2 и тип IIB (къса форма) без екзон 2 [Ryan et al., 1990]. Късата форма на *COL2A1* се експресира главно в диференцирани хондроцити в хрущялната тъкан при възрастни, докато дългата форма се експресира в стъкловидното тяло на окото. Ембрионалната експресия се различава, така че сплайсинг варианта IIA се експресира в ембрионалния спинален ганглий, а също и в редица нехрущялни тъкани на плода, докато вариант IIB се експресира в ембрионалното стъкловидно тяло [Sandell et al., 1991, Bishop et al., 1994]. Тъй като колаген тип II се среща главно в хиалиновите хрущяли и стъкловидното тяло, намаленото му количество или нарушена структура са свързани с нарушения на гръбначния стълб, епифизата, слуха и очите.



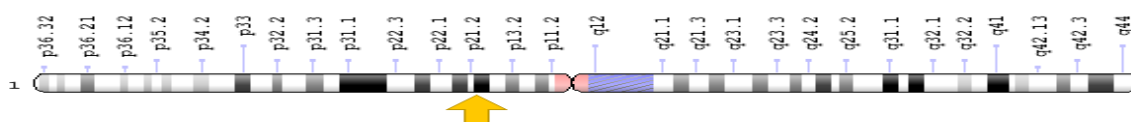
**Фигура 15.** Локализация на гена *COL2A1* върху 12<sup>-та</sup> хромозома. Website: <http://ghr.nlm.nih.gov/>

Мутациите в *COL2A1* гена водят до нарушения, вариращи по тежест от смъртоносни до леки хондродисплазии [Horton et al., 1989]. Генът *COL2A1* е локализиран на дългото рамо на 12-та хромозома (12q13.11)

## Колаген тип XI

Колаген тип XI е хетеротримерен фибриларен белтък съставен от три различни  $\alpha$  вериги. Веригите  $\alpha 1$  (XI),  $\alpha 2$  (XI) и  $\alpha 3$  (XI) са кодирани съответно от гените *COL11A1*, *COL11A2* и *COL2A1* [Eyre et al., 1987; Henry et al., 1988; Bernard et al., 1988; Kimura et al., 1989; Takahashi et al., 1990]. *COL11A1* генът се състои от 68 екзона и е с размер над 150

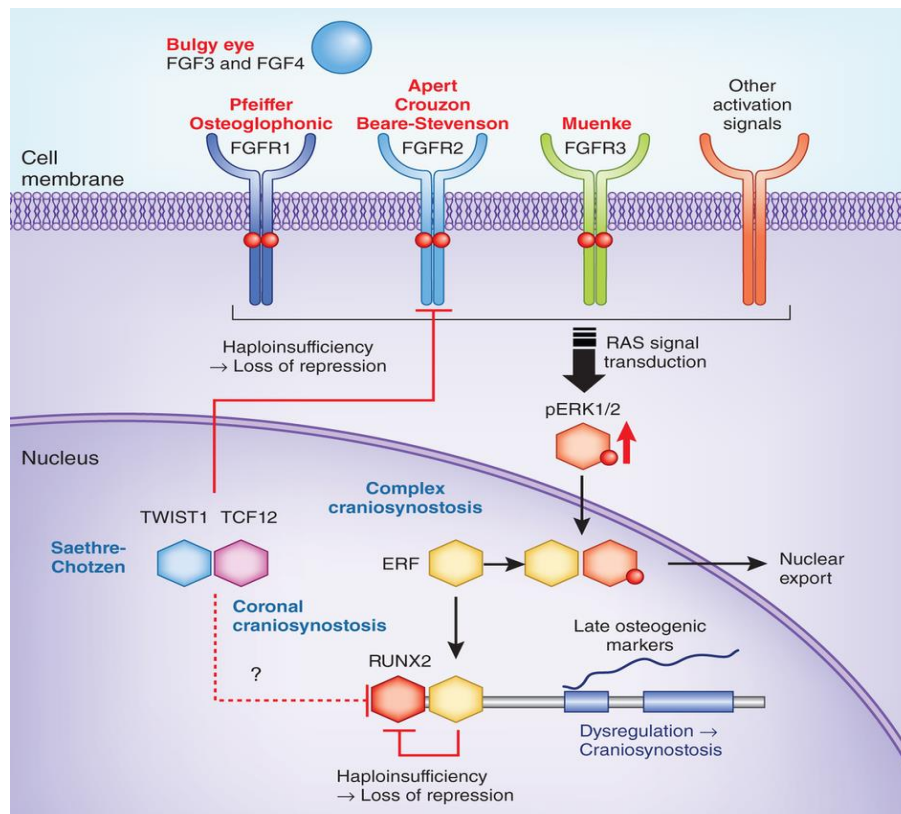
kb, локализиран на късото рамо на 1<sup>-ва</sup> хромозома (1p21) [Henry et al., 1988, Annunen et al., 1999b] (Фигура 16) Генът *COL11A2* е разположен на бp21.2 и е с размер 28 kb, състоящ се от 66 екзона [Kimura et al., 1989; Vuoristo et al., 2004]. Генът, кодиращ веригата  $\alpha 3$  (XI) на колаген XI, е ПВ сплайсинг вариант на *COL2A1* гена [Ryan et al., 1990]. Колаген XI се намира главно в тъкани, които експресират колаген II като хиалиновия хрущял и стъкловидното тяло, но той се експресира и в много други тъкани, включително мозък, сухожилие, сърдечна клапа, кожа, калвария и ендохондрална кост [Mendler et al., 1989; Nah et al., 1992]. Веригите  $\alpha 1$  (XI) и  $\alpha 2$  (XI) съдържат подобни големи, N-крайни домени. Състои се от PARP (богат на пролин-аргинин протеин) или PARP-подобен домен, променлив регион и малка тройна спирала [Gregory et al., 2000]. И трите гена на колаген тип XI претърпяват алтернативен сплайсинг в кодиращия домен на N-пропептида. Доказано е, че  $\alpha 1$  (XI) проколагенът е подложен на алтернативен сплайсинг в променливия регион (VR) на N-пропептида, който е кодиран от екзони 5-9. Веригата  $\alpha 2$  (XI) претърпява постранслационни промени в екзон 7. [Tsumaki et al., 1995; Zhidkova et al., 1995]. Колаген XI е от съществено значение за сглобяването, организацията и развитието на хрущяла [Eyre et al., 1987; Blaschke et al., 2000; Gregory et al., 2000]. В хрущяла той се събира с колагени II и IX, образувайки тънка мрежа от колагенови фибрили [Mendler et al., 1989; Nah et al., 1992]. В не-хрущялните тъкани е доказано, че колаген XI взаимодейства с веригите на колаген V, който е силно хомоложен на колаген XI [Mayne et al., 1993; Fichard et al., 1995; Gregory et al., 2000].



**Фигура 16.** Локализация на гена *COL11A1* върху 1-ва хромозома. Website: <http://qhr.nlm.nih.gov/>

## МОЛЕКУЛЯРНО ГЕНЕТИЧЕН ПОДХОД ЗА ДИАГНОСТИКА И БЪДЕЩИ ТЕРАПЕВТИЧНИ МЕТОДИ

След прегледа на гореописаните заболявания, свързани с нарушения в хрущялната тъкан, възниква въпросът как асоциираните гени и техните протеинови продукти могат да се включат в една обща схема, за да се обясни наблюдаваната клинична и генетична хетерогенност. Отчасти отговор на този въпрос може да се получи от Фигура 17.



**Фигура 17.** Представяне на част от MAPK сигналната каскада, участваща в регулацията на костния растеж.

От Фигура 17 се вижда, че всички гореописани гени, свързани с нарушения в хрущялната тъкан, кодират протеини, участващи в MAPK сигналната каскада и всяко отклонение в регулацията води до различна фенотипна изява. Само дълбокото познаване на участниците в сигналната каскада и молекулните им дефекти може да послужи като основа за изработване на молекулярно-генетичен подход за диагностика на скелетни дисплазии и краниосиностози и на тази база търсене на фенотип-генотип корелации.

## ТЕРАПЕВТИЧНИ ПОДХОДИ

През 1994 г. изследването на хондроплазията направи значителен напредък с откритието, че активиращите мутации в *FGFR3* гена са етиологията на широк клиничен спектър на хондроплазии, включително Hch, Ach, SADDAN и TD. През последното десетилетие се появяват потенциални терапевтични подходи за лечение на тези състояния. За да бъдат ефективни, терапиите за Ахондроплазия трябва да се прилагат в период от време, който се простира от раждането до пубертета.

Хирургичната интервенция е често срещана форма на терапия. Хирургичното удължаване на крайниците използва класическата процедура на Илизеров, при която се разрязват кортикално дългите кости (остеотомия), външните фиксатори се поставят проксимално и дистално от остеотомията, а разтягането ѝ се прилага постепенно в продължение на много месеци, за да се увеличи дължината на костта [Paley et al., 1988; Schiedel et al., 2012]. Средната дължина е 20,5 cm след множество процедури (прилагани върху бедрените кости и тибиите) [Kim et al., 2014]. Това хирургично лечение позволява подобряване качеството на живот. Тази процедура обаче е болезнена и е свързана с усложнения, които включват инфекция, мускулни контрактури и повишен риск от фрактури [Paley et al., 1990]. Последните иновации, като например използването на интрамедуларна фиксация, могат да подобрят резултата и да намалят риска от усложнения [Paley et al., 2015]. Този „лечебен процес“ остава спорен, тъй като е свързан с висока степен на риск. Необходима е предоперативна психологическа оценка, за да се оцени високият риск от усложнения спрямо корекцията на ръста. В бъдеще комбинацията от хирургичното удължаване на крайниците с фармакологични стратегии (виж по-долу) може допълнително да подобри резултатите.

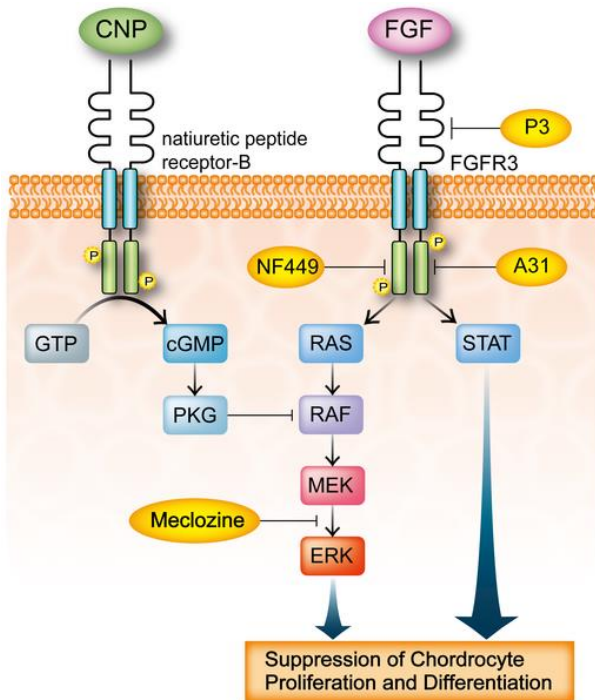
## БЪДЕЩИ ТЕРАПЕВТИЧНИ СТРАТЕГИИ

До момента не са налични ефективни терапии за *FGFR3*-свързани скелетни дисплазии. Растежният хормон (Growth hormone, GH) е прилаган при деца с ахондроплазия въз основа на доказателства за краткосрочен положителен ефект [Medscape]. Отговорът към GH, обаче, е умерен и дългосрочният му ефект остава спорен [Medscape]. Разглеждат се възможни стратегии за потискане на *FGFR3*-сигнализацията. Наскоро бяха открити малки химични съединения, които имат действие на антагонист

на *FGFR3*. Токсикологичните профили на тези съединения, обаче, остават предимно неясни.

Най-обещаващата досега терапия за лечение на Ахондроплазия е използването на стабилизирана форма на натриуретичен пептид от тип С (CNP), наречена VMN-111 [Lorget et al., 2012; Wendt et al., 2015] CNP и неговият рецептор, натриуретичен пептиден рецептор В (Npr2, гуанилил циклаза В) са признати за важни регулатори на надлъжния растеж на костите [Chusho et al., 2001]. При миши модел свръхекспресията на CNP в хрущяла или непрекъснатата интравенозна инфузия на CNP нормализира размера на мишките [Yasoda et al., 2004, 2009], което предполага, че прилагането на CNP е потенциална стратегия за лечение на Ахондроплазия. CNP сигнализира чрез NPR2 в хондроцитите като инхибира сигналния път MAPK на нивото на RAF1 стъпката [Yasoda et al., 2004; Krejci et al., 2005; Geister et al., 2013].

Други терапевтични стратегии, използващи лекарства, е препаратът Меклозин, който е инхибитор на рецептора на H1, използван по принцип за лечение на нескелетнозасягащи заболявания. В различни клетъчни линии Меклозин е в състояние да стимулира пролиферацията и диференциацията на хондроцитите и да атенюира ERK1/2 фосфорилирането [Matsushita et al., 2013] (Фигура 18). В *ex vivo* култура, Меклозин увеличава надлъжния растеж на ембрионалните нормални тибии. Пероралното приложение на Meclozine при миши модели увеличава надлъжния растеж на костите, но не успява да увеличи размера на foramen magnum и лумбалния спинален канал [Matsushita et al., 2015].



**Фигура 18.** Схематично представяне на действието на CNP и Меклозин (антагонисти на FGFR3).

Website: <http://www.growingstronger.org/>

## **2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

### **2.1. ЦЕЛ**

Целта на настоящия дисертационен труд е изработване на молекулярно-генетичен подход за анализ на гените *FGFR2*, *FGFR3*, *COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1* и *COL11A1* за диагностика на заболявания с нарушения в скелетната или в съединителната тъкан. Оценка на генотип-фенотипни корелации.

### **2.2. ЗАДАЧИ**

1. Въвеждане и оптимизиране на молекулярно-генетичен подход за идентификация на патологични варианти в гените *FGFR2*, *FGFR3*, *COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1* и *COL11A1*.
2. Подбор на група пациенти с клинична диагноза скелетна дисплазия нарушение в съединителната тъкан, за извършване на генетични изследвания.
3. Снемане на фамилна анамнеза.
4. Провеждане на молекулярно-генетичен анализ при пациенти с клинична диагноза, потенциално асоциирана с генетични варианти в гените *FGFR2*, *FGFR3*, *COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1* и *COL11A1*.
5. Провеждане на пренатален молекулярно-генетичен анализ при фамилна обремененост или ултразвукови данни за скелетни или съединителнотъканни малформации, посредством таргетен скрининг по дължината на конкретен ген.
6. Сравняване на откритите генетични варианти в изследваните гени с публикуваните в световните бази данни.
7. Търсене на генотип-фенотипни корелации с цел прогнозиране хода на развитие на заболяванията.
8. Обобщение на получените резултати.

### 3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ

В рамките на настоящия дисертационен труд бяха проведени молекулно-генетични изследвания върху общо **75** пациента. На базата на клиничните данни те бяха групирани както следва:

#### Група 1:

##### **41 пациенти с предполагаема диагноза скелетна дисплазия**

При тази група пациенти бяха извършени изследвания върху гените *FGFR2* и *FGFR3*. Разпределението на изследваните пациенти по предполагаема диагноза и изследван ген е представено в Таблица 8. Генът *FGFR3* беше изследван при 35 пациенти, а генът *FGFR2* беше изследван при 6 пациенти.

#### Група 2:

##### **25 пациенти с предполагаема диагноза, свързана с нарушения в съединителната тъкан**

При пациентите с колагенози бяха извършени изследвания в гените *COL1A1*, *COL1A2*, *COL11A1* и *COL2A1*. Разпределението на изследваните пациенти по предполагаема диагноза и изследван ген е представено в Таблица 8. Гените *COL1A1* и *COL1A2* бяха изследвани при 23 пациенти, а гените *COL11A1* и *COL2A1* бяха изследвани при 2-ма пациента.

#### Група 3:

##### **9 случая за дородова диагностика**

Генетични изследвания след инвазивна процедура бяха извършени при 9 фетуса по повод УЗ данни за вродени скелетни аномалии или фамилна анамнеза.

**Таблица 8.** Разпределение на пациентите по предполагаема диагноза и изследвани гени

Предполагаема диагноза	Брой изследвани пациенти	Изследван ген
Ахондроплазия	23	<i>FGFR3</i>
Хипохондроплазия	10	
Синдром на Muenke	2	
Apert синдром	6	<i>FGFR2</i>
Osteogenesis imperfecta	23	<i>COL1A1</i> и <i>COL1A2</i>
Marshall - Stickler синдром	2	<i>COL11A1</i> и <i>COL2A1</i>
УЗ данни за скелетни аномалии или фамилна история	9	<i>FGFR3</i>

### 3.1 БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ

За целите на молекулярно-генетичните изследвания беше изолирана високомолекулна ДНК от венозна кръв, от хорионни въси и от амниотична течност.

### 3.2. МЕТОДИ

#### 3.2.1. ПРЕДНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА МАТЕРИАЛА

#### 3.2.2. ИЗОЛИРАНЕ НА ВИСОКОМОЛЕКУЛНА ДНК ОТ ВЕНОЗНА КРЪВ ПО СОЛЕВИ МЕТОД

Принцип:

- ✓ Разрушаване на червените кръвни клетки
- ✓ Утаяване на ядрените клетки
- ✓ Разрушаване на ядрените клетки и на ядрената мембрана
- ✓ Преципитация на белтъците
- ✓ Преципитация на ДНК

Процедура:

*Лизиране на еритроцитите и утаяване на ядрените клетки:*

- ✓ 10 ml венозна кръв
- ✓ Добавят се 30 ml студен лизиращ буфер
- ✓ Инкубира се за 30 мин. на 4°C
- ✓ Центрофугира се 15 min при 3000rpm
- ✓ Супернатантата се отлива
- ✓ Епруветките се отцеждат върху филтърна хартия
- ✓ Утайката се ресуспендира в 10 ml студен лизиращ буфер и се центрофугира още веднъж при същите условия.

*Лизиране на ядрените клетки:*

- ✓ Утайката се ресуспендира в 5 ml SE буфер
- ✓ 25 ml протеиназа К (10mg/ml) и 250 ml 10% натриев додецил сулфат (SDS)
- ✓ Инкубира се на 37°C за цяла нощ или на 55°C за 5 часа

*Утаяване на белтъците:*

- ✓ След протеолизата се добавят 1.4 ml преситен (6M) натриев хлорид (NaCl)
- ✓ Центрофугира се 15 min на 3000rpm

*Преципитация на ДНК:*

- ✓ Надстоящата течност, съдържаща ДНК, се отлива внимателно в нова епруетка
- ✓ Добавя се ледено студен абсолютен етанол
- ✓ ДНК се обира със стерилна (обгорена) пастърка и се промива в 70% етанол
- ✓ Изсушава се
- ✓ Разтваря се 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 - 25mM 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

### **3.2.3. ИЗОЛИРАНЕ НА ВИСОКОМОЛЕКУЛНА ДНК ОТ ХОРИОННИ ВЪСИ И АМНИОТИЧНИ КЛЕТКИ ЧРЕЗ ИЗПОЛЗВАНЕ НА ХЕЛЕКС 100 (CHELEX®100)**

Chelex®100 е смола, състояща се от хополимери на стирен дивинилбензен, сдвоени с иминодиацетатни йони, които действат като хелатори за свързване на поливалентни метални йони. Chelex®100 има висока селективност към двувалентни йони и не променя концентрацията на неметални йони. Методът на изолиране на ДНК с Chelex® е по-бърз, лесен в сравнение с останалите методи, намален е и рискът от замърсяване на пробите, тъй като целият протокол се осъществява в една епруветка.

#### **Стъпки:**

1. Утаяване на амниоцитите/оценка и пречистване на биологичния материал.
2. Инкубация с Chelex®100 и протеиназа К.

**Утаяване на амниоцитите:** Материалът от амниоцентезата се прехвърля в епруветка и се центрофугира 15 мин (6000 rpm) с цел събиране на амниоцитите в утайка.

#### **Оценка и пречистване на биологичния материал:**

Оценката на биологичния материал се извършва под светлинен микроскоп, с помощта на който се взима материал само от хориона.

#### **Инкубация с Chelex®100 и протеиназа К**

Отстранява се цялата супернатанта и се работи с утайката, която се ресуспендира в 150-200 µl 5% разтвор на Chelex®100 и 20 µl протеиназа К, вортексират се и се поставя в термостат на 56°C за цяла нощ. Следва стъпка на денатурация за 10 минути на 96°C, след което материалът се охлажда на стайна температура за 10-15 минути и се центрофугира за 10 минути на максимални обороти, с цел утаяване на смолата. За последващите анализи се използва супернатантата, в която е разтворена ДНК.

*Апаратура:* Термоблок Bioer HB-A100-НН; PCR бокс Telstar MiniV/PCR; ламинарен бокс; микроцентрофуга Eppendorf AG Mini Spin 22331 Hamburg

### **3.2.4. ОЦЕНКА НА ИЗОЛИРАНИЯ МАТЕРИАЛ**

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

## **3.3 АНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА МАТЕРИАЛА:**

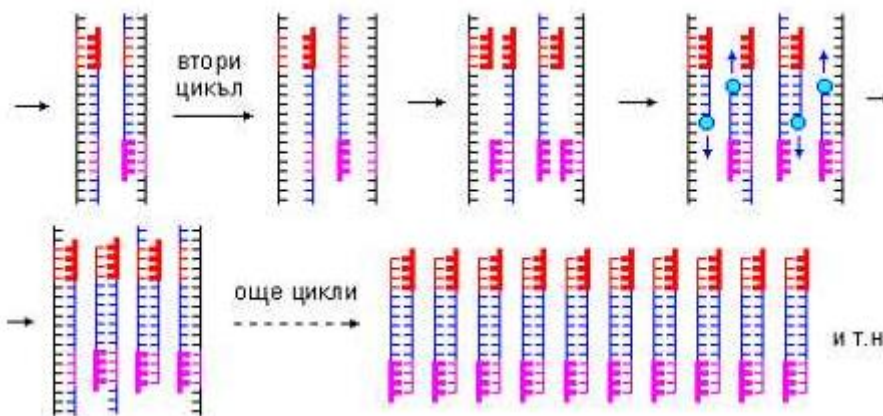
### **3.3.1. ПОЛИМЕРАЗНА ВЕРИЖНА РЕАКЦИЯ (POLYMERASE CHAIN REACTION; PCR) НА СЛЕДНИТЕ ГЕНИ: *FGFR2*, *FGFR3*, *COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1* И *COL11A1*.**



Полимеразната верижна реакция представлява *in vitro* намножаване на ДНК фрагменти с помощта на специфични праймери и Таq полимераза. Същността на PCR техниката е директно амплифициране на специфичен участък от

ДНК. Геномната ДНК се денатурира, при което се получават едноверижни фрагменти.

Полимеразната верижна реакция е циклически процес - редуват се етапи на денатурация на ДНК,



на ДНК, комплементарно свързване (анилинг) на праймерите към ДНК матрицата и синтез на нови вериги.

Денатурацията се извършва при 94°C. Оптималната температура за синтез с Таq –

полимеразата е 72°C. Температурата на анилинг (хибридизация) се определя конкретно за всяка двойка праймери и зависи от тяхната дължина и нуклеотиден състав. Продължителността на всеки от етапите, както и броят на циклите зависят от нуждите на експеримента, дължината и специфичността на амплифицирания участък и конкретните изисквания на праймерите.

За нуждите на сегашното изследване е използван тристъпален PCR. Оптимална програма за провеждане на PCR за получаване на специфичен продукт е представена в таблица 9.

**Таблица 9.** Оптималната програма за провеждане на PCR на екзони от *FGFR3*, *FGFR2*, *COL1A1*, *COL1A1*, *COL11A1* и *COL2A1*.

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	94°C	5 min	1
Денатурация	94°C	45 sec	30
Хибридизация на праймерите	60°C	45 sec	
Синтез на нова верига	72°C	1 min	
Краен синтез	72°C	4 min	1

### 3.3.2. Електрофореза за оценка на качеството и количеството на амплификационния продукт в агарозен гел

Количеството и качеството на получените амплификационни продукти чрез PCR се контролира посредством агарозна гел-електрофореза. Използва се 2-3% агарозен гел и хоризонтална електрофорезна система, като пробите се разделят 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% фикал

**Използвана апаратура:** ваничка за изливане на агарозен гел (2500x1800mm); стартови гребени с размер 2x22 бр., размери на ямките 5x4x1mm; multisub choice хоризонтална електрофореза и powergro3amp захранващо устройство, 300 v.

### 3.3.3. СЕКВЕНИРАНЕ ПО SANGER С ФЛУОРЕСЦЕНТНО БЕЛЯЗАНИ ДИДЕЗОКСИ НУКЛЕОТИДИ

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 дидеоксинуклеотиди са флуоресцентно белязани, поради което се осъществява лазерна детекция. Всеки от четирите дидеоксинуклеотида (ddG, ddA, ddT и ddC) е белязан с два флуорофора – флуоресцин и един от четирите типа родамин. Флуоресцинът има висок екстинкционен коефициент 488 nm. (това е и дължината на вълната, емитирана от аргоновия лазер, който се използва в автоматичните секвенатори). Играейки ролята на донор, флуоресцинът поглъща енергията на лазерния лъч и я прехвърля към акцепторния родамин върху същата молекула. Всеки от четирите акцептора емитира светлина с определена дължина на вълната, която се детектира от апарата и така се идентифицира съответният нуклеотид.

#### **Процедура:**

- ✓ Намножаване на желанния ДНК фрагмента чрез PCR;
- ✓ Пречистване на намножения продукт;
- ✓ Провеждане на секвенционна реакция;
- ✓ Преутаяване на секвенционния продукт;
- ✓ Разтваряне на секвенционния продукт и електрофоретично
- ✓ Разделяне;
- ✓ Визуализиране на резултатите.

**Намножаване на желанния ДНК фрагмента чрез PCR (виж т.3.3.1)**

**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 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, процедурата е бърза и лесна за изпълнение.

**Техника:**

В епруветка тип Eppendorf от 0.5 ml се смесват 1.5  $\mu$ l амплификационен продукт и 0.5  $\mu$ l ExoSAP-IT.

Инкубира се на 37<sup>0</sup>C за 30 min, след което реакцията се спира чрез инактивиране на ензимите на 80<sup>0</sup>C за 15 min.

Така пречистената матрица може да се съхранява на -20<sup>0</sup>C.

**Провеждане на секвенционна реакция:**

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

**Техника:**

- ✓ Към пречистената матрица се добавят 0.3  $\mu$ l праймер с концентрация 10pM/ $\mu$ l, 2  $\mu$ l 5x секвенционен буфер, 1  $\mu$ l кит BigDyeTerminator v.3.1, бидестлирана вода докраен обем 10  $\mu$ l.
- ✓ Програмата за провеждане на секвенционната реакция е:
- ✓ Денатурация – 95<sup>0</sup>C – 20 sec;
- ✓ Хибридиране на праймера – 50<sup>0</sup>C – 15 sec;
- ✓ Синтез на верига – 60<sup>0</sup>C – 3 min.
- ✓ Този цикъл се повтаря 25 пъти.

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

**Преутаяване на секвенционния продукт:**

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

**Техника:**

- ✓ Към секвенционната проба се добавят по 1/10 от обема 1.5M натриев ацетат с рН>8/250mM EDTA буфер и се размесва добре чрез неколккратно пипетиране
- ✓ Добавя се 80  $\mu$ l студен абсолютен етанол и се вортексира.
- ✓ Центрофугира се за 15 мин при 12 000 rpm.
- ✓ Супернатантата се отстранява внимателно.

- ✓ Утайка се промива с 200 µl 80% етанол, вортексирт се и се центрофугиран за 10 мин при 12 000 rpm. Супернатантата се премахва.
  - ✓ 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 вече утайки се добавят 12 µl Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, FosterCity, CA, USA)
- ✓ Вортексирт се и се денатурира за 5 min на 94°C
- ✓ Прехвърля се на лед за 5 мин.

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 ABI310 Data Collection Software v2.1 и се анализират посредством програмата ABI310 Sequencing Analyzer 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.

**МУЛТИПЛЕКСНА ЛИГАЗНО-ЗАВИСИМА АМПЛИФИКАЦИЯ (MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION, MLPA)**

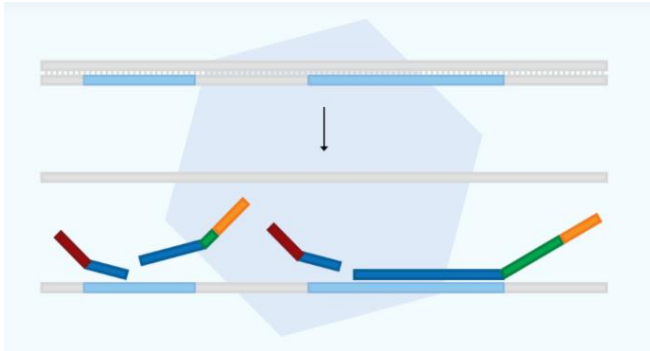
Multiplex ligation-dependent probe amplification - MLPA® е мутиплексен PCR метод за детекция на промени в броя на генните копия, може да отчита повишен брой копия до 50 различни геномни ДНК или РНК секвенции, които могат да се различават само по един нуклеотид.

MLPA-реакцията може да се раздели на 5 основни стъпки:

1. Денатурация на ДНК и хибридизация с MLPA пробите
2. Реакция на лигиране
3. PCR реакция
4. Разделяне на амплификационните продукти чрез електрофореза
5. Анализ на резултатите

По време на първата стъпка, ДНК се денатурира и инкубира за една нощ със смес от MLPA проби. MLPA пробите се състоят от два отделни олигонуклеотида, всеки от които е една от PCR праймерните секвенции. Двата олигонуклеотида хибридизират към съседни таргетни секвенции.

Стъпка 1: Денатурация и хибридизация на пробите

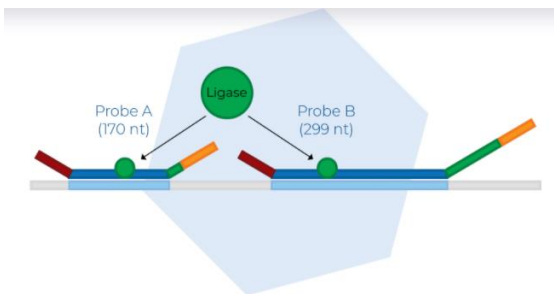


### Денатурация на ДНК

Хибридиране на двете праймерни секвенции

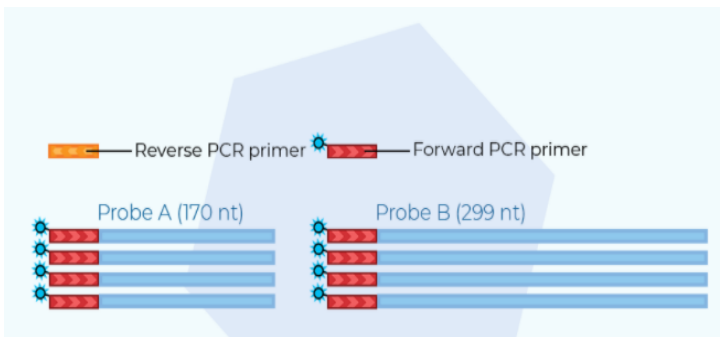
Само когато и двете олигонуклеотидни проби се хибридизират към близко разположените им таргетни секвенции, те могат да бъдат лигирани чрез реакция на лигиране.

Стъпка 2:



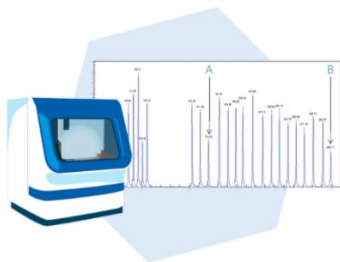
### Лигиране на пробите

Стъпка 3: Намножаване на продуктите



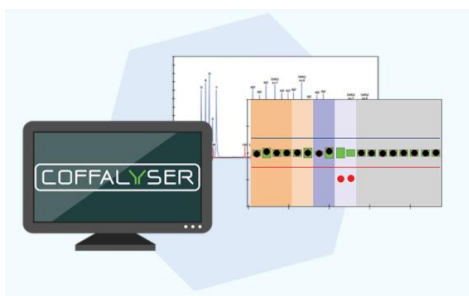
В третия етап лигираните сонди се амплифицират в мултиплексен PCR, използвайки единична универсална двойка праймери. Експоненциално се размножават само лигираните сонди.

Стъпка 4: Разделяне на амплификационните продукти чрез електрофореза



PCR продуктите се зареждат в **апарат** за капиллярна електрофореза и се разделят по дължина. Всеки фрагмент съответства на специфична MLPA сонда.

Стъпка 5: Анализ на резултатите



Последната стъпка е анализ на данните от Coffalyser.Net. Относителният брой копията се определя чрез сравняване на относителните височини на пиковете на референтните сонди и целевите сонди в тестовите проби с тези в референтните проби с известен нормален брой копия.

Китът MLPA, който беше използван, е SALSA MLPA P374 микроделеционни синдроми.

### 3.3.4. КАРИОТИПИРАНЕ

Кариотипирането е метод от класическата цитогенетика, който се използва и е верифициран повече от 50 години и остава ключов метод за диагностика на хромозомни аномалии. Представлява микроскопски метод, чрез който се анализира генетичния материал на хромозомно ниво, като се следи дали има отклонения в броя и структурата на хромозомите. Анализът се извършва на ниво метафаза, тъй като само в тази фаза на деленето хроматинът е достатъчно компактизиран, за да се визуализират хромозомните структури. Има няколко стъпки за обработка на пробата преди започване на същинския анализ на хромозомите. Тези стъпки ще се разгледат подробно по-долу (Фигура 17).

#### **Принцип на кариотипирането**

Принципът на кариотипирането включва култивиране на РНА (фитохемаглутинин) стимулирани лимфоцитни клетки от периферна кръв в *in vitro* среда.

Извършва се кариотипиране на култивирани лимфоцити от периферна кръв, използвайки Lymphogrow комплексна среда за лимфоцитни клетки, следвайки стандартен протокол с Colcemid (при крайна концентрация от 0.1 µg/ml) и фиксатор (прясно приготвен от 3 части метанол и 1 част оцетна киселина).

#### **Преданалитична обработка на материала:**

За култивиране на лимфоцитните клетки е необходимо 3 ml венозна кръв взета във вакутейнер с антикоагулант литиев или натриев хепарин. Съхранение на пробата до нейното култивиране се извървява на 4°C.

#### **Култивиране на пробата:**

- ✓ Към 5 ml Lymphogrow комплексна среда се добавят 1.5 ml кръв в специални лабораторни съдове, наречени матраци за култивиране.
- ✓ Поставят се на 37°C за 72 часа – необходимо време за достигане на метафазна пластинка.
- ✓ На 72-рия час към пробите се добавя 10 ml Colcemid, който влияе на делителното вретено, като го разрушава и се прекратява по-нататъчното делене на клетките. Необходимото време за действие на Colcemid е 30 минути.
- ✓ Пробите се петрофугират на 800 оборота за 10 минути.

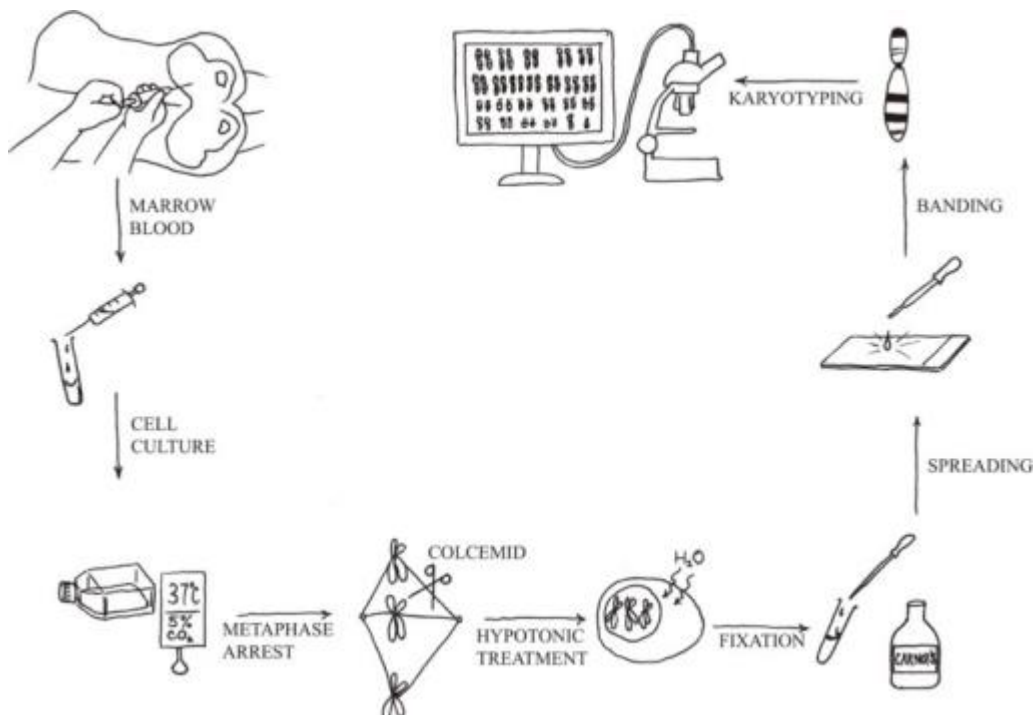
- ✓ Приготвяне на хипотоник (KCl) 0.075 M
- ✓ Пробите се вортексират и се поставят в термостат за 10 минути на 37°C.
- ✓ Центрофугиране на 1000 оборота за 10 минути
- ✓ Приготвяне на пресен фиксатор от 3 части леден метанол и 1 част оцетна киселина.
- ✓ Прибавяне на 12 ml фиксатор към всяка проба.
- ✓ Центрофугиране на 1000 оборота за 10 минути
- ✓ Стъпки 9 и 10 се повтарят още два пъти.
- ✓ Накапване на суспензията на предметни стъкла.

### **Подготовка на препаратите за анализиране**

Оцветяване на вече пригответените предметни стъкла: За да могат да се визуализират и разпознаят двойките хромозоми под микроскоп, е необходимо специфично оцветяване по Gimsa (G-Banding оцветяване). Метафазните хромозоми се третират с ензим - трипсин и се оцветяват с Giemsa боя. Хетерохроматиновите области, които са богати на аденин и тимин (AT-богата) и относително бедни на гени, се оцветяват по-тъмно при G-бендинга. За разлика от това, по-малко кондензираният хроматин (еухетерохроматинът), който е богат на гуанин и цитозин (GC-богат) и по-транскрипционно активен, съдържа по-малко Giemsa и тези области се визуализират като по-светли ленти в G-бендинга. Всяка от лентите е номерирана на всяко рамо на хромозомата от центромерата до теломера. Тази система за номериране позволява локализиране на ленти и гени по дължината на хромозомата.

### **Анализиране на пробите**

Готовите препарати се оглеждат на микроскоп и се заснемат с помощта на автоматизирана система и софтуер за кариотипиране на човешки хромозоми Lucia Karyo Software.



**Фигура 19.** Провеждане на цитогенетиюен анализ от вземане на пробата до анализа

### **3.3.5. ПРОВЕЖДАНЕ НА ARRAY-CGH АНАЛИЗ ПРИ ПОДБРАНИ ПАЦИЕНТИ В КОЛАБОРАЦИЯ С DIJANA PLASESKA-KARANFILSKA,MD, ACADEMY OF SCIENCES AND ARTS RESEARCH CENTRE FOR GENETIC ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY "GEORGI D. EFREMOV", SKOPJE REPUBLIC OF MACEDONIA**

Основните стъпки при методиката на array-CGH анализ включват:

✓ **Подготвяне на пробите**

Измерване на концентрацията и чистотата на пробите спрямо TE буфер.

✓ **Провеждане на рестрикция**

Следва се протокол за приготвяне на общ микс за рестрикция, като се спазват условията 2ч/37<sup>0</sup>C, 20 мин/65<sup>0</sup>C инактивиране.

✓ **Белязане на пробите**

Пробите се разделят на две групи - пациенти и контроли, като се бележат с различен цвят.

✓ **Пречистване**

Използват се пречистващи колонки.

✓ **Хибридизация**

Пробата и съответната контрола се смесват.

Към всеки микс (проба+контрола) се добавят 5 µl Human-Cot1\_DNA1µl ,10x blocking agent, 55 µl hybridization buffer.

Денатуриране.

Подготовка на Gasket-Slide.

Цялото количество проба се нанася в средата на стъклото под формата на капка.

Готовата система се слага в предварително затоплена хибридизационна камера на 65<sup>0</sup>C за 24 h.

✓ **Промиване на Array-slides**

Приготвят се два броя вани в WB1 буфер, темперирани на 37<sup>0</sup>C.

Стъклата се поставят във ваната под буфера и за 5 мин. се включва бъркалката на 400 грт.

След това се потапят във втората вана с топъл WB2 буфер за 1 мин. на 37<sup>0</sup>C.

Слайдовете се поставят в черните кутии на скенера и се пускат за сканиране.

✓ **Сканиране на слайдовете**

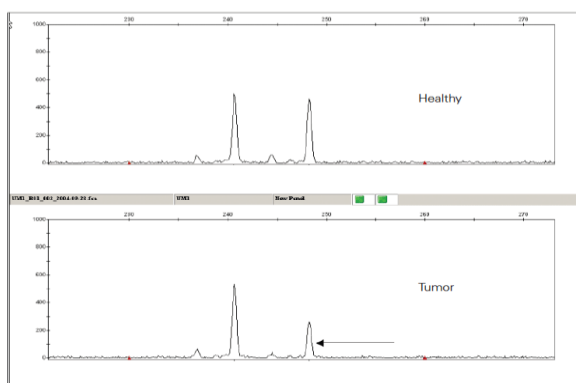
### **3.3.6. ПРОВЕЖДАНЕ НА ЦЯЛОСТНО ЕКЗОМНО СЕКВЕНИРАНЕ (WES) ПРИ ПОДБРАНИ ПАЦИЕНТИ В КОЛАБОРАЦИЯ С PROF. BORUT PETERLIN, CENTRE FOR MENDELIAN GENOMICS |CLINICAL INSTITUTE OF MEDICAL GENETICS, LJUBLJANA, SLOVENIA.**

Основните стъпки при методиката на NGS анализа са:

- ✓ Създаване на библиотека: Библиотеката се създава чрез използване на случайна фрагментация на ДНК, последвано от лигиране с линкери.
- ✓ Амплификация: библиотеката се амплифицира, използвайки PCR амплификация.
- ✓ Секвениране: ДНК се секвенира, като се използва един от няколко различни подхода: пиросеквениране или секвениране чрез лигиране (SOLiD).
- ✓ Обработка на получените данни чрез специализиран софтуер (GensearchNGS-PhenoSystems).

### 3.3.7. QUANTITATIVE FLUORESCENCE PCR (QF-PCR)

Относителното флуоресцентно количествено определяне (или количествена флуоресцентна PCR (QF-PCR) е техника, използвана за анализ на фрагменти, които изискват точни сравнения на височината на пика в множество проби. Приложенията, които използват тази техника, включват скрининг за загуба на хетерозиготност (LOH) с помощта на микросателити или SNP, тестове за анеуплоидия и откриване на големи хромозомни делеции. (Фигура 20).



**Фигура 20.** Електроферограма за откриване на загуба на хетерозиготност (LOH) на микросателитен маркер в ДНК от здрава (горен панел) и туморна проба (долен панел), направена на генетичен анализатор от серия 3130 на Life Technologies. Намалената височина на пика в туморната проба показва потенциален LOH в пробата.

### 3.3.8. ОЦЕНКА НА НУКЛЕОТИДНАТА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТ НА РАЙОНА ОКОЛО МЯСТОТО НА ВЪЗНИКВАНЕ НА ОТКРИТИТЕ ПАТОЛОГИЧНИ ГЕНЕТИЧЕНИ ВАРИАНТИ

### 3.3.9. ОЦЕНКА НА ПАТОГЕННОСТТА НА ОТКРИТИТЕ НУКЛЕОТИДНИ ЗАМЕНИ С ПОМОЩТА СОФТУЕР ЗА МАТЕМАТИЧЕСКА ОБРАБОТКА (POLYPHEN-2 PREDICTION OF FUNCTIONAL EFFECTS OF HUMAN NSSNPS), КОЙТО ПРОГНОЗИРА ЕВЕНТУАЛНОТО ВЛИЯНИЕ НА АМИНОКИСЕЛИННАТА ЗАМЯНА ВЪРХУ СТРУКТУРАТА И/ИЛИ ФУНКЦИЯТА НА БЕЛТЪКА.

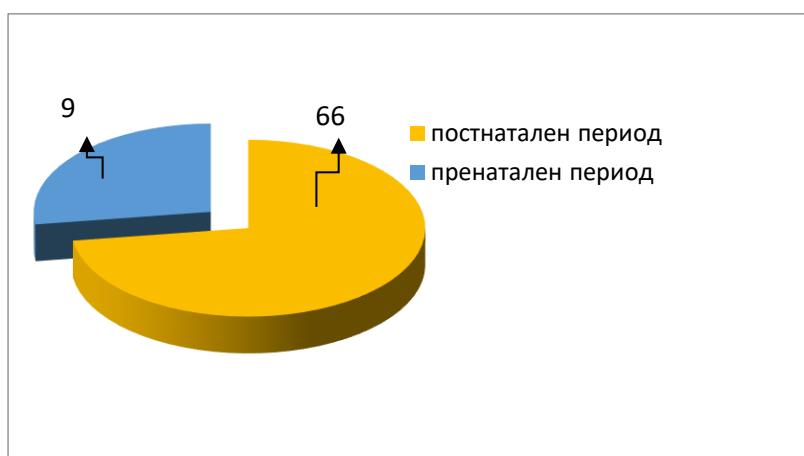
### 3.3.10. ЛОКАЛИЗИРАНЕ ОТКРИТИТЕ МУТАЦИИ И ИЗГРАЖДАНЕ НА 3-D ПРОСТРАНСТВЕНА СТРУКТУРА НА ЗАСЕГНАТИЯ БЕЛТЪК.

## 4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### ИЗВЪРШЕНИ АНАЛИЗИ

Групата от пациенти, която беше обект на молекулярно-генетични изследвания в настоящата научна работа, е предоставена от Генетична Медико-Диагностична Лаборатория „Геника”, гр. София. Общият брой на изследваните пациенти е 75, като на базата на клиничните данни те бяха разпределени в 3 групи: 1) пациенти, насочени с предполагаема диагноза скелетна дисплазия, 2) пациенти с предполагаема диагноза колагеноза и 3) фетуси с ултразвукови данни за скелетни дисплазии и колагенози или бременности с данни за фамилна обремененост.

На фигура 21 е представено разпределението на извършените изследвания с дородова и послеродова диагностика – съответно по УЗ данни и по предварителна клинична анамнеза.



**Фигура 21.**

Разпределение на пациентите, в зависимост от периода, в който са изследвани.

### 4.1. ЗАБОЛЯВАНИЯ С НАРУШЕНИЯ В ХРУЩЯЛНАТА ТЪКАН

На базата на предварителните клинични данни, **постнатално** изследваните 41 пациенти бяха разпределени в 2 групи, в зависимост от подадената клинична анамнеза и изследваните гени (Таблица 10).

**Таблица 10.**

Разпределение на пациентите по гени, групирани по пол и брой.

	Мъжки пол	Женски пол	Общ брой
<i>FGFR3</i>	19	16	35
<i>FGFR2</i>	2	4	6

#### 4.1.1. РЕЗУЛТАТИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНАТА ГРУПА ПАЦИЕНТИ С FGFR3-СВЪРЗАНИ СИНДРОМИ (*FGFR3* - СКЕЛЕТНИ ДИСПАЗИИ):

Фибробластните растежни фактори (FGFs) са част от голямото семейството на полипептидните растежни фактори, които участват в множество процеси в клетката, включително митогенеза и ангиогенеза. FGF рецепторите, какъвто е и *FGFR3* включват в структурата си извънклетъчен домен с 2 или 3 имуноглобулин подобни домена, трансмембранен домен и цитоплазмен тирозин киназен домен.

Генът *FGFR3* беше изследван при 35 пациенти с диагноза ахондроплазия (23 лица), хипохондроплазия (10 лица), синдром на Muenke (2 лица). В хода на проведените молекулярно - генетични изследвания бяха открити точкови мутации при 22 пациенти (63% от изследваните в тази група).

Резултатите са представени по диагнози:

##### 1. АХОНДРОПАЗИЯ

Ахондроплазия е най-честата нелетална скелетна дисплазия с честота 1:20 000 живо родени. Фенотипната изява на заболяването се характеризира с изключително нисък ръст и диспропорция на тялото, без интелектуален дефицит.

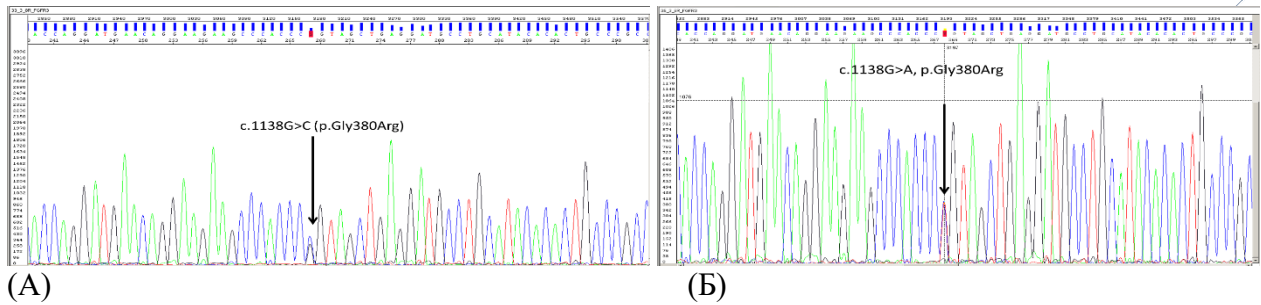
При изследваните 23 пациенти с ахондроплазия бяха открити 2 мутации в екзон 8 на *FGFR3* гена: с.1138G>A; p.Gly380Arg (при 12 от изследваните) и с.1138G>C; p.Gly380Arg (при 2-ма от изследваните). Общо при 14 пациента (~61%) диагнозата ахондроплазия е генетично верифицирана (Таблица 10). При всички доказани случаи нямаше данни за ахондроплазия в семейството и откритите мутации са възникнали *de novo*.

При 9 пациента молекулярният дефект не беше установен, като 8 от тях са с неясна клинична картина, наподобяваща скелетна дисплазия и при тях бяха изследвани само екзоните от *FGFR3* гена, които са горещи мутационни точки, свързани със скелетни дисплазии. Генетичните изследвания в този ген при тях не бяха продължени, поради противоречива клинична симптоматика и те бяха пренасочени към анализ на други гени. Един пациент, насочен с предполагаема клинична диагноза ахондроплазия, беше негативен за мутации във *FGFR3* гена и подлежи на ревизиране на диагнозата, тъй като ахондроплазия беше изключена на генетично ниво.

**Таблица 11.** Резултати от анализ на *FGFR3* гена при пациенти с ахондроплазия и скелетна дисплазия

Пациент №	Ген	Екзон	Нуклеотидна Замяна	Аминокиселинна Замяна	Диагноза
1	<i>FGFR3</i>	8	c.1138G>A	p.Gly380Arg	Ахондроплазия
2	<i>FGFR3</i>	8	c.1138G>A	p.Gly380Arg	Ахондроплазия
3	<i>FGFR3</i>	8	c.1138G>A	p.Gly380Arg	Ахондроплазия
4	<i>FGFR3</i>	8	c.1138G>A	p.Gly380Arg	Ахондроплазия
5	<i>FGFR3</i>	8	c.1138G>A	p.Gly380Arg	Ахондроплазия
6	<i>FGFR3</i>	8	c.1138G>A	p.Gly380Arg	Ахондриплазия
7	<i>FGFR3</i>	8	c.1138G>A	p.Gly380Arg	Ахондриплазия
8	<i>FGFR3</i>	8	c.1138G>A	p.Gly380Arg	Ахондроплазия
9	<i>FGFR3</i>	8	c.1138G>A	p.Gly380Arg	Ахондроплазия
10	<i>FGFR3</i>	8	c.1138G>A	p.Gly380Arg	Ахондроплазия
11	<i>FGFR3</i>	8	c.1138G>A	p.Gly380Arg	Ахондроплазия
12	<i>FGFR3</i>	8	c.1138G>A	p.Gly380Arg	Ахондроплазия
13	<i>FGFR3</i>	8	c.1138G>C	p.Gly380Arg	Ахондроплазия
14	<i>FGFR3</i>	8	c.1138G>C	p.Gly380Arg	Ахондроплазия
15	<i>FGFR3</i>	1-17	-	-	Ахондроплазия
16	<i>FGFR3</i>	4,5,6,8-16	-	-	Скелетна дисплазия
17	<i>FGFR3</i>	4,5,6,8-16	-	-	Скелетна дисплазия
18	<i>FGFR3</i>	4,5,6,8-16	-	-	Скелетна дисплазия
19	<i>FGFR3</i>	4,5,6,8-16	-	-	Скелетна дисплазия
20	<i>FGFR3</i>	4,5,6,8-16	-	-	Скелетна дисплазия
21	<i>FGFR3</i>	4,5,6,8-16	-	-	Скелетна дисплазия
22	<i>FGFR3</i>	4,5,6,8-16	-	-	Скелетна дисплазия
23	<i>FGFR3</i>	4,5,6,8-16	-	-	Скелетна дисплазия

На Фигура 22 са показани секвенционните профили на откритите мутации в *FGFR3* гена c.1138G>A (p.Gly380Arg) и c.1138G>C (p.Gly380Arg), водещи до ахондроплазия.



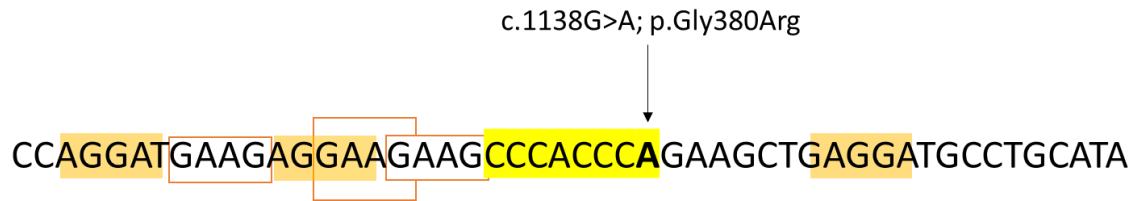
**Фигура 22.** Секвенционен профил на мутациите в екзон 8 на *FGFR3* гена.

- А - Секвенционен профил на мутация c.1138G>A; p.Gly380Arg (секвениране с праймер R).  
 Б - Секвенционен профил на мутация c.1138G>C; p.Gly380Arg (секвениране с праймер R).

Двете открити мутации са добре известни и описани в световната литература. Те са най-честите патологични варианти във *FGFR3* гена, водещи до изява на ахондроплазия. Мутацията c.1138G>A (p.Gly380Arg) е докладвана при над 98% от пациентите, докато c.1138G>C (p.Gly380Arg) се открива при едва около 1% от болните [Rousseau et. al., 1996].

И двете мутации засягат един и същ нуклеотид от кодон 380, който кодира аминокиселината глицин, попадаща в трансмембрания домен на FGF рецептора. И при двете мутации нуклеотидните замени водят до включване на аргинин вместо глицин в бълтъка. Откритите нуклеотидни замени са от два типа: транзиция и трансверзия. Транзицията представлява замяна на един пуринов нуклеотид с друг пуринов нуклеотид (c.1138G>A); трансверзията представлява замяна на пуринов нуклеотид с пиримидинов нуклеотид (c.1138G>C). Трансверзията c.1138G>C е с много по-ниска честота, отколкото транзицията c.1138G>A. Смята се, че това се дължи на факта, че при транзициите се заменят химически еднотипни бази, докато при трансверзиите става замяна на пуринова с пиримидинова база или обратно. Това от своя страна се отразява като промяна в конформацията на ДНК и е предпоставка за по-лесно разпознаване и отстраняване на „грешката“ от поправящите системи. Когато промененият нуклеотид се пропуска от поправящите системи и остава фиксиран в генома като патологична мутация, е логично да се зададе въпросът дали области от околната секвенция не влияят по някакъв начин на ДНК полимеразата, така че тя да допуска грешки или да не може да поправи настъпили грешки. Този въпрос е особено важен, когато става дума за *de novo* възникване на мутации, засягащи един и същи нуклеотид в даден ген. За оценка на ролята на нуклеотидната последователност около мястото на възникване на двата патогенни генетични варианта в *FGFR3* гена, беше разгледана околната секвенция на разстояние 30 нуклеотида в посока 5' и в посока 3' от позиция c.1138 на гена. (Фигура 23).

От интерес бяха нуклеотидни последователности като палиндромии, прави или обърнати повтори, симетрични елементи и други секвенционни мотиви, които биха могли да имат отношение към хода на ДНК полимеразата по време на репликацията.



**Фигура 23.** Анализ на околната секвенция в мястото на мутацията FGFR3:c.1138G>A,p.Gly380Arg.

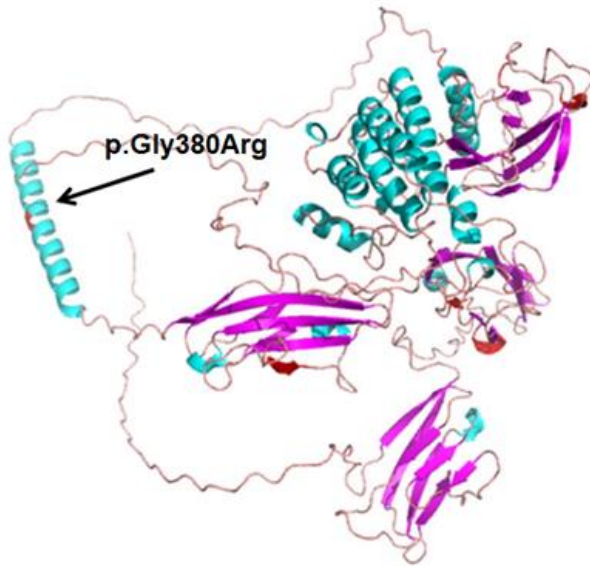
**Легенда:**

Оранжев (защрихован или не) квадрат - перфектни прави повтори

Жълт (защрихован) квадрат - симетричен елемент

След анализ на околната секвенция бяха установени множество перфектни прави повтори, които биха могли да имат отношение към формирането на вторични структури, възпрепятстващи нормалните функции на полимеразата. Прави впечатление наличието на повтарящи се мотиви (AGGA),(GAAG) и в допълнение CCCACCC-симетричен елемент в близост до мутацията. Повтарящите се C-елементи около мястото на възникване на мутацията биха могли да доведат до образуване на вторични вгъвания на веригата, благоприятстващи приплъзването на ДНК полимеразата, при което може да се инкорпорира нуклеотид, идентичен с предходния. Нуклеотидната замяна G>A създава перфектен симетричен мотив CCCACCC. Възникването на мутации в една и съща позиция на гена, като резултат от независими мутационни събития, е възможно да се базира изцяло на особености на околната секвенция [Todorova et. al., 1996].

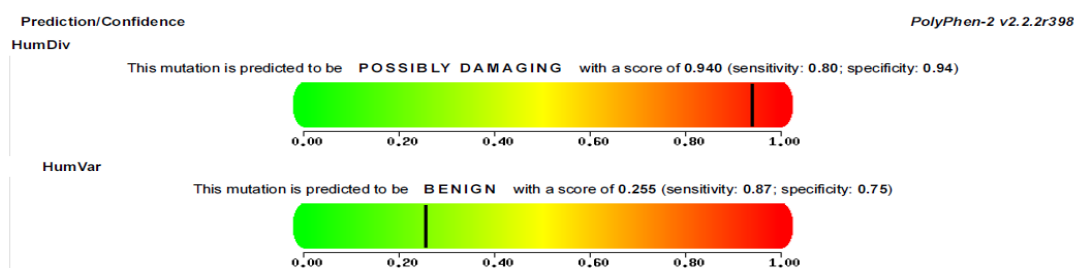
На Фигура 24 е представена пространствена структура на FGFR3 рецептора и мутацията p.Gly380Arg, която попада в алфа-спиралния участък от трансмембрания му домен.



**Фигура 24.** Пространствена структура на протеина на *FGFR3* гена с помощта на AlphaFold2, със стрелка е отбелязано мястото на патологичната мутация, водеща до Ахондроплазия.

Дивият тип аминокиселина е глицин, която няма страничен радикал (един H). Замяната на неполярната аминокиселина глицин с полярната аминокиселина аргинин, която има допълнителна базична група и възможност да участва във формирането на йонни сили на привличане и отблъскване, може да доведе до структурни промени в домена, които влияят на стабилността и активността на рецептора [Vochyńska et al., 2018] Missense мутацията засяга слабо-консервативен участък в домена на *FGFR3* гена. По консервативността на аминокиселината сред видовете може да се съди и за патогенното влияние на мутацията.

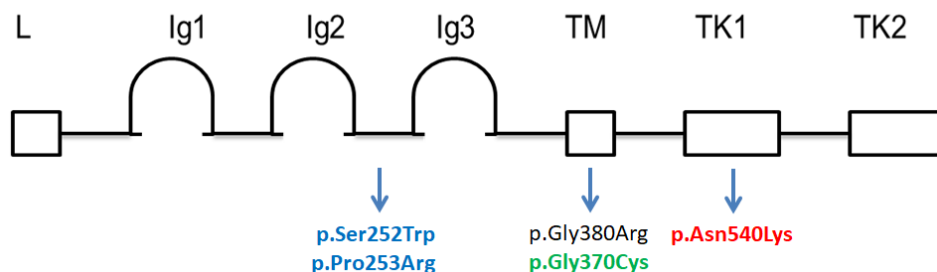
В допълнение, за оценка на патогенността на тази замяна е използван софтуер за математическа обработка (PolyPhen-2 prediction of functional effects of human nsSNPs), който прогнозира евентуалното влияние на аминокиселинната замяна върху структурата и/или функцията на белтъка (Фигура 25). Софтуерът представя резултата под формата на индекс (score), чиято стойност варира от 0 до 1. Score 0 се интерпретира като неутрална замяна, без влияние върху белтъчната функция, докато score 1 се оценява като патогенна замяна.



**Фигура 25.** Резултат от online софтуерния предиктор Polyphen2 за оценка на патогенността на мутацията *FGFR3:p.Gly380Arg*.

Двата използвани математически модела за прогнозиране от Polyphen2 на евентуалното въздействие на заменената аминокиселина, в случая показват различен индекс (съответно 0.940 и 0.255). Резултатът от първия математически модел показва, че вероятността за патогенност е близка до 1, което е максималният индекс за патогенност. Вторият математически модел дава индекс 0.255, който може да бъде интерпретиран по-скоро като запазване на нормалните свойства на белтъка FGFR3 и на функционалната му специфичност. Това разминаване в математическите интерпретации може да се дължи на факта, че в двата модела са заложили различни алгоритми за изчисление, които взимат под внимание различни параметри. Може да се предположи и влиянието на факта, че аминокиселинната последователност в района не е изцяло консервативна. Аминокиселината глицин се среща нормално в тази позиция на протеиновата секвенция на *FGFR3* например при *Canis familiaris*, *Mus musculus*, *Danio rerio*, *Chimpanzee* и др.

Както вече бе споменато, аминокиселината глицин на 380-та позиция попада в района на трансмембрания домен (ТМ) на FGFR3 рецептора (Фигура 26). ТМ домен на *FGFR* е вътреклетъчен домен и функционира чрез димеризация. FGFR3 рецепторът има два киназни домена, които се активират след фосфорилиране. Този процес се осъществява от свързването на FGF лиганди, които стабилизират домена и спомагат за активирането му [Shiang et al., 1994]. В резултат на това фосфорилиране се активира процеса на осификация - превръщане на хрущялната тъкан в костна.



**Фигура 26.** Локализация на известни патологични генетични варианти в FGF рецепторите, асоциирани с различни нарушения в скелетната тъкан.

Тъй като мутацията FGFR3:p.Gly380Arg попада в трансмембрания домен, могат да бъдат формулирани две хипотези относно повишаване активността на рецептора:

1) Настъпилата мутация повлиява димеризацията или фосфорилирането на тирозин-киназните домени в активационната бримка на рецептора. Аминокиселинната замяна вероятно стабилизира рецептора и така увеличава лиганд-независимото му активиране. Така рецепторът е постоянно активен и това води до преждевременно вкостяване на хрущялната тъкан.

2) Мутацията може да се разглежда като Gain-of-function мутация, която води до свръхекспресия на продукта.

Независимо от механизма на действие, мутацията p.Gly380Arg причинява непрекъснато активиране на *FGFR3*, което води до инхибиране на пролиферацията и диференциацията на хондроцитите. При свръхактивиране на сигналния път хондроцитите не могат да пролиферират и диференцират нормално, в резултат на което се образува по-малко количество костна тъкан [Jesse et. al., 2012].

## 2. ХИПОХОНДРОПАЗИЯ

Хипохондроплазията е нелетална скелетна дисплазия с честота 1:40000 живородени. Фенотипната изява на заболяването е по-слабо изразена диспропорция на тялото, нисък ръст и забавено интелектуално развитие.

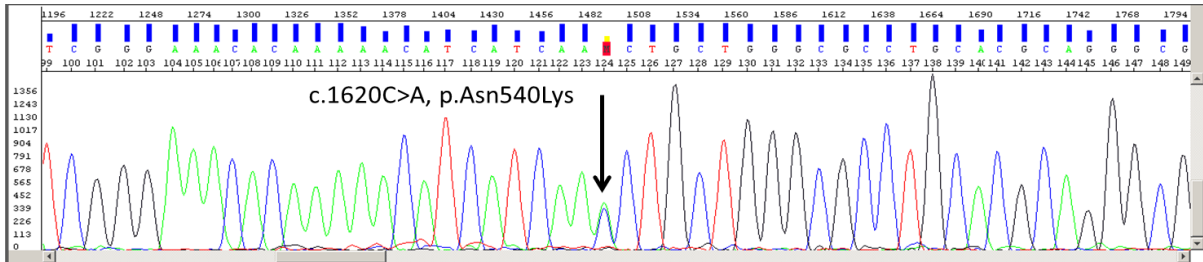
Изследваните пациенти с клинични данни за хипохондроплазия бяха общо 10 и резултатите от извършените анализи са представени в Таблица 13. При 8 от пациентите беше открит патологичния вариант с.1620C>A, p.Asn540Lys в екзон 11 на *FGFR3* гена (Фигура 27), като при всички пациенти липсваха данни за фамилна обремененост.

Двама пациента останаха с неизяснен молекулен дефект след анализ на горещите за мутации региони от *FGFR3* гена. И в двата случая клинична картина е неясна, наподобяваща скелетна дисплазия, поради което по-нататъшното скриниране за мутации в *FGFR3* гена беше прекратено. При тях клиничната диагноза подлежи на ревизиране и насочване към други генетични изследвания.

**Таблица 12.** Резултати от анализ на *FGFR3* гена при пациенти с хипохондроплазия.

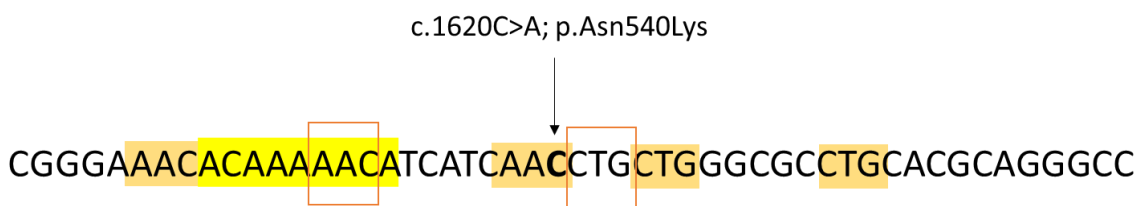
№	Ген	Екзон	Нуклеотидна замяна	Аминокиселинна замяна	Диагноза
1	<i>FGFR3</i>	11	с.1620 C>A	p.Asn540Lys	Хипохондроплазия
2*	<i>FGFR3</i>	11	с.1620 C>A	p.Asn540Lys	Хипохондроплазия
3*	<i>FGFR3</i>	11	с.1620 C>A	p.Asn540Lys	Хипохондроплазия
4	<i>FGFR3</i>	11	с.1620 C>A	p.Asn540Lys	Хипохондроплазия
5	<i>FGFR3</i>	11	с.1620 C>A	p.Asn540Lys	Хипохондроплазия
6	<i>FGFR3</i>	11	с.1620 C>A	p.Asn540Lys	Хипохондроплазия
7	<i>FGFR3</i>	11	с.1620 C>A	p.Asn540Lys	Хипохондроплазия
8	<i>FGFR3</i>	11	с.1620 C>A	p.Asn540Lys	Хипохондроплазия
9	<i>FGFR3</i>	11	-	-	Хипохондроплазия
10	<i>FGFR3</i>	4-6, 8-16	-	-	Скелетна дисплазия

\* еднояйчни близнаци



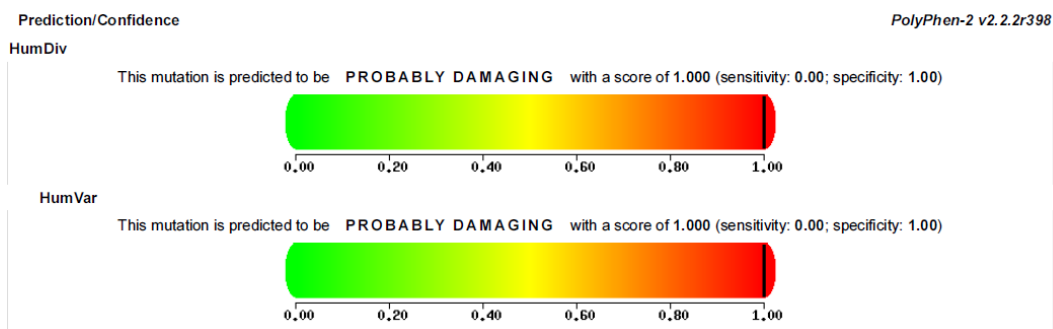
**Фигура 27.** Секвенционен профил на мутацията c.1620C>A; p.Asn540Lys в екзон 11 на *FGFR3* гена

Мутацията c.1620C>A, p.Asn540Lys е разположена в АТР-свързващия сегмент на тирозин-киназия домен на *FGF* рецептора (виж Фигура 26 - отбелязано с червено). По литературни данни този патологичен вариант е един от двата най-често срещани при пациенти с хипохондроплазия. Откритата мутация е от типа трансверзия - замяна на пиримидинов с пуринов нуклеотид. По аналогия с честата мутация при ахондроплазия, беше анализиран района около замяната c.1620C>A. Прави впечатление, че триплета, в който настъпва мутацията, както и нуклеотидната последователност преди нея, са -AAC- богати директни повтори (Фигура 28). Непосредствено преди мутацията има симетричен елемент -АСАААААСА-, отново заграден и от вдете страни с правия повтор -AAC-, като във втория -AAC- триплет настъпва нуклеотидната замяна Освен това, нуклеотидната последователност след замяната е богата на СТG повтори, което допълнително може да влияе на синтезиращата и поправяща активност на полимеразата. Може да се предположи, че тези мотиви се отразяват върху повишената мутабилност на конкретния нуклеотид и оформянето му като гореща мутационна точка, което обяснява и високата честота на възникване на тази мутация. По литературни данни вариантът p.Asn540Lys се среща с честота около 70% при пациенти с клинични данни за хипохондроплазия. Останалите 30% от пациентите остават с неясен генетичен дефект, доказвайки генетичната хетерогенност на заболяването [Song et al., 2012].

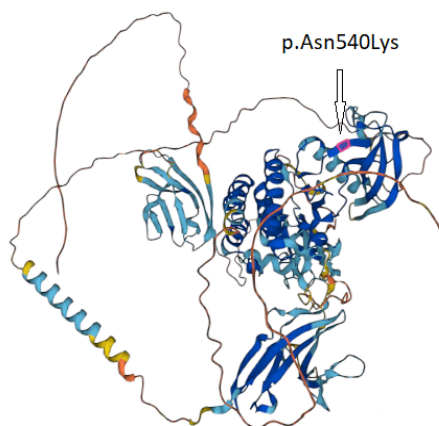


**Фигура 28.** Анализ на региона от *FGFR3* гена, в който попада мутацията c.1620C>A, p.Asn540Lys

За оценка на патогенността на замяната p.Asn540Lys беше използван предиктора PolyPhen2 (Фигура 29А). На същата фигура (Фигура 29Б). е представен и пространствен модел на *FGFR3* рецептора, като мутацията p.Asn540Lys попада в тирозин-киназия домен 1.



А



Б

**Фигура 29.** А-Резултат от online софтуерния предиктор Polyphen2 за оценка на патогенността на мутацията FGFR3:p.As540Lys. Б- Пространствена структура на FGFR3 рецептора, моделирана с помощта на AlphaFold2. Със стрелка е отбелязана мутацията p.As540Lys, водеща до хипохондроплазия.

И двата математически модела за оценка на патогенността на аминокиселинната замяна показват индекс с максимална стойност, което означава висока патогенност на мутацията. Аминокиселината аспарагин се разполага във високо консервативен участък на тирозин-киназия домен на FGFR3 рецептора. Замяната на аминокиселината аспарагин (с амидна група в страничния радикал) с лизин (с амино група в страничния радикал) води до генерирането на допълнителен положителен заряд в този консервативен район, което дава възможност на формиране на нови йонни взаимодействия, конформации и нарушаване на нормалната активност на киназия домен на рецептора.

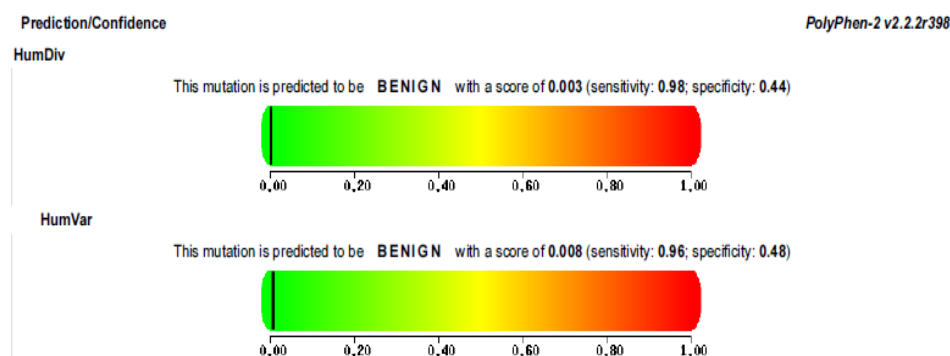
### 3. СИНДРОМ НА MUENKE

Таблица 13. Резултати от анализ на *FGFR3* гена при пациенти със синдром на Muenke.

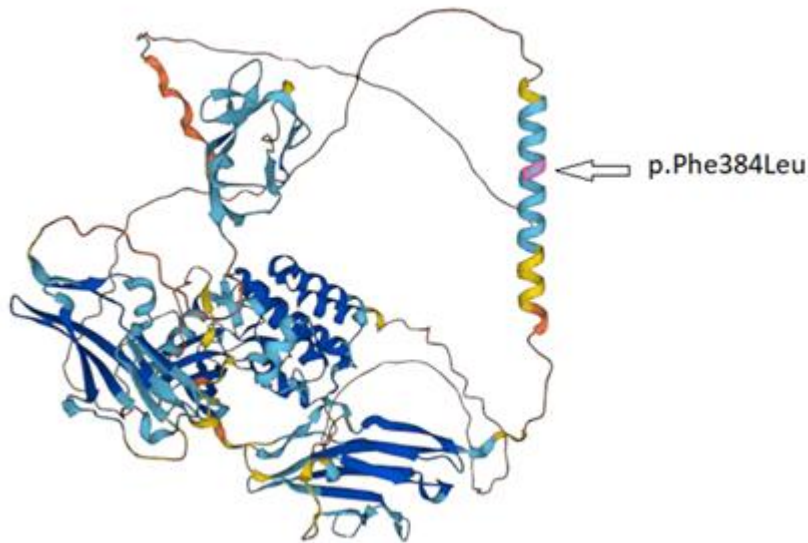
№	Ген	Екзон	Нуклеотидна замяна	Аминокиселинна замяна	Диагноза
1	<i>FGFR3</i>	1-17	с.1150C>T	p.Phe384Leu	синдром на Muenke
2	<i>FGFR3</i>	1-17	-	-	синдром на Muenke

Двама пациента от нашата извадка бяха насочени за генетично изследване с клинична диагноза синдром на Muenke. Има данни, че този синдром се причинява от мутацията с.749C>G, p.Pro250Arg в екзон 6 на *FGFR3* гена. Пациентите бяха изследвани първоначално за тази мутация, но резултатът беше негативен. Впоследствие беше проведено пълно секвениране на гена и при единия пациент беше открита нуклеотидна замяна с.1150C>T, p.Phe384Leu в екзон 8 на *FGFR3* гена. Откритата нуклеотидна замяна променя кодона ТТС, кодиращ аминокиселината фенилаланин (съдържа ароматен пръстен) в СТС, който кодира аминокиселината левцин (неполярна, алифатна аминокиселина). Аминокиселината p.Phe384 се намира в регион от трансмембрания домен на *FGFR3* рецептора, който не се характеризира с висока консервативност. Освен това p.Phe384 се разполага само на три аминокиселинни остатъка от p.Gly380, чиято промяна в аргинин води до ахондроплазия. Поради това очаквахме, че откритият молекулен вариант p.Phe384Leu също ще се окаже патогенен.

За оценка на патогенността на тази замяна беше използван софтуерния предиктор PolyPhen2 (Фигура 30А), който еднозначно оцени откритата замяна като непатогенна (индекси на двата метода за оценка – съответно 0.003 и 0.008).



А



Б

**Фигура 30.** А-Резултат от online софтуерния предиктор Polyphen2 за оценка на патогенността на мутацията FGFR3:p.Phe384Leu; Б- Пространствена структура на FGFR3 рецептора, моделирана с помощта на AlphaFold2. Със стрелка е отбелязана замената p.Phe384Leu.

Направената литературна справка за p.Phe384Leu потвърди, че замената на фенилаланин с левцин в позиция 384 на белтъка няма патогенен ефект и няма отношение към наблюдаваната клинична симптоматика при пациента. В литературата е изказано предположение, че този вариант може да играе ролята на модулатор на фенотипната изява при пациенти със скелетна дисплазия. По-късно тази хипотеза е отхвърлена, тъй като резултатите не доказват такъв модулиращ ефект на замената p.Phe384Leu [Thatiane Yoshie Kanazawa et. al., 2014].

**От молекулна гледна точка патологично увреденият *FGFR3* ген се характеризира с няколко особености:**

Откритите генетични варианти c.1138G>A, p.Gly380Arg; c.1138G>C, p.Gly380Arg и c.1620C>A, p.Asn540Lys във *FGFR3* гена засягат различни екзони и попадат в различни домени на протеина – съответно трансмембрания домен и тирозинкиназияния домен 1 (Фигура 26). Въпреки това, между мутациите p.Asn540Lys и p.Gly380Arg, причиняващи съответно Хипохондроплазия и Ахондроплазия се наблюдават много сходства, свързани с повишената активност на кодирувания рецептор. В резултат краищата на нарастващите кости се вкостяват преждевременно, не могат да нарастват и остават къси – симптоматика, наблюдавана при *FGFR3*-свързаните скелетни дисплазии.

Генът *FGFR3* е засегнат главно от нововъзникнали мутации, дължащи се на повтарящи се независими мутационни събития в определени региони наречени "горещи мутационни точки". Приблизително 80% от пациентите с ахондроплазия и ~80% от пациентите с хипохондроплазия имат родители с нормален ръст и мутацията възниква *de novo*. Смята се, че нововъзникналите мутации преимуществено се свързват с напреднала възраст на бащата (> 35 години) [Penrose et. Al., 1955; Stoll et. Al., 1982]. *De novo* мутации, причиняващи ахондроплазия засягат по-често бащиния алел, в резултат на грешки, настъпили в хода на сперматогенезата [Wilkin et. al., 1998].

### РЕЗУЛТАТИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНАТА ГРУПА ПАЦИЕНТИ С FGFR2-СВЪРЗАНИ СИНДРОМИ (СКЕЛЕТНИ ДИСПАЗИИ *FGFR2*)

*FGFR2*-свързани скелетни дисплазии са група от 8 заболявания с автозомно доминантен тип на унаследяване. Към тях спадат Pfeiffer синдром, Apert синдром, Crouzon синдром, синдром на Beare-Stevenson, *FGFR2*-свързана изолирана коронарна синустоза, синдром на Jackson-Weiss. Най-характерните клинични характеристики за всяко от заболяванията са показани както следва на Таблица 14.

**Таблица 14.** Клинични характеристики при *FGFR2*-свързани скелетни дисплазии

Заболяване	Краниосиностоза	Х-ки на дихателните пътища	Ръце/Крака	Неврологични х-ки
Crouzon синдром	+	Вариабилна среднолицева ретрузия +/- дихателна обструкция	Нормално	Хидроцефалия
Син синдром с акантозис нигриканс (acanthosis nigricans)	+	Вариабилна среднолицева ретрузия +/- дихателна обструкция	Нормално	Хидроцефалия
Apert синдром	+	Средна среднолицева ретрузия Цепнатио небце Зъбни аномалии Обструкция на дихателните пътища	Синдактилия на меки тъкани ± кости Синдактилия	Агнезия на corpus callosum
Pfeiffer синдром	Ини/бикоронарна	Лека до средна ретрузия на среднолицевата част и проптоза Обструкция на дихателни пътища	Брахидактилия Широко, медиално отклонени пръсти	Хидроцефалия
Синдром на Jackson-Weiss	+	Проптоза Средано тежка обструкция на дихателните пътища	Синдактилия Широк, медиално отклонени пръсти	Нормална интелигентност
Синдром на Beare-Stevenson	+	Тежка среднолицева ретрузия Цепнато небце Обструкция на дихателните пътища	Нормално	Хидроцефалия
<i>FGFR2</i> -свързана изолирана коронарна синустоза	+	Тежка среднолицева ретрузия Цепнато небце Обструкция на дихателните пътища	Нормално	Нормално

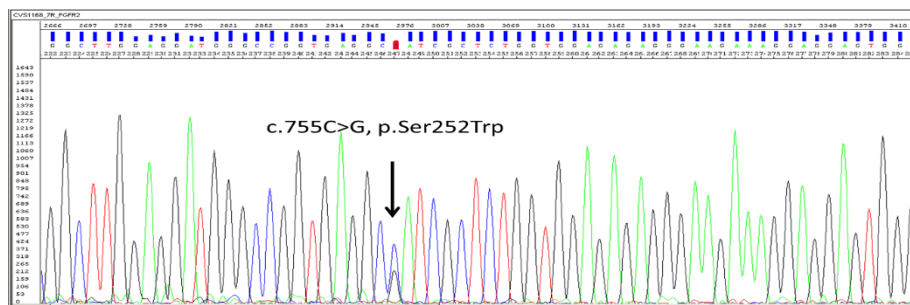
Пациентите, насочени за генетично изследване във връзка с клинични данни за *FGFR2*-свързани синдроми бяха общо 6. В Таблица 15 са показани получените резултати след проведените молекулярно-генетични изследвания.

**Таблица 15.** Резултати от анализ на *FGFR2* гена при пациенти с *FGFR2*-свързани скелетни дисплазии.

№	Екзон	Нуклеотидна замяна	Аминокиселинна замяна	Диагноза
1	7	c.755 C>G	p.Ser252Trp	Аpert синдром
2	7	c.755 C>G	p.Ser252Trp	Аpert синдром
3	1-18	-	-	Скелетна дисплазия
4	1-18	-	-	Скелетна дисплазия
5	1-18	-	-	Скелетна дисплазия
6	1-18	-	-	Скелетна дисплазия

При двама от изследваните пациенти с клинична диагноза Аpert синдром беше открит патологичния вариант c.755C>G, p.Ser 252Trp в екзон 7 на *FGFR2* гена (Фигура 31).

При 4 пациенти с предполагаема клинична диагноза скелетна дисплазия изследването включваше секвениране на всички екзони от *FGFR2* гена, което не доведе до откриването на молекулен дефект. Диагнозата при тези 4 пациента подлежи на ревизиране, тъй като беше изключен Аpert синдром.

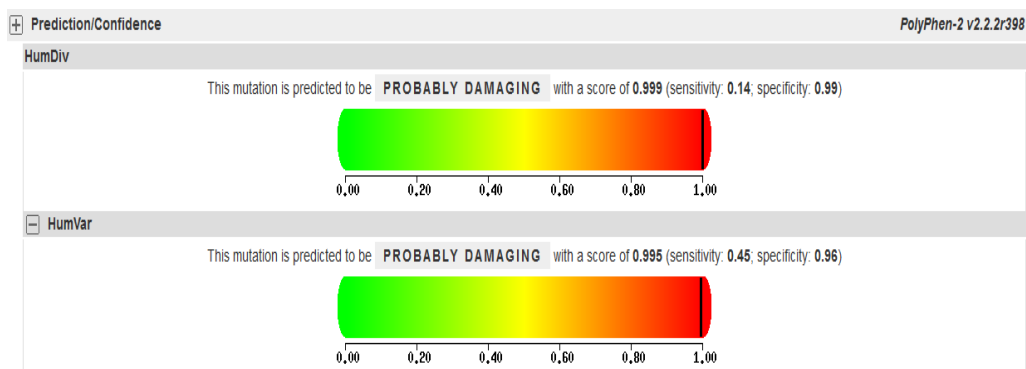


**Фигура 31.** Секвенционен профил на мутацията c.755C>G, p.Ser 252Trp в екзон 7 на *FGFR2* гена при пациент с Аpert синдром

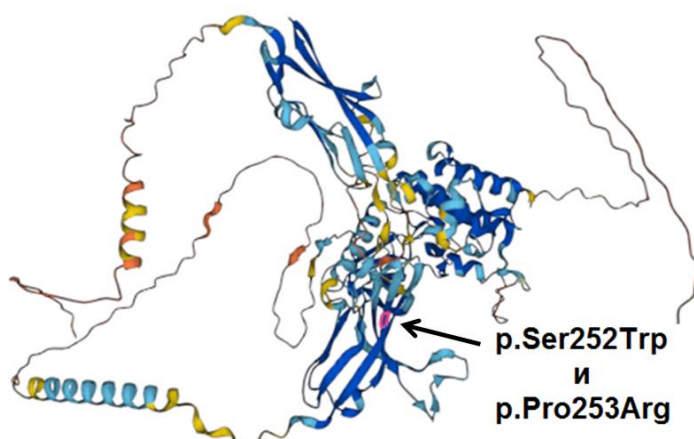
**Синдромът на Аpert** е рядко автозомно-доминантно заболяване, характеризиращо се с краниосиностоза, деформации на крайниците, вродено сърдечно заболяване и други системни малформации, включително и интелектуални затруднения. Откритата при нашите пациенти нуклеотидна замяна c.755C>G, p.Ser 252Trp в екзон 7 на *FGFR2* гена е една от описаните мутации, асоциирани с Аpert синдром. В този екзон по литературни данни са описани две мутации - c.755C>G, p.Ser252Trp, която беше открита при нашите пациенти и c.758C>G, p.Pro253Arg. И двете мутации са от тип



тази мутация по-често се срещат клинични симптоми като цепнато небце, хипоплазия на средната част на лицето, недоразвита горна челюст, очни аномалии, като изпъкнали очи, хипертелоризъм и палпебрални фисури, което се наблюдава и при нашите пациенти (виж Таблица 15). Интелектуален дефицит и синдактилия са по-често срещани при пациенти, носещи другата описана мутация p.Pro253Arg [Faradz et. al., 2013]. Тези резултати предполагат стриктни генотип/фенотип корелации и затова на базата на откритата мутация може да се прогнозира ходът на заболяването.



А



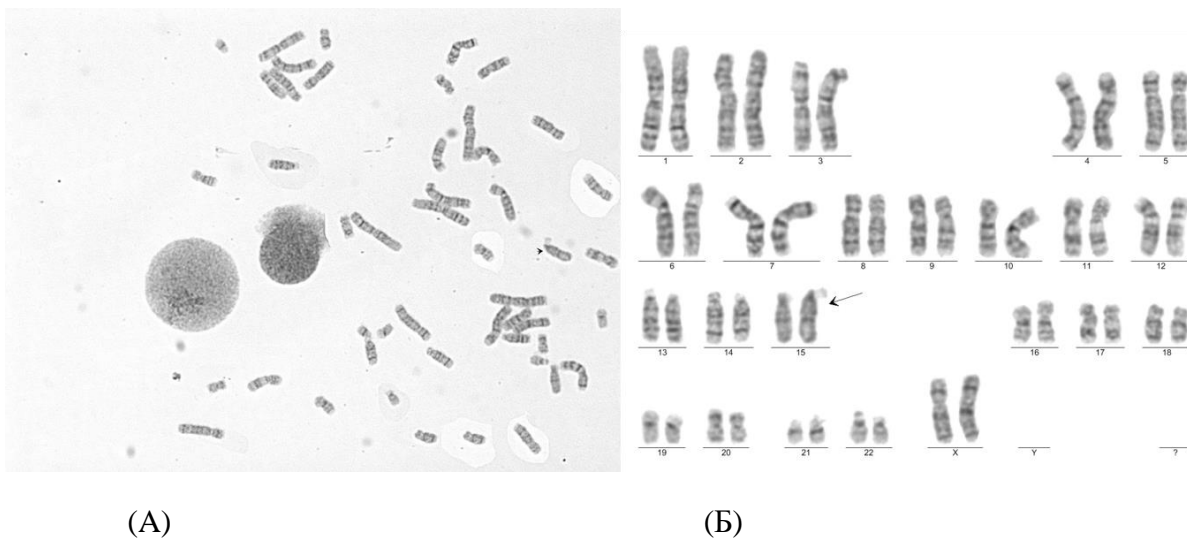
**Фигура 33.** А-Резултат от online софтуерния предиктор Polyphen2 за оценка на патогенността на мутацията FGFR2:p.Ser 252Trp; Б Пространствена структура на FGFR2 рецептора, моделирана с помощта на AlphaFold2 Със стрелка са отбелязани двете замени p.Ser252Trp и p.Pro253Arg, разположени една до друга

## ПАЦИЕНТИ СЪС СКЕЛЕТНА ДИСПЛАЗИЯ И НЕИЗЯСНЕН МОЛЕКУЛЕН ДЕФЕКТ

Б

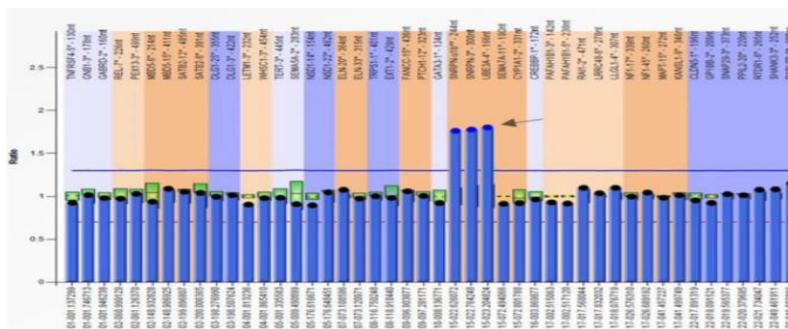
След проведени молекулярно-генетични изследвания върху ген *R3* и *FGFR2* при 15 от пациентите не бяха открити патологични генетични варианти, асоциирани с скелетни дисплазии. При двама от тях извършването на допълнителни генетични изследвания с цел изясняване на клиничната диагноза доведе до откриване на интересни генетични варианти:

Първият пациент първоначално беше насочен с предполагаема клинична диагноза ахондроплазия, но впоследствие диагнозата беше ревизирана. Описани бяха нисък ръст, нестабилна походка, забавено невропсихомоторно развитие, дисморфични черти, микроцефалия и поява на унилатерална хипопигментация. В хода на диагностичното уточняване на пациента, започнаха да се обсъждат нови диагнози, поради комбинацията от дисморфични черти и кожни лезии, една от тях беше хипомеланоза на Ito (ОММ\*300337). На базата на тази информация беше проведено цитогенетично изследване (кариотипиране), при което се откри интересна и непубликувана до момента находка (Фигура 34).



**Фигура 34.** Цитогенетично изследване при пациент с хипомеланоза на Ito (А) Микроскопска снимка на метафазната пластинка, показваща *der(15)(q11.2q13.3)*; (Б) Кариотип на пациента, със стрелка е обозначена откритата *der(15)(q11.2q13.3)*.

Полученият резултат показва патологичен кариотип с допълнителен материал върху дългото рамо на хромозома 15, (15)(q11q13) ленти. За да потвърдим наличието на този допълнителен материал върху дългото рамо на хромозома 15, следващата ни стъпка беше извършването на MLPA анализ. При него беше открито отклонение в броя копия по отношение на сондите, локализирани в таргетния регион 15q11.2 (гени *SNRPN* и *UBE3A*) (Фигура 35)



**Фигура 35.** MLPA профил, указващ допълнителен материал дългото рамо на хромозома 15 в района 15q11.2.



преобразувания са изключително от майчин произход [Pettigrew et.al., 1987; Clayton-Smith et. al.,1993].

Нашата хипотеза е, че откритото хромозомно пренареждане е интерстициална трипликация на областта 15q11.2q13.3, водеща до тетразомия (виж Фигура 37, съотношение алели 3:1). Тетразомията по хромозома 15 (15q11.2– 15q13.3 област) вероятно е много рядко събитие. Доколкото ни е известно, в литературата са съобщени само няколко случая на хипомеланоза на Ito, но те са свързани с други молекулни патологии, които не включват интерстициални трипликации на 15q11 – q13 регион [Holowinsky et. al., 1993, Schinzel et. al., 1994, Crawford et. al., 1995, Cassidy et. Al., 1996, Chadwick et. Al., 1996, Reddy et. al., 2000, Ungaro et.al., 2001, Vialard et.al., 2003, Crolla et.al., 1995, Huang et.al., 1997].

От друга страна, литературната справка показва, че случаите с хипомеланоза на Ito и хипопигментация на кожата са изключително свързани с делеции в този регион (15) (q11.2q13.3) [Hogart et.al., 2010, Turleau et. al., 1986, Pellegrino et. al., 1995]. Трипликации от около 6.8Mb, разположени между повторения BP2 и BP4 на хромозома 15, водят до тетразомия на засегнатия регион [Locke et. al., 2004]. В проксималния край на дългото рамо на хромозома 15 се локализира група от повторения с ниско представени копия (LCR, low copy repeats), разположени в точките на скъсване BP1 – BP5. Тези повтарящи се мотиви опосредстват различни делеции и дупликации чрез алелна нехомоложна рекомбинация [Puјana et.al., 2002]. Откритата дупликация в настоящото проучване се намира в рамките на BP2 - BP3 критичния регион, свързан със синдромите на Prader-Willi / Angelman, и двата причинени от делеции или унипарентална дизомия в целевия регион.

Доколкото ни е известно, това е първият генетично доказан случай на хипомеланоза на Ito, причинен от *de novo* интерстициална 15q11.2q13.3 трипликация. Случаят е публикуван в Journal of Clinical & Medical Genomics [Mladenova M et al.,2019].

Вторият пациент с предполагаема клинична диагноза скелетна дисплазия също не бяха детектирани мутации в гените *FGFR3* и *FGFR2*, но след допълнителни генетични изследвания се откриха интересна генетична находка. Пациентът е шест годишно момиче с вродени аномалии, дисморфични черти, кранио-фациална синостоза и изоставане в психомоторното развитие. Предварително направеното цитогенетично изследване не показва отклонения от нормалния профил: 46, XX. С цел откриване на генетичната причина за поставената клинична диагноза, се взе решение да бъде проведено последващо разширено изследване посредством метода цялостно екзомно секвениране (WES, whole exome sequencing). Този метод дава възможност в кратък срок да бъдат анализирани едновременно множество гени, свързани със скелетни дисплазии.

След проведеното цялостно екзомно секвениране и анализ на получените данни беше открит генетичен вариант, представен в Таблица 16

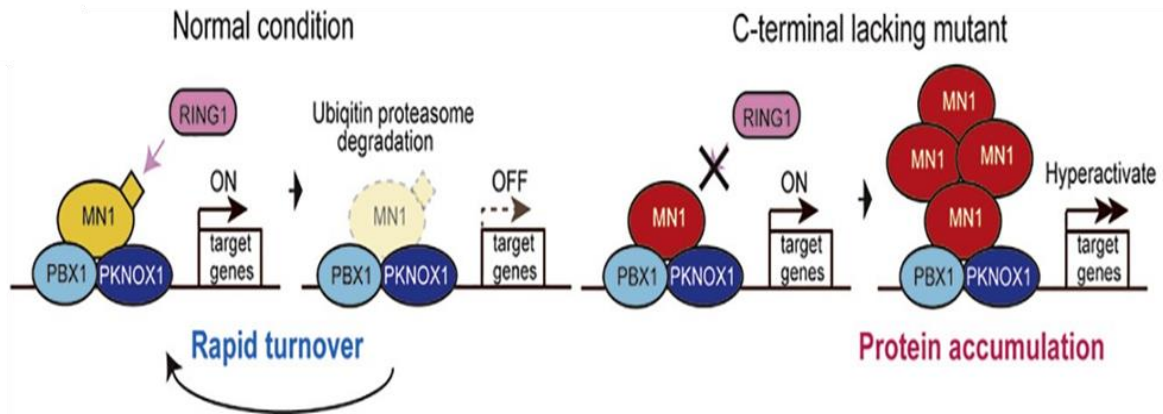
**Таблица 16.** Резултати от проведеното екзомно секвениране.

Ген	Вариант (UCSC,hg19)	Промяна на ниво транскрипт	Промяна на ниво аминокиселини	Тип вариант	Зиготност
MN1	Chr.22:g.28192789C>T	NM_002430.3: c.3743G>A	p.Trp1248Ter	Stop codon	Хетерозигот (De novo)

Откритият генетичен вариант с.3743G>A, p.Trp1248Ter в *MN1* гена е от типа nonsense мутация и не е съобщаван в базите данни към момента на анализа. В резултат на нуклеотидната замяната, на позиция 1248 в аминокиселинната последователност се генерира стоп кодон в екзон 1 на гена, което вероятно води до преждевременно термиране на белтъчната синтеза.

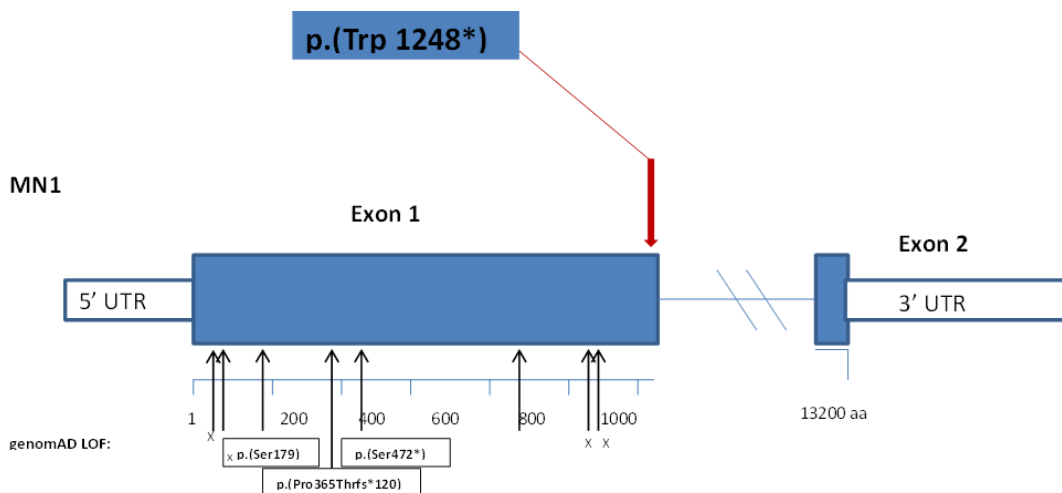
С цел изясняване произхода на настъпилата мутация беше проведен сегрегационен анализ в семейството на засегнатото дете. Получените молекулярно-генетични резултати показаха, че вариантът с.3743G>A, p.Trp1248Ter в *MN1* гена не е унаследен от родителите, а е възникнал *de novo*.

Генът *MN1* кодира транскрипционен кофактор, който е бил идентифициран за първи път като онкоген в менингиом [Lekanne et al., 1995]. Той си взаимодейства с други транскрипционни фактори, които се прикрепят към специфични области на ДНК и влияят на експресията активността на определени гени. Смята се, че транскрипционният кофактор *MN1* играе ролята на регулатор на активността на редица гени, необходими за развитието на черепа и мозъка. Тъй като *MN1* не съдържа ДНК-свързващ домейн и самият *MN1* има трансактивираща активност, *MN1* вероятно активира транскрипцията чрез свързване с други ДНК-свързващи транскрипционни фактори, които могат да свързват енхансерни и/или промоторни региони. *MN1* участва в транскрипционната регулация чрез взаимодействие с транскрипционните фактори *PBX1*, *PKNOX1* и *ZBTB24*. Мутантният *MN1* нарушава свързването с *ZBTB24* и *RING1*, което е E3-убиквитинова лигаза. Въз основа на литературни проучвания, моделът, според който С-терминалната делеция пречи на взаимодействиящите молекули на *MN1*, свързани с убиквитин-медиацията протеазомен път, включително *RING1*, и увеличава количеството на мутантния протеин; това увеличение води до нарушаване на регулацията на *MN1* целевите гени чрез инхибиране на бърз обмен на *MN1* протеин [Miyake et al., 2021] (Фигура 38).



**Фигура 38.** Патомеханизъм в резултат от C-терминално дефектен MN1 [Noriko Miyake et.al.,2021]

В нашия случай стоп кодонът възниква на позиция 1248, която се намира в - 3' крайния регион на екзон 1 на *MN1* гена (Фигура 39).



**Фигура 39.** Локализация Разпределение на C-терминиращата мутация *s.3743G>A*, *p.Trp1248\**, идентифицирана в *MN1* гена в пробанда (червена стрелка). Под схемата на гена с черни стрелки са показани позициите на варианти, водещи до загуба на функция (*p.Ser179\**, *p.Pro365Thrfs\*120* и *p.Ser472\**), описани в базата данни *gnomAD*.

Всички варианти, водещи до генериране на преждевременен стоп-кодон в последните 37 нуклеотида на екзон 1 или крайния екзон 2 (Фигура 39) се очаква да доведат до MN1 транскрипти, които избягват nonsense-медирано разпадане на иРНК. Това предполага, че генетичните варианти в *MN1* гена, засягащи този регион, както и описаният от нас вариант, биха могли да доведат до експресията на C-крайно скъсен протеин (C-terminally truncated protein) с патогенен ефект. Уникалните фенотипове, свързани със C-терминални преждевременно-терминиращи мутации, които избягват nonsense-медирано разпадане на иРНК, са докладвани и за няколко други гена [White

et al., 2016]. Всички докладвани случаи на C-terminal truncation syndrome се дължат на nonsense мутации в района, в който попада и нашата мутация. Може да се предположи, че една от причините за възникване на мутации в този регион на *MNI* гена (в крайния 3' участък на екзон 1 или в екзон 2) се крие в нуклеотидния състав на този регион. Мутацията p.Trp1248\* се генерира от нуклеотидна замяна G>A при CpG динуклеотид. Този мутационен профил е свръхпредставен сред мутациите на човешка зародишна линия [Acuna-Hidalgo et al., 2016] и няма други CpGs региони с потенциал да генерират стоп-кодон чрез замяна C>T в последните 55 нуклеотида на екзон 1 или в екзон 2 на *MNI*.

Патогенни хетерозиготни варианти в гена *MNI* са доказана причина за C-terminal truncation syndrome (МСТТ) (PMID:31834374)

МСТТ синдромът се среща при лица със следните клинични находки:

- 1) Интелектуални нарушения със силно изразено речево забавяне
- 2) Хипотония
- 3) Забавяне в двигателното развитие
- 4) Загуба на слуха (проводима или сензоневронална)
- 5) Отличителен черепно-лицев дисморфизъм

Заболяването е с автозомно-доминантен модел на унаследяване. Повечето от хетерозиготните варианти, свързани със синдрома на МСТТ са *de novo* мутации. Изключение прави съобщение за едно семейство, в което двама засегнати братя са наследили мутацията от дискретно засегнат баща, носител на мутацията в мозаечна форма. Делеции, включително цялата генна последователност на *MNI*, са свързани с променлив клиничен фенотип, включително неврологични аномалии, лицев дисморфизъм, вродени сърдечни дефекти и др. [Said et al., 2011; Davidson et al., 2012; Maket et al., 2020].

Откритият при нашия пациент генетичен вариант c.3743G>A, p.Trp1248\* в *MNI* гена не е докладван досега в световната база данни. В подкрепа на предположенията за патогенната му природа са:

- ✓ Предишни доклади за патогенната природа на стоп-кодон варианти в *MNI* гена (PMID:31834374).
- ✓ Стоп-кодон варианти в този регион на гена са съобщавани като патогенни в LOVD базата данни (напр.: p.Glu1249fs\*, p.Glu1260\*, p.Gln1273\* и др.).
- ✓ *De novo* произхода на варианта.
- ✓ Отсъствието на варианта от всички контролни популации по проекта gnomAD.

## 1.6. ПРЕНАТАЛНА ДИАГНОСТИКА

Към извършване на генетично изследване на гена *FGFR3* с цел дородова диагностика бяха насочени 9 случая. При 6 от тях имаше ултразвукови данни (УЗ) за изоставане в растежа на костите на фетуса, без да има фамилна анамнеза; при останалите 3 случая имаше фамилна обремененост.

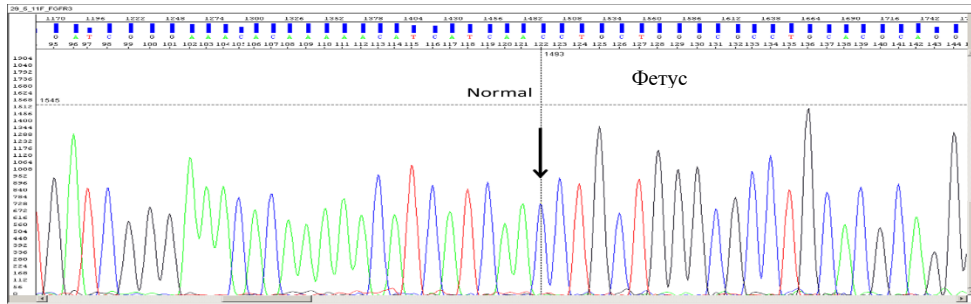
В Таблица 17 са представени клиничните данни и поводът за провеждане на дородова инвазивна процедура, както и резултатите от генетичния скрининг за мутации във *FGFR3* гена.

**Таблица 17.** Клинична симптоматика на пациентите, изследвани в пренатален период и генетична находка.

№	Гестационна седмица*	Клинични показатели	Резултат – <i>FGFR3</i> ген
1	23 <sup>+1</sup>	Майката е с генетично верифицирана диагноза хипохондроплазия (мутация <i>FGFR3</i> :c.1620C>A; p.Asn540Lys)	Норма
2	20	Фамилна предистория, дете с генетично верифицирана ахондроплазия (мутация <i>FGFR3</i> :c.1138G>A;p.Gly380Arg)	Норма
3	20	Бащата и сестрата са с генетично верифицирана диагноза хипохондроплазия (мутация <i>FGFR3</i> :c.1620C>A;p.Asn540Lys)	Норма
4	12 <sup>+5</sup>	УЗ данни за тесен гръден кош и тежка микрогнатия	c.1108G>T
5	20 <sup>+6</sup>	УЗ данни за несъответствие в развитието на костите на плода спрямо гестационната седмица	Норма
6	26	УЗ данни, показващи по-къси крайници спрямо гестационната седмица	Норма
7	15	УЗ данни, показващи по-къси крайници спрямо гестационната седмица	Норма
8	17	УЗ данни за тесен гръден кош, уголемена глава	Норма
9	21 <sup>+1</sup>	УЗ данни за макроцефалия	Норма

\*Гестационната седмица, в която е извършена инвазивната манипулация (амниоцентеза или хорион биопсия) за извличане на ДНК материал от фетуса.

При първия случай на извършена пренатална диагностика в семейство с фамилна история, рискът за засегнат ембрион беше 50%, тъй като майката е носителка на мутацията *FGFR3*:c.1620C>A; p.Asn540Lys и самата тя е с диагноза хипохондроплазия. Извършените анализи показаха, че фетусът е здрав, неносител на майчината мутация (Фигура 40).

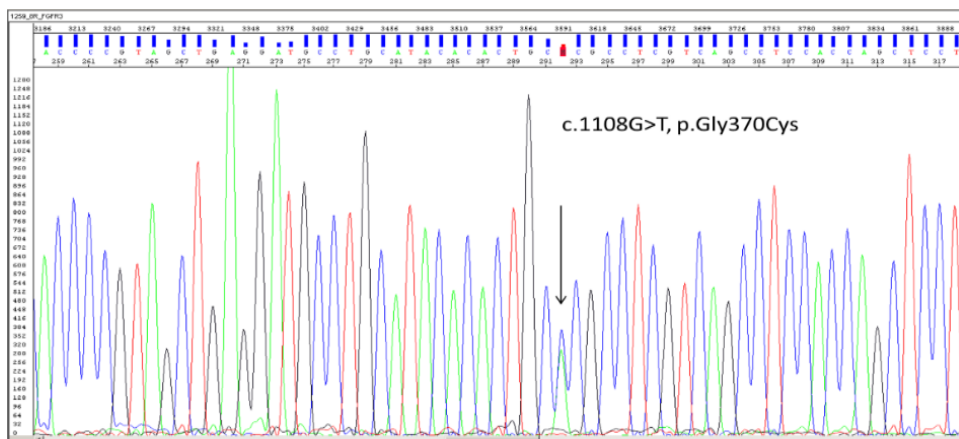


**Фигура 40.** Секвенционен профил от пренатална диагностика в семейство с хипохондроплазия. Фетусът не е унаследил фамилната мутация  $FGFR3:c.1620C>A, p.Asn540Lys$ .

При пренаталната диагностика на **втория** фамилен случай с генетично верифицирана ахондроплазия в семейството (мутация  $FGFR3: c.1138G>A; p.Gly380Arg$ ), при фетуса не беше открито носителство на фамилната мутация. Рискът от повторение на мутацията при следваща бременност в тези случаи беше изчислен на около 10-15%, поради феномена герминативен мозаицизъм, засягащ най-вече сперматогенезата.

Аналогичен беше и **третият** случай на пренатална диагностика с фамилна предистория за хипохондроплазия. Извършеното генетично изследване отхвърли носителство на фамилната мутация  $FGFR3:c.1620C>A; p.Asn540Lys$  при фетуса.

В един от случаите пренаталната диагностика беше извършена по повод ултразвукови данни за крайници с размери, несъответстващи на гестационната седмица, тесен гръден кош и тежка микрогнатия. При изследването на гена  $FGFR3$  у фетуса беше открит патологичен генетичен вариант  $c.1108G>T, p.Gly370Cys$ , асоцииран с Танатофорна дисплазия тип I. Резултатите от проведения секвенционен анализ са показани на Фигура 41.

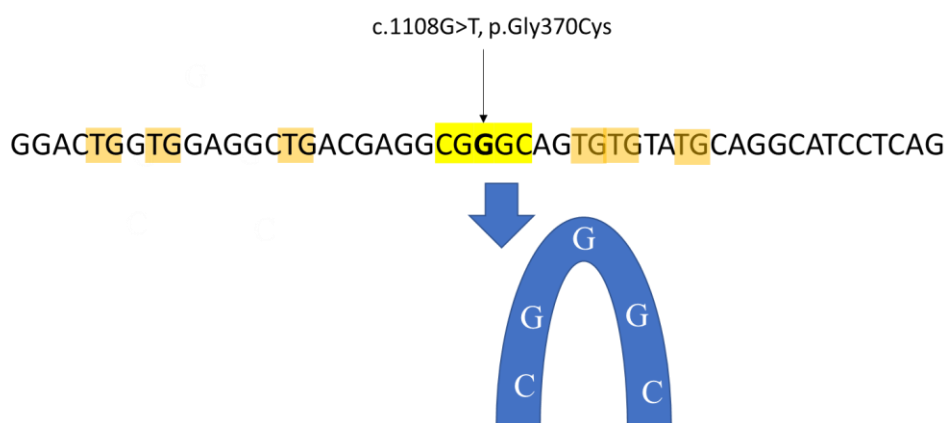


**Фигура 41.** Секвенционен профил на патогенния генетичен вариант  $FGFR3:c.1108G>T, p.Gly370Cys$  от пренатална диагностика, насочена по УЗ данни за скелетни аномалии.

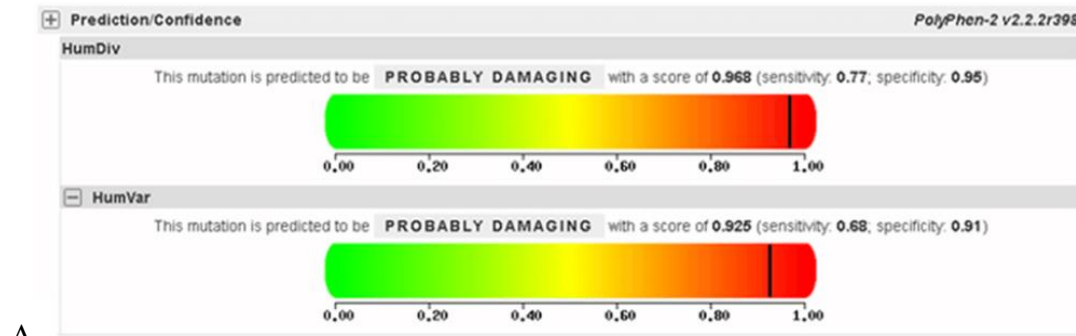
Танатофорна дисплазия (Thanatophoric dysplasia) представлява тежка форма на скелетна дисплазия, характеризираща се с множество скелетни малформации, като

силно скъсени крайници и наличие на допълнителни кожни гънки на ръцете и краката. При танатофорна дисплазия тип I се наблюдават нормален череп и извити бедрени кости, и се асоциира с патологични генетични варианти в *FGFR3* гена. Откритият патологичен вариант с.1108G>T, p.Gly370Cys е локализиран в екзон 10 на гена и е съобщаван в базите данни. Промененият кодон 370 попада във високо консетвативен район от трансмембрания домен (ТМ) на FGF рецептора (виж Фигура 26 - в зелено), който функционира чрез димеризация и последващо фосфорилиране.

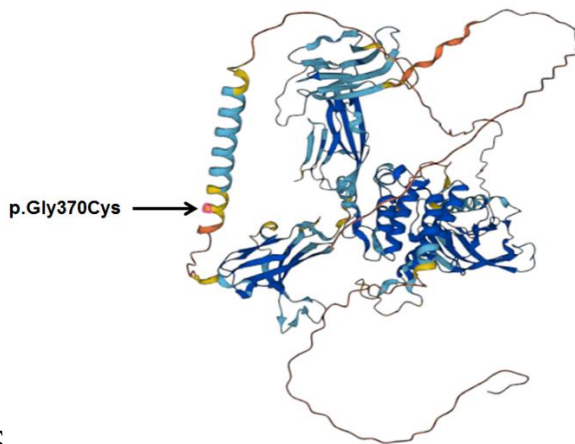
Мутацията с.1108G>T, p.Gly370Cys във *FGFR3* гена е вариант, който често пъти възниква *de novo*, поради което извършихме анализ на околната нуклеотидна секвенция (Фигура 42). В анализираният регион се откриват множество G/T богати полуперфектни прави повтори, както и перфектни прави повтори. Интересното в случая е, че мутантният нуклеотид попада в центъра на симетричен елемент. Това би могло да обясни механизма на възникване на мутацията точно в тази позиция. Способността на палиндромите да иницират генетична рекомбинация се крие в способността им да образуват вторични структури в ДНК, които могат да причинят забавяне на репликацията и прекъсвания на двойната верига. Като се има предвид тяхната рекомбиногенна природа, не е изненадващо, че палиндромите в човешкия геном участват в генетични пренареждания, транслокации и делеции, свързани с определени синдроми при хората (Фигура 42). Тези повторени последователности биха могли да участват в неправилното сдвояване на веригите, приплъзването на полимеразата и генерирането на мутационните преобразувания. Анализираните повтори биха могли да имат отношение към формирането на вторични структури, възпрепятстващи нормалните функции на полимеразата, което би могло да обясни възникването на мутацията в конкретна нуклеотидна позиция. Изчисленият коефициент на патогенност за мутацията с.1108G>T, p.Gly370Cys от предиктора PolyPhen2 е 0.95, което съответства на висока вероятност за патогенност (Фигура 43)



**Фигура 42.** Анализ на региона от *FGFR3* гена, в който попада мутацията с.1108G>T, p.Gly370Cys и схематично представяне на палиндромната последователност, обхващаща триплета на патологичната мутация



А



Б

**Фигура 43.** А-Резултат от online софтуерния предиктор Polyphen2 за оценка на патогенността на мутацията FGFR3: c.1108G>T, p.Gly370Cys; Б- Пространствена структура на FGFR3 рецептора, моделирана с помощта на AlphaFold2. Със стрелка е отбелязана замяната p.Gly370Cys, водеща до танатофорна дисплазия.

В аминокиселинната последователност на рецептора в позиция 370 е разположена аминокиселината глицин, която няма страничен радикал (един Н атом) и е неполярна. В резултат на замяната се инкорпорира полярната аминокиселина цистеин, която има страничен радикал, съдържащ серен атом като част от сулфхидрилната група (-CH<sub>2</sub>-SH), която е реактивоспособна и участва в изграждането на вътре- и междумолекулни дисулфидни мостове. Това поставя цистеина в специално положение, когато се инкорпорира на неправилно място в аминокиселинната последователност, тъй като дисулфидните мостове са от съществено значение за формирането на третичната протеинова структура. Това е допълнителна хипотеза защо аминокиселинната замяна p.Gly370Cys има такова патологично влияние върху структурата и/или функцията на белтъка и се извява с наблюдаваната тежка клинична картина-

В допълнение, при останалите изследвани пет фетуса с УЗ данни за скелетна дисплазия не бяха открити мутации в *FGFR3* гена.

## ЗАБОЛЯВАНИЯ С НАРУШЕНИЯ В СЪЕДИНИТЕЛНАТА ТЪКАН

На базата на предварителните клинични данни, постнатално изследваните 25 пациенти бяха разпределени в групи по гени, съответстващи на дадената анамнеза и клинична диагноза.

В Таблица 18 са представени групите пациенти, изследвани съответно за гените *COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1*, *COL11A1*, групирани по пол.

**Таблица 18.** Разпределение на изследваните пациенти по отношение на таргетираните гени, по пол и брой.

	Мъжки пол	Женски пол	Общ брой
<i>COL1A1 / COL1A2</i>	12	11	23
<i>COL2A1 / COL11A1</i>	1	1	2

### СИНДРОМИ СВЪРЗАНИ С *COL1A1 / COL1A2* ГЕНИ (OSTEOGENESIS IMPERFECTA)

Пациентите с клинична диагноза, попадаща в групата на синдроми, свързани с гените *COL1A1* и *COL1A2*, бяха общо 23 на брой (Таблица 10).

След провеждане на молекулярно генетични анализи, касаещи гена *COL1A1* бяха открити 3 мутации, асоциирани с Osteogenesis imperfect (Таблица 19). С неизясен молекулен дефект останаха 12 пациента, като един от тях беше с неясна клинична картина, наподобяваща Osteogenesis imperfecta. Този пациент беше изследван за всички екзони от *COL1A1* гена и подлежи на допълнителни генетични изследвания в бъдеще.

**Таблица 19.** Резултати от анализ на *COL1A1* гена при пациенти с Osteogenesis imperfecta

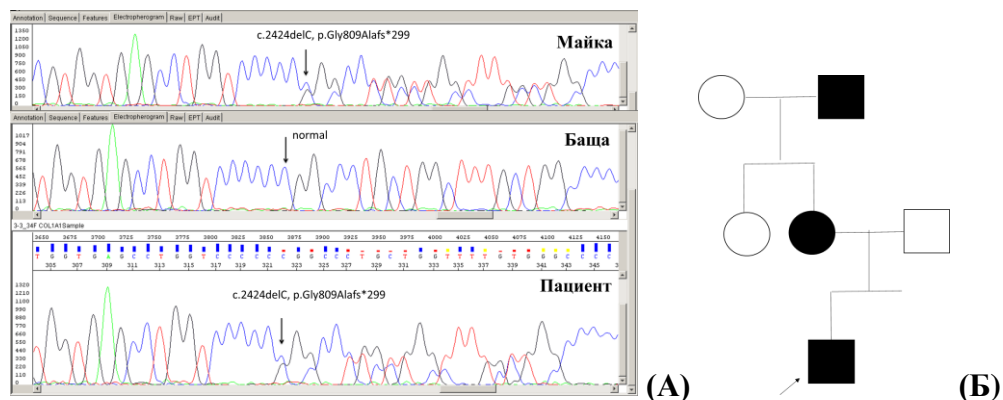
Пациент №	Ген	Екзон	Нуклеотидна Замяна	Аминокиселинна Замяна	Диагноза
1*	<i>COL1A1</i>	1-51	c.2424delC	p.Gly809AlafsTer299	Osteogenesis imperfecta
2*	<i>COL1A1</i>	36	c.2424delC	p.Gly809AlafsTer299	Osteogenesis imperfecta
3*	<i>COL1A1</i>	36	c.2424delC	p.Gly809AlafsTer299	Osteogenesis imperfecta
4*	<i>COL1A1</i>	1-51	-	-	Osteogenesis imperfecta
5**	<i>COL1A1</i>	1-51	c.2784delT	p.Gly929AlafsTer179	Osteogenesis imperfecta
6**	<i>COL1A1</i>	40	c.2784delT	p.Gly929AlafsTer179	Osteogenesis imperfecta
7**	<i>COL1A1</i>	40	c.2784delT	p.Gly929AlafsTer179	Osteogenesis imperfecta
8**	<i>COL1A1</i>	40	c.2784delT	p.Gly929AlafsTer179	Osteogenesis imperfecta
9***	<i>COL1A1</i>	7	-	-	Osteogenesis imperfecta
10***	<i>COL1A1</i>	7	c.579delT	p.Gly194ValfsTer71	Osteogenesis imperfecta
11***	<i>COL1A1</i>	7	-	-	Osteogenesis imperfecta
12	<i>COL1A1</i>	1-51	-	-	Osteogenesis imperfecta
13	<i>COL1A1</i>	1-51	-	-	Osteogenesis imperfecta
14	<i>COL1A1</i>	1-51	-	-	Osteogenesis imperfecta
15	<i>COL1A1</i>	1-51	-	-	Osteogenesis imperfecta
16	<i>COL1A1</i>	1-51	-	-	Osteogenesis imperfecta
17	<i>COL1A1</i>	1-51	-	-	Osteogenesis imperfecta
18	<i>COL1A1</i>	1-51	-	-	Osteogenesis imperfecta
19	<i>COL1A1</i>	1-51	-	-	Osteogenesis imperfecta
20	<i>COL1A1</i>	1-51	-	-	Osteogenesis imperfecta
21	<i>COL1A1</i>	1-51	-	-	Osteogenesis imperfecta
22	<i>COL1A1</i>	1-51	-	-	Osteogenesis imperfecta
23	<i>COL1A1</i>	1-51	-	-	Osteogenesis imperfecta

\*Семейство №1 / \*\*Семейство №2 / \*\*\*Семейство №3

## СЕМЕЙСТВО №1

Семейството беше насочено за генетична консултация поради раждане на дете с клинична диагноза *Osteogenesis imperfecta*. Майката на индексния пациент и нейният баща също бяха с клинични данни за това състояние. Проведено беше генетично изследване на *COL1A1* гена и при индексния пациент беше открито хетерозиготно носителство на мутацията c.2424delC, p.Gly809AlafsTer299 в екзон 36 на *COL1A1* гена. Генетичната находка е от типа мутации с изместване рамката на четене (т.нар. frameshift мутация) в резултат на делеция на един нуклеотид. Вследствие на тази промяна може да се получи протеин с променена аминокиселинна последователност или по-къс протеин, резултат от възникване на преждевременен стоп-кодон, поради изместване на рамката на четене. Новооткритият в при индексния пациент вариант p.Gly809AlafsTer299 представлява делеция на един С нуклеотид в позиция 2424 на гена, което води до изместване рамката на четене и и генериране на преждевременен стоп кодон 299 кодона по-напред.

С цел изясняване на произхода на новооткритата мутация се проведе сегрегационен анализ в семейството на засегнатото дете. Молекулярно генетичният анализ беше проведен прицелно само за 36-ти екзон, с цел търсене на този конкретен молекулен дефект. Доказано беше хетерозиготно носителство на патологичния генетичен вариант COL1A1: c.2424delC, p.Gly809AlafsTer299 при майката и при дядото по майчина линия на детето, които съобщаваха за чести фрактури. Това е в съответствие с очаквания автозомно-доминантен тип на унаследяване (Фигура 44)



**Фигура 44.**

(А) Секвенционен профил на фамилната мутация COL1A1:p.Gly809AlafsTer299;

(Б) Родословно дърво на семейството, със стрелка е показан пробанда

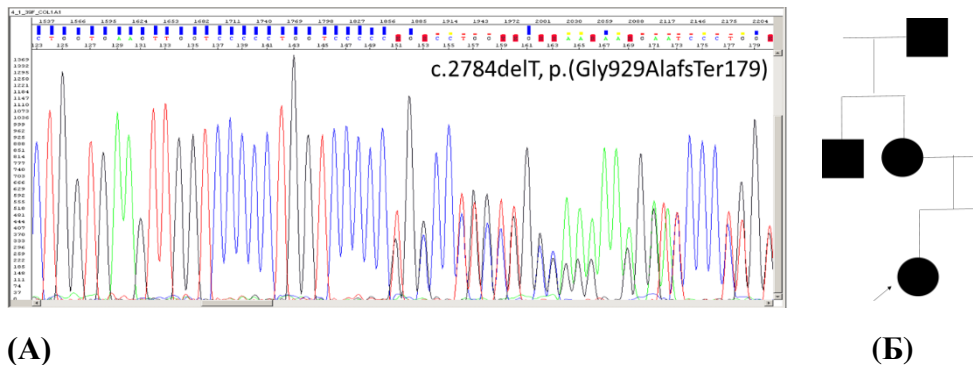
## СЕМЕЙСТВО №2

Пробандът от семейството е 10-годишно дете, насочено с клинична диагноза *Osteogenesis imperfecta* тип I, поради наличието на няколко счупвания на дългите кости, възникнали спонтанно или при леки травми. Фамилната история е позитивна - при майката, вуйчото и техния баща се съобщава за многобройни фрактури.

Молекулярно-генетичното изследване на *COL1A1* гена беше проведено при индексния пациент и беше открита хетерозиготна мутация c.2784delT, p.Gly929AlafsTer179 в екзон 40 на гена. Откритият генетичен вариант представлява делеция на един Т нуклеотид в позиция 2784 на гена, което води до изместване рамката на четене и генериране на преждевременен стоп кодон 179 кодона по-напред в

белтъчната последователност. Откритият патогенен вариант в *COL1A1* гена е съобщаван в базите данни и се асоциира с клиничната диагноза Osteogenesis imperfecta тип I.

С цел изясняване на произхода на новооткритата мутация се проведе сегрегационен анализ в семейството на засегнатото дете. Беше установено, че майката, вуйчото и дядото по майчина линия на детето са носители на същия генетичен вариант, което отговаря на представените първоначално клиничните данни за чести фрактури сред родствениците. Секвенционният профил на мутацията и родословното дърво на семейството са показани на Фигура 45



(A)

(B)

**Фигура 45.**

(A) Секвенционен профил на фамилната мутация COL1A1: p.Gly929AlafsTer179;

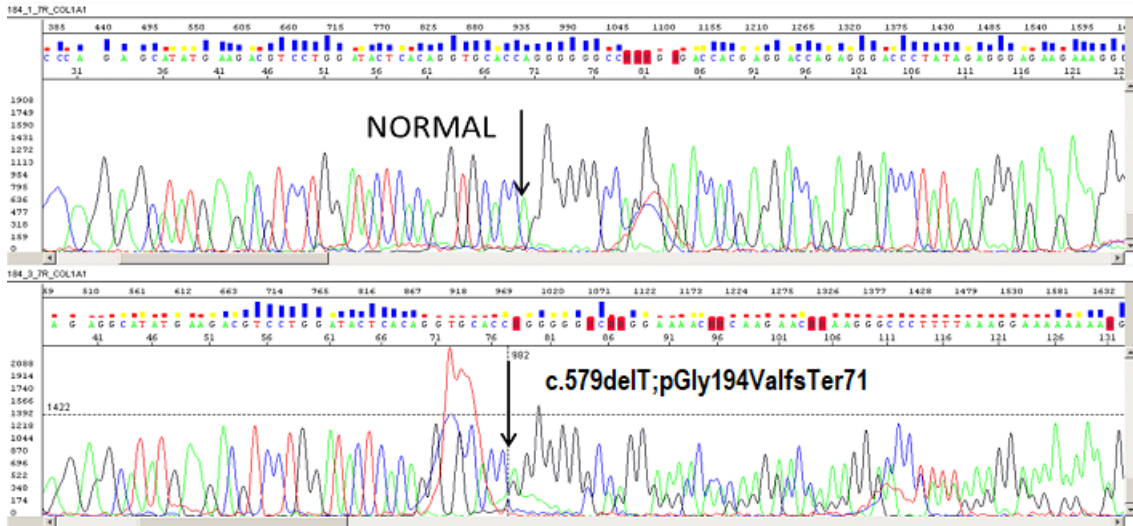
(B) Родословно дърво на семейството, със стрелка е показан индексният пациент.

### СЕМЕЙСТВО № 3

Индексният пациент от семейство № 3 е дете на 1 година, насочено с клинична диагноза Osteogenesis imperfecta тип I, поради наличието на няколко счупвания на дългите кости. Молекулярно-генетичното изследване на *COL1A1* гена показва хетерозиготно носителство на генетичния вариант c.579delT, p.Gly194ValfsTer71 в 7 екзон на гена.

Откритият вариант p.Gly194ValfsTer71 представлява делеция на един T нуклеотид в позиция 579 на гена, което води до изместване рамката на четене и генериране на преждевременен стоп кодон 71 кодона по-напред. Откритият патогенен вариант в *COL1A1* гена е съобщаван в ClinVar базата данни и се асоциира с клиничната диагноза Osteogenesis imperfecta тип I.

С цел изясняване произхода на откритата мутация се проведе сегрегационен анализ прицелно само за екзон 7 в семейството на засегнатото дете. Беше установено, че майката и бащата не носят този патогенен вариант и следователно откритият генетичен дефект е възникнал *de novo* при детето (Фигура 46).



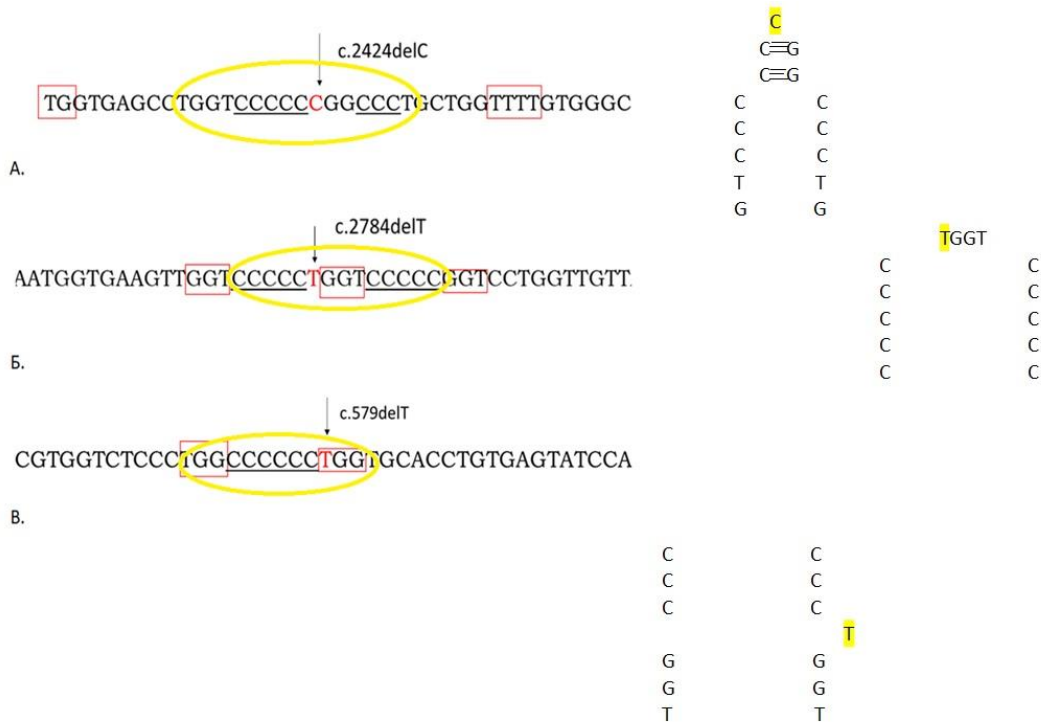
**Фигура 46.** Секвенционен профил на *de novo* възникналата мутация COL1A1:c.579delT в COL1A1 в изследваното семейство

Откритите варианти в COL1A1 гена при трите изследвани семейства са от един и същи тип мутации, водещи до изместване рамката на четене, в резултат на делеция на един нуклеотид и генериране на преждевременен стоп кодон в новата рамка на четене. Анализът на околната на патологичния вариант секвенция COL1A1:p.Gly809AlafsTer299, открита в семейство №1 показва повтарящи се перфектни прави повтори (TGG и TT), полу-симетричен елемент в района на мутацията - GTCCCCCGGCCCTG-. От схематичното представяне на полуперфектния повтор се вижда, че мястото на дупетирания нуклеотид е на върха на образувалата се вторична структура и механизма на възникване на това горещо място за мутация, най-вероятно е целта на ДНК полиеразата да създаде абсолютна симетрия в района. (Фигура 47 А). В допълнение е налице и шестплетната последователност от С-богат район, като един от тези С нуклеотиди отпада в резултат на делецията.

Мутацията COL1A1:p.Gly929AlafsTer179, открита в семейство №2 показва наличието на повтарящи се перфектни прави повтори GGT (Фигура 47 Б), които заграждат мястото на мутацията. В допълнение е налична петплетната С-богата последователност, която загражда позицията на дупетирания Т нуклеотид. Прави впечатление, че целият район около мястото на възникване на мутацията е богат на повтарящи се елементи, включително и съвършен симетричен елемент CCCCSTGGTCCCCC, заграден от прави повтори, което би могло допълнително да затрудни работата на ДНК полимеразата.

Анализът на околната секвенция на мутацията COL1A1: p.Gly194ValfsTer71, открита в семейство №3 (Фигура 47 В) показва, че мястото на мутацията отново е предшествано от шестплетна последователност, богата на нуклеотида С и заградена с триплета TGG - аналогично на откритите в предните две семейства frameshift мутации

(Фигура47)



**Фигура 47.** Анализ на регионите от *COL1A1* гена, в който попадат трите мутации, открити при български пациенти с Osteogenesis imperfecta.

A. Анализ на околната секвенция около мястото на мутацията *COL1A1:p.Gly809AlafsTer299*, открита в семейство №1 И схематично представен симетричния елемент, в който попада и мястото на възникване на мутация.

Б. Анализ на околната секвенция около мястото на мутацията *COL1A1:p.Gly929AlafsTer179*, открита в семейство №2. И схематично представен симетричния елемент, в който попада и мястото на възникване на мутация.

В. Анализ на околната секвенция около мястото на мутацията *COL1A1:p.Gly194ValfsTer71*, открита в семейство №3. И схематично представен симетричния елемент, в който попада и мястото на възникване на мутация.

И при трите семейства анализът на околната на мутацията секвенция показва, че мястото на възникване на мутацията е предшествано от С богат мотив и изобилстват повторени TG-богати мотиви и перфектни или полуперфектни симетрични елементи (Фигура 47). Тези мотиви най-вероятно благоприятстват образуването на вторични структури, затрудняващи работата на ДНК полимеразата и водещи до нейното приплъзване и прескачане на един нуклеотид. Тези вторични структури вероятно правят трудно разпознаваем пропусъкът на един нуклеотид от ДНК-поправящите системи, което вероятно има отношение към фиксирането на мутацията в генома.

Най-често срещаният тип COL1 патогенен вариант при Osteogenesis imperfecta влияе върху тройната спирална структура на COL1A1 / 2 веригите. Колагенът тип I е хетеротример, състоящ се от две алфа-1 вериги и една алфа-2 верига. Тройните спирални

домени са съставени от непрекъснати повторения на трипептида Gly-X-Y, където X и Y могат да бъдат всяка аминокиселина. X често е пролин (Pro), а Y често лизин (Lys). Образуването на тройна спирала изисква глицинов остатък във всяка трета позиция на веригите, тъй като глицинът е единственият остатък, достатъчно малък, за да се побере в ограниченото пространство от вътрешната страна на спиралата [Zhytnik et.al., 2019]. Всяка мутация, която нарушава Gly-X-Y последователността на тройната спирала на колагена, ще доведе до нарушена функция на колагена. Такива мутации нарушават образуването на тройна спирала, нейната стабилност и взаимодействията му с извънклетъчния матрикс.

Като общо правило фенотипната тежест зависи от засегнатата алфа верига, положението на мутацията, заместващата аминокиселина или комбинацията от тези три променливи. Два основни вида мутации в колаген тип I са свързани с *Osteogenesis imperfecta*. Първият вид мутация води до хаплоинсуфициенция, обикновено свързана с лека форма *Osteogenesis imperfecta* тип I. Хаплоинсуфициенцията обикновено е следствие от nonsense мутация или frameshift мутация, която въвежда преждевременен терминаращ кодон в кодиращата последователност на единия алел на *COL1A1* гена, както случаите с нашите пациенти. Това инициира nonsense-медирано разпадане на иРНК [Marini et. al., 2017]. Резултатът от тези мутации е количествен дефект в колагена тип I, тъй като се произвежда само около половината от нормалното количество белтък. Въпреки редуцираното количество, произведеният колагентип I има нормална структура.

Вторият вид мутации представляват аномалии в нуклеотидната последователност, които водят до структурни промени в колаген тип I. Най-честите мутации, водещи до *Osteogenesis imperfecta* представляват замяна на най-честата аминокиселина в колагеновата верига глицин с друга аминокиселина. Всяка мутация, която нарушава Gly-X-Y последователността на тройната спирала на колагена, ще доведе до нарушена структура и/или функция на колагена [Rauch et. al., 2010]. Необходими са много малко мутантни колагенови мономери, за да се наруши структурата на различните мултимерни възли. По този начин мутациите, засягащи глицина в колаген тип I упражняват така наречения доминиращ отрицателен ефект.

Фенотип-генотипната корелация при *Osteogenesis imperfecta* тип I може да се обобщи в следните точки [Rauch et. al., 2010]:

- 1) COL1 патогенният вариант обикновено влияе на тройноверижната спирална организация;
- 2) Генетичните варианти могат да придизвикат количествени изменения в белтъчния продукт, асоциирани с по-лека клинична симптоматика;
- 3) Генетичните варианти могат да придизвикат структурни промени в колагеновата верига, асоциирани с по-тежка дори летална клинична симптоматика;
- 4) Тежестта на фенотипната изява зависи от засегнатата алфа верига;
- 5) Тежестта на клиничната симптоматика зависи от заместващата аминокиселина и от вида на възникналата мутация;
- 6) Тежестта на фенотипната изява се определя от това дали едното или и двете копия на гена са засегнати.

При пациентите с предполагаема клинична диагноза *Osteogenesis imperfecta*, които бяха включени в изследванията ни и се оказаха негативни за патогенни генетични варианти в *COL1A1* гена, беше извършено допълнително изследване на *COL1A2* гена. Резултатите и тук бяха негативни, не се откриха патогенни варианти в *COL1A2* гена.

Един пациент от нашата извадка беше насочен с предполагаема клинична диагноза *Osteogenesis imperfecta*, поради множество фрактури. Първоначално беше изследван за *COL1A1* гена, но тъй като не бяха открити патогенни варианти, продължихме с *COL1A2* гена, който също беше негативен. В последствие беше проведено цялостно екзомно секвениране (WES) като беше анализиран панел от гени, асоциирани с изява на колагенопатии. След проведеното секвениране от ново поколение отново не бяха открити патогенни варианти, но в хода на анализа на данните беше установено, че в определени региони на X хромозомата липсва покритие (Фигура 48) Такъв проблем в данните би могъл да се дължи на грешен алайнмънт или друга грешка в хода на биоинформационния анализ на данните, както и да представлява индикация за наличието на делеция в региона на X хромозомата, особено при случаите на изследване на пациенти от мъжки пол (какъвто е и нашият пациент). С цел да отхвърлим или потвърдим това съмнението за предполагаема хемизиготна микроделеция на дългото рамо на X хромозомата в район 23 (Xq23) беше проведен агау CGH анализ. Резултатите от проведената сравнителна геномна хибридизация показаха наличие на делеция върху X-хромозомата Таблица 20. Делецията е с размер 870,743,253 кб и включва два гена, свързани със заболявания при човека *PLS3* (OMIM\*300131) и *SLC6A14* (OMIM\*300444).

**Таблица 20.** Резултатите от проведения агау-CGH анализ.

Гени	Вариант (UCSC,hg19)	Тип на варианта/ патогенност
<b>PLS3, SLC6A14</b>	Arr[GRCh37]Xq23(114,799,463-115,670,182)x0	Хромозомна микроделеция / Клас 4: вероятно патогенен вариант

Доказателствата относно патогенната природа на подобни делеции в Xq23 региона са ограничени. Според литературните данни и мутационните бази данни няма докладвани пациенти със същата делеция на Xq23 региона. Доказаната делеция обхваща генът *PLS3*, в който варианти със загуба на функция са свързани с X- свързана доминантна остеопороза и чувствителност към остеопоротични фрактури с висока пенетрантност при мъже и вариабилна пенетрантност при жени (OMIM:300910) [Van Dijk et. al., 2013]. В допълнение към точковите варианти, хемизиготни Xq23 делеции, включващи целия *PLS3* ген са докладвани при двама мъже с костни фрактури [Manny et. al., 2017, Kampe et.al., 2017]. В подкрепа на патогенната природа на варианта и асоциацията му с клиничната изява при пациента можем да представим следните доказателства:

- 1) Пълното отсъствие на подобни делеции в контролните групи от здрави хора

- 2) Очакваната загуба на функция на гени, попадащи в хемизиготната делеция на този хромозомен регион
- 3) Съответствието между ефекта на варианта с установения механизъм на *PLS3*-свързаните заболявания
- 4) Съответствието на варианта с клиничната изява на пациента
- 5) Наличието на варианта в хемизиготно състояние в съответствие с модела на унаследяване на *PLS3*-свързаните заболявания.

### СИНДРОМИ СВЪРЗАНИ С *COL11A1* / *COL2A1* ГЕНИ

Пациентите с клинична диагноза, попадаща в групата на синдроми, свързани с гените *COL11A1* и *COL2A1*, бяха общо 2-ма на брой – баща и дъщеря.

Индексният пациент е 2-годишно момиче с хипертелоризъм, хипоплазия на средната част на тялото, малък седловиден нос и краниофациална дисплазия. Към момента на изследването бащата е 38-годишен, със същите клинични характеристики както пробанда, с изключение на това, че има загуба на слуха и умерено умствено изоставане. Както бащата, така и пробандът са клинично диагностицирани с Marshall-Stickler синдром.

Тъй като синдромът Marshall-Stickler се асоциира най-често с мутации в гена *COL2A1*, като първа стъпка от анализите беше извършено секвениране по Sanger на този ген в семейството, но патогенни варианти не бяха открити. Беше пристъпено към секвениране на втория кандидат-ген *COL11A1*. При индексния пациент беше открита мутацията с.3474+1G>A в интрон 44 на *COL11A1* гена, непубликувана до този момент в базите данни. Извършеният сегрегационен анализ показва, че бащата също е носител на гореспоменатия вариант и следователно вариантът сегрегира със заболяването в семейството.

Вариантът *COL11A1*:с.3474+1G>A представлява splice-site мутация, засягаща донорната консесусна сплайсинг последователност. Мутации, които попадат в местата за сплайсинг, нарушават сигнала, който е необходим за правилното изрязване на некодиращите интронни последователности в гена. Splice-site мутациите могат да възникнат в gt-последователността, която по правило определя 5'-донорното splice място или в ag-последователността, която определя 3'-акцепторното място. Освен в тези позиции, мутации могат да възникнат и в последователности близки до донорното или акцепторното място, които отново да имат ефект върху сплайсинга. Ако един от тези сигнали бъде модифициран в резултат на мутация, тогава интроните не могат да се изрежат правилно и част от тях остава в зрялата иРНК (инсерции) или се изрязва цял екзон (делеции). Такъв тип дефект може да доведе до разпадане на увредения транскрипт или до получаване на белтъчен продукт с нарушена аминокиселинна последователност.

Вариантът с.3474+1G>A засяга донорно сплайс място на тройно-спиралния домен, който представлява известно „горещо място“ за мутации в гена *COL11A1* [Herrmann et. al., 1975]. Анализът на околната секвенция показва наличието на



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В хода на изпълнението на настоящата научна работа бяха въведени и оптимизирани методи за диагностика на гени, свързани със скелетни дисплазии и колагенози (*FGFR3*, *FGFR2*, *COL1A1*, *COL1A2*, *COL11A1* и *COL2A1*). Разработеният молекулярно-генетичен подход беше приложен за изследване на 75 пациента, 66 от които са скринирани постнатално и 9 - пренатално. Бяха оптимизирани протоколи за амплификация на прицелните гени и последващ анализ чрез секвениране.

Оптимизираните протоколи бяха приложени за диагностика на групата от 66 пациенти с цел изясняване на генетичните причини за наблюдаваната клинична симптоматика. Тридесет и пет пациенти бяха скринирани за мутации във *FGFR3* гена, шестима за мутации във *FGFR2* гена, дванайсет неродствени пациента за гените *COL1A1/COL1A2* и двама родствени пациента за *COL11A1/COL2A1*.

При 31 от тези 66-ма пациенти (47%) беше потвърдена поставената клинична диагноза на молекулно ниво, като бяха открити както мутации, публикувани в световната литература така и мутации, непубликувани в световен мащаб.

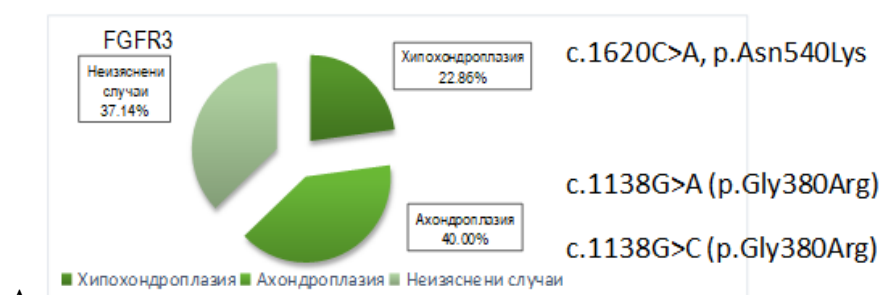
ПРИ 27 ПАЦИЕНТИ (87%) БЯХА ОТКРИТИ ИЗВЕСТНИ МУТАЦИИ:

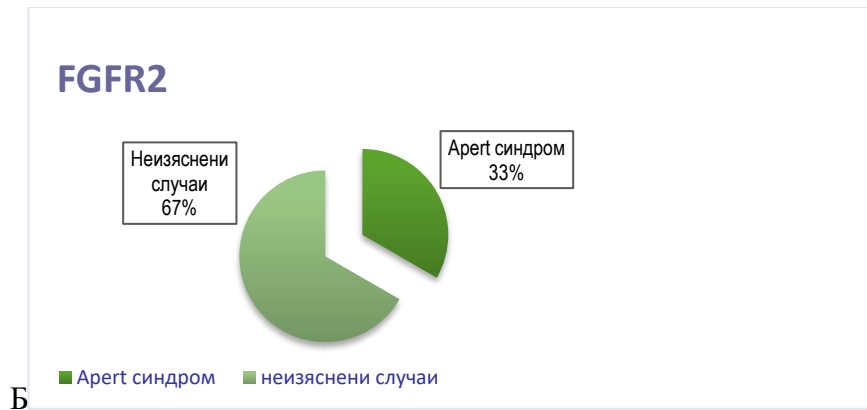
- ▶ *FGFR3*: c.1138G>A, p.Gly380Arg; c.1138G>C, p.Gly380Arg; c.1620C>A, p.Asn540Lys;
- ▶ *FGFR2*: c.755C>G, p.Ser252Trp;
- ▶ *COL1A1*: p.Gly809AlafsTer299; p.Gly929AlafsTer179; p.Gly194ValfsTer71.

ПРИ 4-МА ПАЦИЕНТИ (13%) БЯХА ОТКРИТИ НЕПУБЛИКУВАНИ ДОСЕГА МУТАЦИИ:

- ▶ 15q11.2q13.3 *de novo* интерстециална трипликация;
- ▶ *MNI*: c.3743G>A, p.Trp1248Ter;
- ▶ Хемизиготна микроделеция на дългото рамо на X хромозомата (Xq23);
- ▶ *COL11A1*: c.3474+1G>A.

От таргетната група с пациенти, насочени с диагнози, свързани с **нарушения в хрущялната тъкан**, общо бяха изследвани 35 пациенти. Откритите мутации по гени са представени на Фигура 50.





**Фигура 50.** Потвърдени на молекулно ниво диагнози спрямо неизяснените случаи по гени при пациентите, с първоначална клинична диагноза скелетна дисплазия:

А – Пациенти с извършени анализи в *FGFR3* гена,

Б - Пациенти с извършени анализи в *FGFR2* гена;

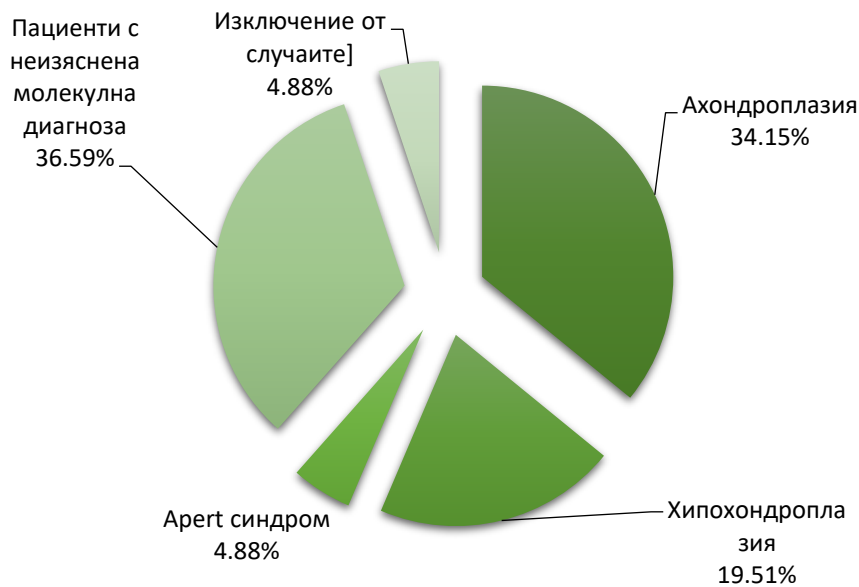
На диаграма „А“ са представени процентно доказаните случаи на пациенти с първоначална диагноза ахондро/хипохондроплазия (асоциирани с мутации в *FGFR3* гена), както и откритите мутации. В тази група бяха изследвани общо 35 пациенти, като при 14 (40.00%) пациента се доказва на молекулно ниво диагнозата Ахондроплазия (мутации *FGFR3*:c.1138G>A;p.Gly380Arg; *FGFR3*:c.1138G>C;p.Gly380Arg), при 8 (22.86%) се доказва на молекулно ниво диагнозата Хипохондроплазия (мутации *FGFR3*:c.1620C>A;p.Asn540Lys). Останалите 13 (37.14%) случаи, постъпили с клинична картина, наподобяваща скелетна дисплазия остават с неясен молекулен дефект.

На диаграма „Б“ са представени процентно доказаните случаи на пациенти с предполагаема клинична диагноза скелетна дисплазия. Всички те са изследвани за екзоните от *FGFR2* гена, които представляват горещи мутационни точки, свързани със скелетни дисплазии. В тази група бяха изследвани общо 6 пациенти. При 2-ма (33%) беше открита мутацията *FGFR2*:c.755C>G;p.Ser252Trp, водеща до Аперт синдром и 4-ма пациенти (67%) остават с неясен молекулен дефект.

В допълнение двама от пациентите с първоначална клинична диагноза скелетна дисплазия бяха генетично верифицирани с новооткрити патогенни молекулни дефекти. Първият случай касае пациент, насочен с предполагаема клинична диагноза Ахондроплазия, след проведени молекулярно-генетични изследвания на целия *FGFR3* ген, последвано от секвениране на целия *FGFR2* ген, с цел изясняване на диагнозата, не бяха открити патологични находки в нито един от двата гена. След прецизиране на клиничната диагноза и провеждане на допълнителни молекулярно-генетични изследвания се откри *de novo* интерстициална 15q11.2q13.3 трипликация, водеща до изявата на заболяването Хипомеланоза на Ito.

Вторият случай касаеше пациент с предполагаема клинична диагноза Скелетна дисплазия, като аналогично на първия случай не се откриват патологични находки в гените *FGFR3* и *FGFR2*. След прецизиране на клиничната диагноза и провеждане на допълнителни молекулярно-генетични изследвания се откри хетерозиготно носителство на nonsense вариант c.3743G>A, p.Trp1248Ter в гена *MNI*, водещ до много рядък C-terminal truncation синдром с автозомно-доминантен модел на унаследяване.

Процентното съотношение на откритите патологии в изследваната група от 41 пациенти със заболявания с нарушения в хрущялната тъкан е представено на Фигура 51.



**Фигура 51.** Процентно съотношение на изяснените на молекулярно ниво и неизяснени патологии със засягане на хрущялната тъкан.

Към извършване на генетично изследване на гена *FGFR3* с цел **дородова диагностика** бяха насочени 9 фетуси. Шест от случаите бяха изследвани по повод ултразвукови данни (УЗ) за изоставане в растежа на костите, в останалите три случая имаше фамилна предистория. При един ембрион (12.5%), насочен по ултразвукови данни за по-къси крайници, несъответстващи на гестационната седмица, тесен гръден кош и тежка микрогнатия беше открит молекулярния дефект *FGFR3:c.1108G>T;p.Gly370Cys* водещ до Танатофорна дисплазия тип I.

Благодарение на въведената методика за диагностика на скелетните дисплазии стана възможно провеждането на адекватна и навременна генетична консултация, профилактика и пренатална диагностика на засегнатите семейства.

От таргетната група с пациенти, насочени с предполагаеми диагнози, включващи **нарушения в съединителната тъкан**, общо бяха изследвани 25 пациенти, като 16 от тях нямат родствена връзка. Бяха доказани на молекулярно ниво 3 патологии с диагноза Osteogenesis imperfecta тип I (мутации)

*COL1A1:c.242delC;p.Gly809AlafsTer299;*

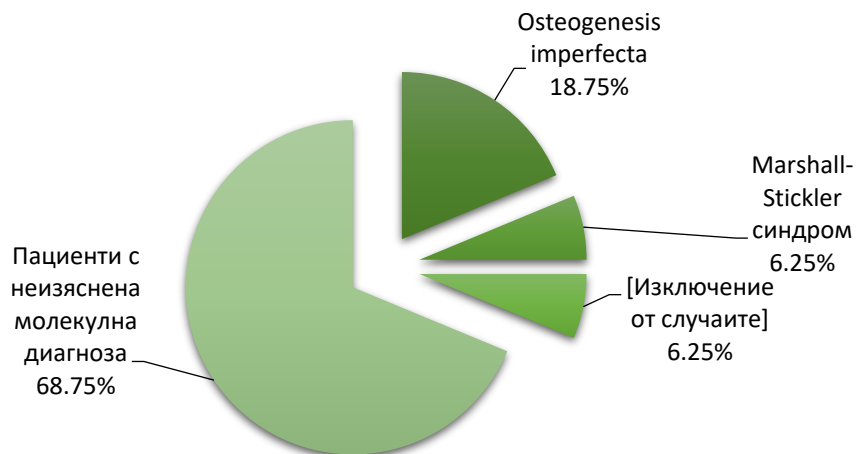
*COL1A1:c.2784delT;p.Gly929AlafsTer179;*

*COL1A1:c.579delT;p.Gly194ValfsTer71*

При един пациент с диагноза синдром на Marshall-Stickler беше открита непубликувана в световен мащаб патологична мутация *COL11A1:c.3474+1G>A*. Като

допълнение при един пациент с неясна клинична диагноза Osteogenesis imperfecta се откри непубликувана в световен мащаб находка хемизиготна микроделция на дългото рамо на X хромозомата в район 23 (Xq23).

Процентното съотношение на откритите патологии в изследваната група от 13 неродствени пациента е представено на Фигура 52.



**Фигура 52.** Процентно съотношение на изяснените и неизяснени на молекулно ниво патологии сред групата на колагенозите.

Благодарение на въведените методи за диагностика на заболявания, свързани с нарушения в колагена, стана възможно провеждането на адекватна и навременна генетична консултация, профилактика и пренатална диагностика в засегнатите семейства.

## ИЗВОДИ

1. Подбраният панел от гени (*FGFR3*, *FGFR2*, *COL1A1*, *COL1A1*, *COL11A1* и *COL2A1*) за анализ на пациенти, страдащи от нарушения в хрущялната и съединителна тъкан доведе до изясняване на молекулната диагноза при 47% от случаите.
2. Въведените и оптимизирани скринингови методи успешно откриват генетични варианти в прицелните гени.
3. От генетично верифицираните диагнози, засягащи хрущялната тъкан, най-висок процент се пада на Ахондроплазията (40%), на второ място Хипохондроплазия (22.86%) и при двама пациента е доказан Apert синдром.
4. Получените резултати за честота и спектър на мутациите при скелетните дисплазии са в съответствие с литературните данни.
5. Хипомеланоза на Ito (първият описан случай в България) може да се дължи на сложна хромозомна реаранжировка, представляваща интерстициална 15q11.2q13.3 трипликация.
6. De novo хетерозиготен вариант в *MNI* гена, се асоциира с C-terminal truncation syndrome, описан за пръв път в България.
7. От генетично верифицираните нарушения в съединителната тъкан 18.75 % попадат в *COL1A1* гена.
8. Доказаните мутации в *COL1A1* гена са от типа frameshift, възникнали в участък със специфична геномна архитектура богата на перфектни или полуперфектни симетрични повтори.
9. Фамилен случай на Marshall-Stickler синдром е асоцииран с мутация в *COL11A1* гена.
10. X- свързана доминантна остеопороза и чувствителност към остеопоротични фрактури с висока пенетрантност при мъже, се асоциират с X-хромозомна делеция, обхващаща гените *PLS3* и *SLC6A14*.
11. На базата на получените резултати от молекулярно-генетичните изследвания е възможно извършването на адекватно генетично консултиране и пренатална диагностика в засегнатите семейства.

## ПРИНОСИ:

## МЕТОДИЧНИ:

С настоящия труд бяха разработени собствени методики за молекулярно-генетична диагностика на заболявания с нарушения в хрущялната и съединителната тъкан.

## НАУЧНО-ТЕОРИТИЧНИ:

1. Бяха проведени изследвания върху механизмите на мутагенеза в човешкия

---

геном и участието на околната секвенция в геномната архитектура в провокирането на мутационните събития.

2. Бяха интерпретирани модели на мутагенеза с участието на прави, обратни повтори и симетрични елементи, провокиращи формирането на алтернативни вторични структури.

### **ПРИЛОЖНО-ДИАГНОСТИЧНИ ПРИНОСИ:**

Общо 47% от засегнатите семейства бяха генетично верифицирани, генетично консултирани и подготвени за пренатална диагностика.

### **НАУЧНИ ПРИНОСИ КЪМ СВЕТОВНИТЕ БАЗИ ДАННИ:**

1. Беше открит първият български случай на Хипомеланоза на Ito, асоцииран с интерстициална 15q11.2q13.3 трипликация, което представлява и първият случай на трипликация в световен мащаб.

2. Беше открит първият български случай на *de novo* хетерозиготен вариант с.3743G>A, p.Trp1248fsTer в MN1 гена, свързан с C-terminal truncation syndrome.

3. Беше открит първият фамилен случай на Marshall-Stickler в България, асоцииран с мутация *COL11A1*:с.3474+1G>A.

## 12. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Acuna-Hidalgo R et al (2016) *Genome biology* 17.1.
2. Albena Todorova et al (1997) *Hum Mut.* 9:537-547
3. Akawi et al., (2011) *American Journal of Medical Genetics Part A* 155.6: 1236-1245.
4. Annunen et al., (1999) *Science* 285.5426: 409-412.
5. Aravidis C et al (2014) *J Matern Fetal Neonatal* 27:1502–6.
6. Ayme et al., (1984) *Journal of medical genetics* 21.1: 34-38.
7. Barbosa M et al (2009) *Am J Med Genet.* 2009;149A:260.
8. Bellus et al.,(1996) *Nature genetics* 14.2 : 174-176.
9. Ben Amor et al., (2011) *Applied and environmental microbiology* 77.19: 6788-6793.
10. Bernard et al., (1999) *Journal of Cognitive Psychotherapy* 13.2: 121-132.
11. Bhadriraju et al., (2009) *Biomaterials* 30.35: 6687-6694.
12. Bishop et al., (1994) *Genetics* 136.2: 619-639.
13. Blaschke et al.,(2000) *Journal of Biological Chemistry* 275.14 : 10370-10378.
14. Bochyńska, A. et al (2018) *Cells* 7, 17.
15. Bodolay E et al ( 2009) *Akadémiai Kiadó.* 150 (19)
  
16. Byers PH et al (2012) *Annu Rev Genet.*46:475-97.
17. Carter et al., (2001) *Current protocols in neuroscience* 15.1: 8-12.
18. Cassidy S et al (1996) *Am J Med Genet Part A* 62:206(A4).
19. Castronovo C et al (2014) *Am J Med Genet Part A* 9999:1–10.
20. Chen et al., (2008) *Nature* 453.7196: 761-762.
21. Chadwick D et al (1996) *Am J Hum Genet* 59A114(627).
22. Clayton-Smith J et al (1993) *J Med Genet* 30:529–531.
23. Chellaiah et al(1994)*Journal of Biological Chemistry*, Volume 269, Issue 15,
24. Cohen et al.,(1974) *The sociological review* 22.4: 527-555.
25. Crawford EC et al (1995) *Am J Hum Genet* 57A111(618).
26. Crolla JA et al (1995) *Hum Genet* 95:161–170.
27. Dailey et al., (2003) *J Cell Biol.*;161:1053–66.
  
28. Davidson L et al (2012) *World psychiatry* 11.2 (2012): 123-128.
29. Daubeney PE et al (1993) *J. Pediatr.* 1993; 152:715–6.
30. Eyre et al., (1987) *Methods in enzymology.* Vol. 144. Academic Press, 1987. 115-139.
31. Fanganiello R et al (2007) *Molecular Medicine.* Vol. 13. No. 7. BioMed Central, 2007.
32. Farmaditya EP et al (2013) *Report of Indonesian patients.* 2013; 54(3): e72-e75
33. Faqeih et al., (2009) *American Journal of Medical Genetics Part A* 149.3: 461-465.
34. Freeman et al., (2008) *Schizophrenia research* 102.1-3: 254-260.
35. Fonseca R et al (2008) *Am J Med Genet A*146:658–60.
36. Fujimoto et al., (1977) *Biochemical and biophysical research communications* 76.4: 1124-1129.
37. Geist et al., (2013) *Springer Science & Business Media.*
38. Gregory et al., (2000) *Psychology Press*, 2000.
39. Griebel V et al (1998) *Neuropediatrics* 20:234–7.
40. Gripp et al.,(1998) *Journal of the American Cancer Society* 83.8: 1495-1503.
41. Goriely,et al., (2012) *The American Journal of Human Genetics* 90.2: 175-200.
42. Henry et al., (1988) *Surgery* 104.6: 977-984.
43. Herrmann J et al (1975) *Birth Defects* 11:76–103
44. Hayes et al., (1999) *Acceptance and commitment therapy.* Vol. 6. New York: Guilford press

45. Hogart A et al (2010) *Neurobiol Dis.*38:181–91.
46. Holowinsky S et al (1993), *Am J Hum Genet* 53A:125.
47. Horton, J., et al (2009) *Journal of lipid research*,”50 Suppl(Suppl), S172–S177.
48. Huang B et al (1997) *Hum Genet*99:11–17.
49. Hulmes et al., (2008), MA: Springer 15-47.
50. Jesse P et al (2012) FRET
51. Jurgensen et al., (2011) *Gastroenterology* 141.5: 1593-1604.
52. Kimura et al. (1989) *American journal of human genetics* 45.6: 889.
53. Krejci et al., (2005) *Journal of cell science* 118.21: 5089-5100.
54. Kruszka, et al., (2016) *American journal of medical genetics Part A* 170.4: 918-929.
55. Lajeunie et al., (2000) *Child's Nervous System* 16: 645-658.
56. Lekanne D et al (1995) *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 54.2: 224-235.
57. Locke D et al (2004) *J Med Genet* 41:175–182s
58. Majava et al., (2007) *American Journal of Medical Genetics Part A* 143.3: 258-264.
59. Mak C et al (2020) *Journal of neurology* vol. 143,1 (2020): 55-68.
60. Marini J et al (2017) *Nat. Rev. Dis. Prim.* 3, 17052. 10.1038/nrdp.2017.52
61. Marshall et al.. (2012) *Nature* 491: 711-716.
62. Mendler et al., (1989) *The Journal of cell biology* 108.1: 191-197.
63. Melanie et al., (2010) *Achondroplasia: pathogenesis and implications for future treatment* 2:516–523
64. Mladenova et al (2019) *J Clin Med Genomics*
65. Michiko H et al (1996) *A neurocutaneous syndrome. Brain and Development* 9:141–53.
66. Mundhofir F et al (2013) *Singapore Med J* 54.3 (2013): e72-e75.
67. Nah et al., (1992) *Journal of Biological Chemistry* 267.31: 22581-22586.
68. Nehal K et al (1996) *Arch Dermatol* 132:1167-70.
69. Nicol L et al (2019) *Bone* 120:70-74.
70. Oganessian et al., (1997) *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 45.11: 1469-1480.
71. Orlova E et al (2017) *The Journal of Cl. Endocrinology & Metabolism* 102.9 3546-3556.
72. Ornitz DM. FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16:205–13.
73. Paley et al., (1988) *Journal of Pediatric Orthopaedics* 8.1: 73-92.
74. Pascual-Castroviejo I et al (2008) Springer Vienna page 363–85.
75. Pellegrino J et al (1995) *Hum. Genet.* 96: 485-489
76. Penrose L et al (1955) *Parental age and mutation* 269:312–3.
77. Pettigrew A et al (1987) *Am J Med Genet Part A* 28A:791–802.
78. Planté-Bordeneuve V., et al (2011) *The Lancet Neurology* 10.12 1086-1097.
79. Plotnikov, Alexander N., et al. (1999) *Cell* 98.5 641-650.
80. Przylepa et al..(1996) *Nature genetics* 13.4: 492-494.
81. Pugh et al., (1961) *Radiology* 76.1: 1-20.
82. Pujana M et al (2002) *Eur J Hum Genet*10:26–35
83. Ryan et al (1990) *Evolution* 44.2: 305-314.
84. Rauch F et al (2010) *Eur. J. Hum. Genet.* 18, 642–647
85. Reddy K et al (2000) *Clin Genet* 58:134–141
86. Ruggieri M et al (2000) *Journal of Child Neurology* 15:635–44
87. Rousseau F et al (1996), *Hormone research* vol. 45,1-2

88. Ruggieri M et al (2011) Medlink Corporation.
89. Ruggieri M et al (1996) *Neurology* 46:485–92
- 90.
91. Rutland BM et al (2006) *Pediatric Neurology* 34:51–4
92. Sandell et al., (1991) *The Journal of cell biology* 114.6: 1307-1319.
93. Shanske et al., (1997) *American journal of medical genetics* 70.2: 155-158.
94. Shanske, et al., (2007) *Pediatrics* 120.2: e436-e441.
95. Shiang R et al (1994) *Cell*. 1994; 78: 335-342
96. Shinde, et al., (2013) *Progress in polymer science* 38.3-4: 672-701.
97. Schiedel et al., (2012) *Gait & Posture* 36.3: 500-505.
98. Schinzel A et al (1994) *JMedGenet* 31:798–803
99. Song SH et al (2012) *Am J Med Genet A*.158A:2456
100. Stanescu, et al., (1990) *American journal of medical genetics* 37.3: 412-421.
101. Stickler et al., (2001) *Genetics in Medicine* 3.3: 192-196.
102. Stoll et al. (1989) *Clinical genetics* 35.2 88-92.
103. Stoller et al., (2009) *Journal of medical genetics* 46.4: 242-248.
104. Stratton et al., (1991) *Journal of food protection* 54.6: 460-470.
105. Superti-Furga, et al. (1995) *Bioessays* 17.4 321-330.
106. Takagi, et al. (2015) *Nature biotechnology* 33.5: 445-449.
107. Takahashi et al., (1990) *Electronics letters* 26.2: 87-88.
108. Tavormina, et al., (1995) *Nature genetics* 9.3: 321-328.
109. Tsumaki, et al., (1995) *Journal of Biological Chemistry* 270.5: 2372-2378.
110. Turleau, C et al (1986) *Hum. Genet.* 74: 185-187.
111. Ungaro P et al (2001) *J Med Genet* 38:26–34.
112. Uttarilli A et al (2019) *Bone* 120:204-211.
113. Vajo, (2000), *Endocrine reviews*.
114. Van Dijk et al (2013) *Am J Med Genet Part A*
115. Vialard Fet al (2003) *Am J Med Genet Part A* 118A:229–234
116. Vikkula et al., (1992) *Biochemical Journal* 285.1: 287-294.
117. Vintiner et al., (1991) *American journal of medical genetics* 41.1
118. Wilkie, A., et al. (1998). *Nature genetics* 9(2), 165–172.
119. Warman et al., (2010) *Am J Med Genet Part A* 155:943–968.
120. White et al (2016) *Routledge*.
121. Zhang, et al (2007) *Journal of the Electrochemical Society* 154.10 A910.
122. Zhidkova, et al., (1995) *Biochemical and biophysical research commun.* 214.1: 279-285.
123. Zhytnik et al (2019) *Frontiers in genetics* vol. 10 722. V
124. Xue, et al. (2014), *Genetics* 4.11 2167-2173.
125. Yamauchi et al., (2012) *Essays in biochemistry* 52: 113-133.
126. Yasoda et al., (2004) *Nature medicine* 10.1: 80-86.

#### Електронни източници

1. ENSEMBL. <http://www.ensembl.org/index.html>
2. Genetics home reference. <https://ghr.nlm.nih.gov/>
3. Human Genome Variation Society. <http://www.hgvs.org/mutnomen/>
4. Leiden Open Variation Database. <http://www.lovd.nl>
5. National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
6. National Institute of Health. <https://www.nih.gov/>

- 
7. PolyPhen-2: prediction of functional effects of human nsSNP2. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
  8. The Human Gene Mutation Database. <http://www.hgmd.org/>
  9. University of California Santa Cruz. In-Silico PCR. <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>

---

## ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Ив. Туртуриков, Сл. Атемин, **М. Младенова**, З. Павлова, Т. Тодоров, П. Димова, Н. Чилингирова, В. Митев, Алб. Тодорова (2021) Приложение на секвенирането от нова генерация в педиатрията: редки заболявания при скрининг в ранна детска възраст. Практическа Педиатрия брой 8/2021

**Mladenova, M.**, Todorov, T., Grozdanova, L., Mitev, V., & Todorova, A. (2021). Novel Mutation in the COL11A1 Gene Causing Marshall-Stickler Syndrome in Three Generations of a Bulgarian Family. *Balkan journal of medical genetics : BJMG*, 24(1), 95–98. Импакт фактор:0.88

**Mladenova M**, Koleva M, Rodopska E, Alexandrova I, Bojinova V, et al. (2019) Hypomelanosis of Ito and De novo Interstitial 15q11.2q13.3Triplication in Bulgarian Family. *J Clin Med Genomics* 7: 155. Импакт фактор: 0.20

**ОБЩ ИМПАКТ ФАКТОР: 1.08**

• **НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

Mladenova M, Emilova E ,Boneva I, Mitev V, Todorova A. (2017) Results from cytogenetics studies in pateient with reproductive problems  
12th Balkan Congress of Human Genetics, September 8-10, 2017, Plovdiv, Bulgaria. Session 8-II, Hall Plovdiv 1. Poster Presentation

Mladenova M,Glushkova M, Todorov T,Andonova S,Robeva R, Savov A (2017)Molecular-genetic test for identification of increased risk for development of premature ovarian failure and polycystic ovaru syndrome. Oral presentation

ПРОЕКТ № 7676/21.11.2017 г.; Договор № Д - 117/2018 от конкурс „Млад изследовател - 2018 г.“на МУ-София за финансиране на научни проекти