

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

\*\*\*\*\*

**МИХАЕЛА БОЙКОВА МЛАДЕНОВА**

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

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

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

**НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:  
Акад. Ваньо Иванов Митев, дм, дбн  
Проф. Албена Първанова Тодорова – Георгиева, дбн**

\*\*\*\*\*

**София, 2024**

Дисертационният труд съдържа 115 страници, 55 фигури и 20 таблици.

Цитирани са 126 литературни източника и 15 електронни източника.

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

Включените в дисертацията изследвания са извършени в:

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

Настоящите изследвания са финансирани частично от Съвета по медицинска наука на Медицински Университет – София по договори: № Д - 117/2018 г., ПРОЕКТ вх. № 7676/21.11.2017 г.

Дисертационният труд е представен на заседание на катедрен съвет на Катедра „Медицинска Химия и Биохимия“, Медицински Университет - София, на 29.09.2023 г. и насочен за защита към 30.01.2024 г.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 30.01.2024 г. в Катедра Медицинска Химия и Биохимия, Медицински Университет София, ул. Здраве 2, гр. София, пред научно жури в състав:

1. Доц. Д-р Любомир Митев, дм (рецензент)
2. Доц. д-р Мария Драгнева, дбн (рецензент)
3. Акад. проф. Румен Панков, дбн
4. Доц. д-р Светослав Димов, дбн
5. Проф. д-р Алексей Савов, дбн

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

## СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения .....	3
Резюме .....	4
Summary .....	6
Въведение.....	8
Цел и Задачи .....	9
Материали и методи.....	10
Резултати и обсъждане .....	12
Заключение .....	48
Изводи .....	52
Приноси.....	53
Библиография .....	55
Публикации и научни прояви .....	56

## **ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ**

FGFR1 - Fibroblast Growth Factor Receptor 1

FGFR2 - Fibroblast Growth Factor Receptor 2

COL1A1 - Collagen Type I Alpha 1 Chain

COL1A2 - Collagen Type I Alpha 2 Chain

COL11A1 - Collagen Type XI Alpha 1 Chain

COL2A1 - Collagen Type II Alpha 1 Chain

PCR/ПВР - Polymerase Chain Reaction (Полимеразна верижна реакция)

MLPA - Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

ARRAY - CGH-Array comparative genomic hybridization

NGS - Next-Generation Sequencing

WES - Whole Exome Sequencing

ДНК - Дезоксирибонуклеинова киселина

**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 термилиране 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. Делецията 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 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 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 живо родени деца [Ogioli, 2017]. Заболяванията варират като тежест от преждевременни артропатии до тежък дуарфизъм, водещ до 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. Примери за заболявания на съединителна 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 наследствени заболявания - Osteogenesis imperfecta, Marshall syndrome и Stickler syndrome.

**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.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

### 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.

### ЗАДАЧИ

1. Въвеждане и оптимизиране на молекулярно-генетичен подход за идентификация на патологични замени в гените *FGFR2*, *FGFR3*, *COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1* и *COL11A1*.
2. Подбор на група пациенти с клинична диагноза скелетни дисплазии и със заболявания с нарушения 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.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ

В рамките на настоящия дисертационен труд бяха проведени молекулно-генетични изследвания върху общо **75 пациенти**. На базата на клиничната диагноза пациентите бяха групирани както следва:

#### Група 1:

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

При тази група пациенти бяха извършени изследвания, касаещи гените *FGFR2* и *FGFR3*. Разпределението на изследваните пациенти по предполагаема диагноза и изследван ген е представено в Таблица 1. Генът *FGFR3* беше изследван при 35 пациенти, а генът *FGFR2* беше изследван при 6 пациенти.

#### Група 2:

##### **25 пациенти с предполагаема диагноза, засягаща 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 1.** 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>

## БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ

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

## МЕТОДИ

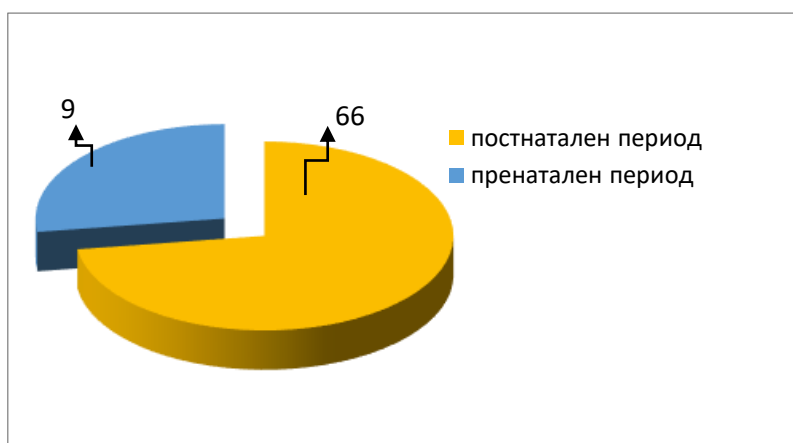
- ✓ **Преданалитична обработка на материала**
  - Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв по солеви метод
  - Изолиране на високомолекулна ДНК от хорионни вѐси и амниотични клетки чрез използване на хелекс 100 (Chelex®100)
  
- ✓ **Аналитична обработка на материала**
  - Полимеразна верижна реакция (Polymerase chain Reaction; PCR) на следните гени: *FGFR2*, *FGFR3*, *COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1* и *COL11A1*.
  - Електрофореза за оценка на качеството и количеството на амплификационния продукт в агарозен гел
  - Секвениране по Sanger с флуоресцентно белязани дидезокси нуклеотиди
  - Мултиплексна лигазно-зависима амплификация (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification, MLPA)
  - Кариотипиране
  - Оценка на нуклеотидната последователност на района около мястото на възникване на откритите патологични генетични варианти
  - 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
  - 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.

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



**Фигура 1.**  
Разпределение на пациентите, в зависимост от периода, в който са изследвани.

### ЗАБОЛЯВАНИЯ С НАРУШЕНИЯ В ХРУЩЯЛНАТА ТЪКАН

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

**Таблица 2.**

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

## 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.

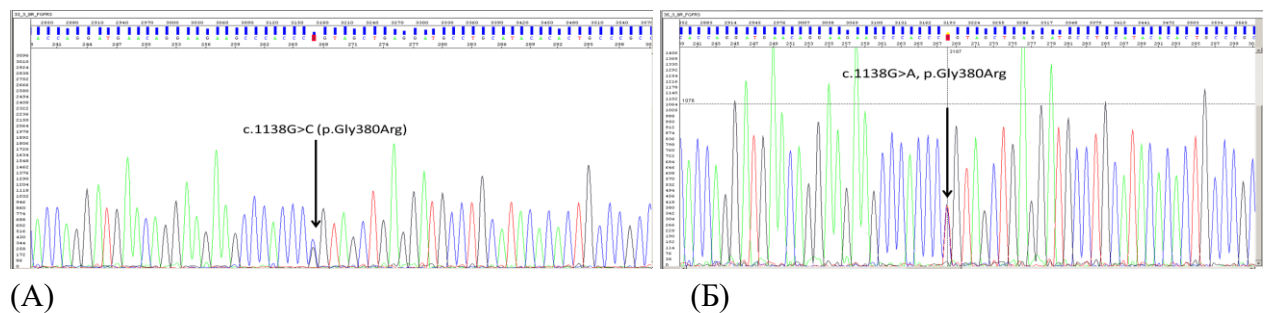
При изследваните 23 пациенти с ахондроплазия бяха открити 2 мутации в екзон 8 на *FGFR3* гена: c.1138G>A; p.Gly380Arg (при 12 от изследваните) и c.1138G>C; p.Gly380Arg (при 2-ма от изследваните). Общо при 14 пациента (~61%) диагнозата ахондроплазия е генетично верифицирана (Таблица 10). При всички доказани 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 3.** Представяне на получените резултати след анализ на *FGFR3* гена

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 2 са показани секвенционните профили на откритите мутации c.1138G>A (p.Gly380Arg) и c.1138G>C (p.Gly380Arg), водещи до ахондроплазия.



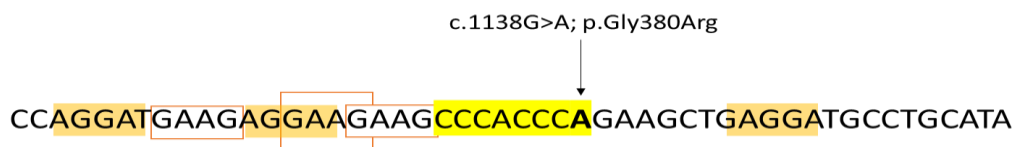
**Фигура 2.**

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 (с.1138G>A); трансверзията представлява замяна на пуринов нуклеотид с пиримидинов нуклеотид (с.1138G>C). Трансверзията с.1138G>C е с много по-ниска честота, отколкото транзицията с.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 с.1138 на гена. (Фигура 3).

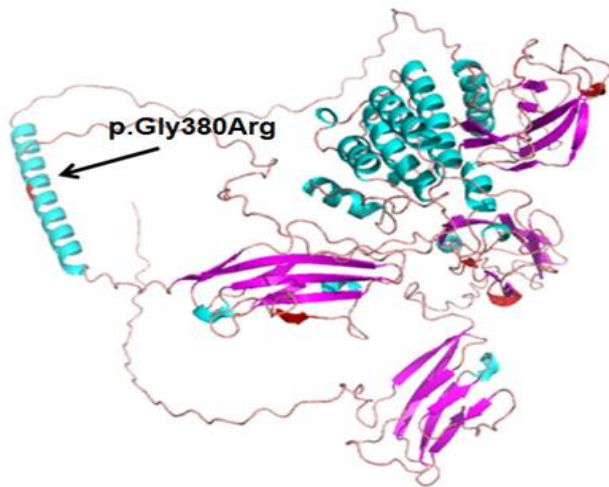
От интерес бяха нуклеотидни последователности като палиндроми, прави или обърнати повтори, симетрични елементи и други секвенционни мотиви, които биха могли да имат отношение към хода на ДНК полимеразата по време на репликацията.



**Фигура 3.** Анализ на околната секвенция в мястото на мутацията *FGFR3*:p.Gly380Arg.

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. Приви впечатление наличието на повтарящи се мотиви (AGGA),(GAAG) и в допълнение CCCACCC-симетричен елемент в близост до мутацията. Повтарящите се С-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 CCCACCCA. 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].

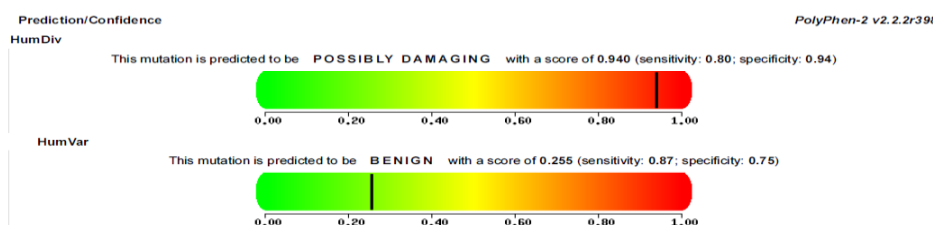
На Фигура 4 е представена пространствена структура на FGFR3 рецептора и мутацията p.Gly380Arg, която попада в алфа-спиралния участък от трансмембрания му домен.



**Фигура 4.** 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 [Bochyńska 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.

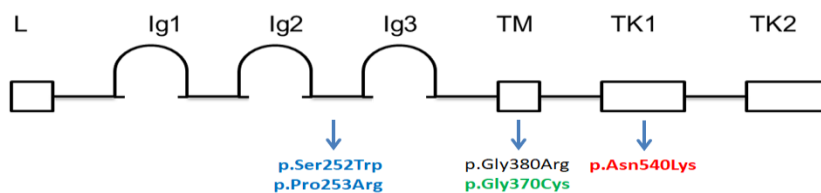
В допълнение, за оценка на патогенността на тази замяна е използван софтуер за математическа обработка (PolyPhen-2 prediction of functional effects of human nsSNPs), който прогнозира евентуалното влияние на аминокиселинната замяна върху структурата и/или функцията на белтъка (Фигура 5). Софтуерът представя 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 5.** 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 (TM) на FGFR3 рецептора (Фигура 6). TM 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 6.** 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 тирозиновите 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*, инхибиращо 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.

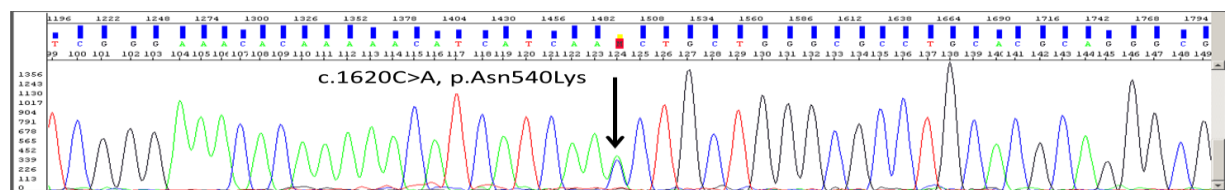
Изследваните пациенти с клинични данни за хипохондроплазия бяха общо 10 и резултатите от извършените анализи са представени на таблица 8. При 8 от пациентите беше открит патологичния вариант с.1620C>A, p.Asn540Lys в екзон 11 на *FGFR3* гена (Фигура 7), като при всички пациенти липсваха данни за фамилна 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 4.** Резултати от изследванията на пациенти за 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

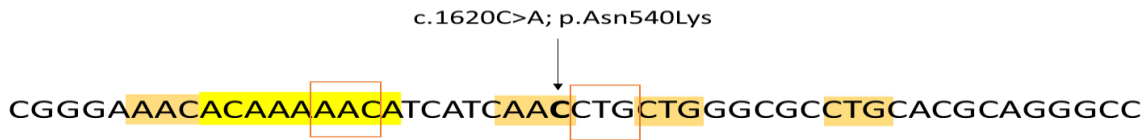
\* еднородни близнаци



**Фигура 7.** Секвенционен профил на мутацията с.1620C>A; p.Asn540Lys.

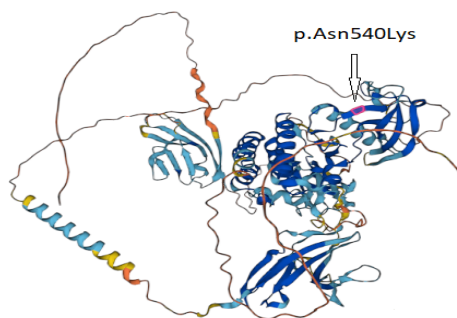
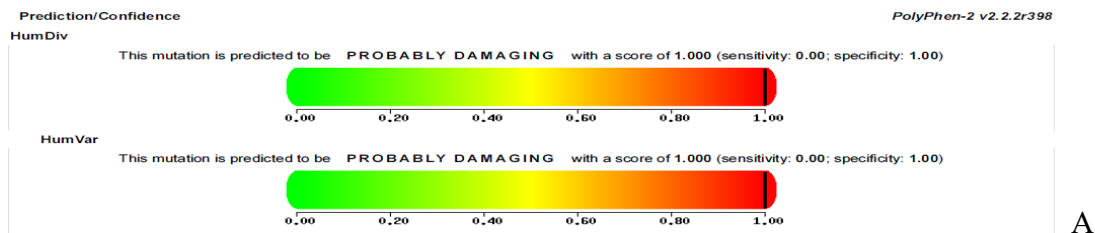
Мутацията с.1620C>A, p.Asn540Lys е разположена в АТР-свързващия сегмент на тирозин-киназия домен на FGF рецептора (виж Фигура 6 - отбелязано с червено). По литературни данни този патологичен вариант е един от двата най-често срещани при пациенти с хипохондроплазия. Откритата мутация е от типа трансверзия - замяна на пиримидинов с пуринов нуклеотид. По аналогия с честата мутация при ахондроплазия, беше анализиран района около замяната с.1620C>A. Прави впечатление, че триплетта, в който настъпва мутацията, както и нуклеотидната последователност преди нея, са -ААС-богати директни повтори (Фигура 8). Непосредствено преди мутацията има симетричен елемент -АСАААААСА-, отново заграден и от вдете страни с прави повтори -ААС-, като във втория -ААС- триплет настъпва нуклеотидната замяна. Освен това, нуклеотидната последователност след

замяната е богата на СТГ 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 8.** Анализ на региона от FGFR3 гена, в който попада мутацията c.1620C>A, p.Asn540Lys

За оценка на патогенността на замаяната p.Asn540Lys беше използван предиктора PolyPhen2 (Фигура 9А). На същата фигура (Фигура 9Б). е представен и пространствен модел на FGFR3 рецептора, като мутацията p.Asn540Lys попада в тирозин-киназия домен 1.



Б

**Фигура 9.** А-Резултат от online софтуерния предиктор Polyphen2 за оценка на патогенността на мутацията FGFR3:p.Asn540Lys. Б- Пространствена структура на

FGFR3 рецептора, моделирана с помощта на AlphaFold2. Със стрелка е отбелязана мутацията p.Asn540Lys, 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 amidна група в страничния радикал) с лизин (с amino 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.

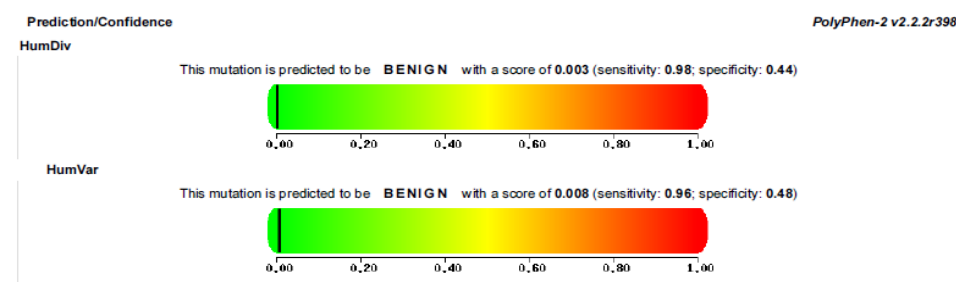
## СИНДРОМ НА MUENKE

Таблица 5. Резултати на пациенти, изследвани за синдром на Muenke.

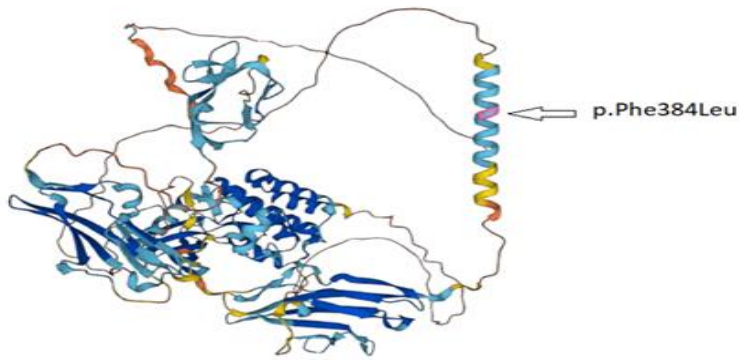
№	ген	Екзон	Нуклеотидна замяна	Аминокиселинна замяна	Диагноза
1	<i>FGFR3</i>	1-17	c.1150C>T	p.Phe384Leu	синдром на Muenke
2	<i>FGFR3</i>	1-17	-	-	синдром на Muenke

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 c.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 c.1150C>T, p.Phe384Leu в екзон 8 на *FGFR3* гена. Откритата нуклеотидна замяна променя кодона TTC, кодиращ аминокиселината фенилаланин (съдържа ароматен пръстен) в CTC, който кодира аминокиселината левцин (неполярна, алифатна аминокиселина). Аминокиселината p.Phe384 се намира в регион от трансмембранния 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 10А), който еднозначно оцени откритата замяна като непатогенна (индекси на двата метода за оценка – съответно 0.003 и 0.008).



A



Б

**Фигура 10.** 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 замяната p.Phe384Leu.

Направената литературна справка за p.Phe384Leu потвърди, че замяната 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 замяната p.Phe384Leu [Thatiane Yoshie Kanazawa, 2014].

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

Откритите генетични варианти с.1138G>A, с.1138G>C и с.1620C>A във *FGFR3* гена засягат различни екзони и попадат в различни домени на протеина – съответно трансмембрания домен и тирозин киназните домени (фигура 6). Въпреки това, между мутациите p.Asn540Lys и p.Gly380Arg, причиняващи съответно Хипохондроплазия и Ахондроплазия се наблюдават много сходства, свързани с повишената активност на кодиращия 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, 1955; Stoll, 1982]. *De novo* мутации, причиняващи ахондроплазия засягат по-често бащиния алел, в резултат на герминативен мозаицизъм в хода на сперматогенезата [Wilkin, 1998].

## РЕЗУЛТАТИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНАТА ГРУПА ПАЦИЕНТИ С FGFR2-СВЪРЗАНИ СИНДРОМИ (СКЕЛЕТНИ ДИСПЛАЗИИ *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 6.

**Таблица 6.** 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
Сrn 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 пбструкция 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

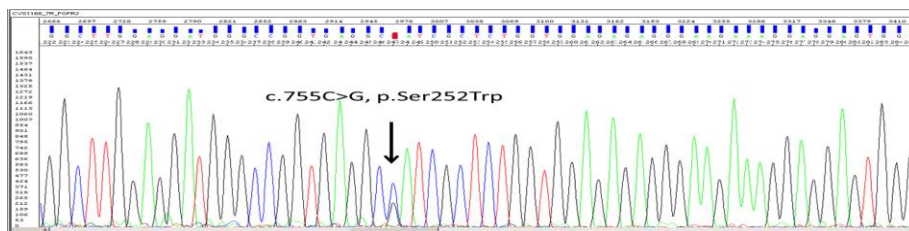
Пациентите, насочени за генетично изследване във връзка с клинични данни за *FGFR2*-свързани синдроми бяха общо 6. На таблица 7 са показани получените резултати след проведените молекулярно-генетични изследвания.

**Таблица 7.** Резултати на пациенти изследвани за синдроми, свързани с *FGFR2* гена.

№	Екзон	Нуклеотидна замяна	Аминокиселинна замяна	Диагноза
1	7	c.755 C>G	p.Ser252Trp	Apert синдром
2	7	c.755 C>G	p.Ser252Trp	Apert 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 Apert синдром беше открит патологичния вариант c.755C>G, p.Ser 252Trp в екзон 7 на *FGFR2* гена (Фигура 11).

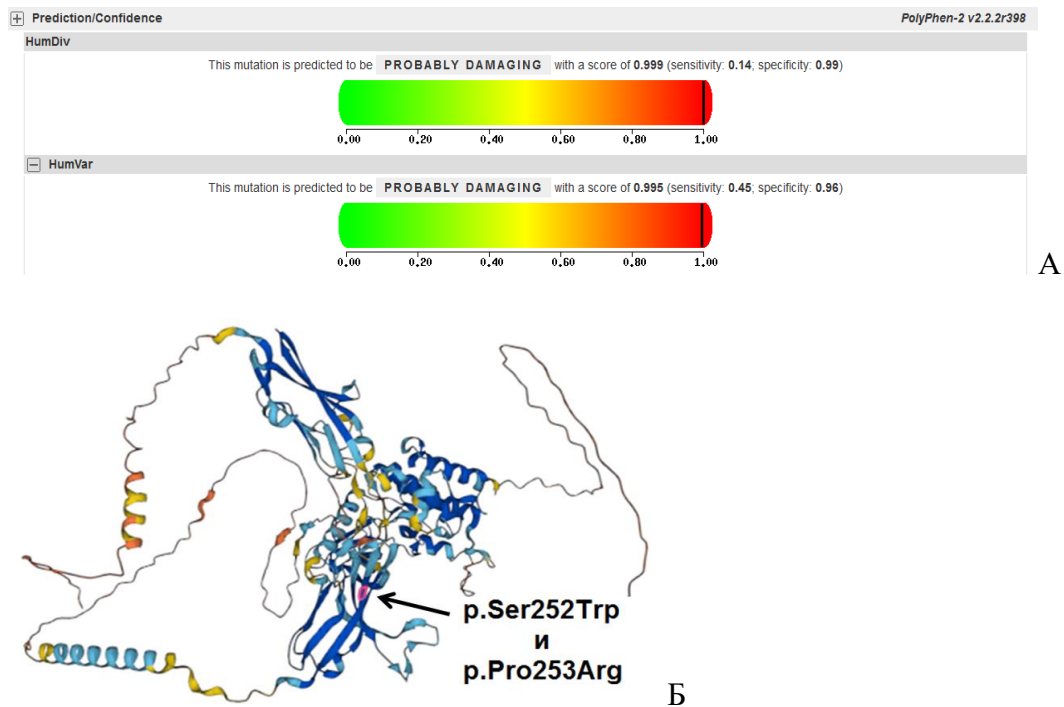
При 4 пациенти с предполагаема клинична диагноза скелетна дисплазия изследването включваше секвениране на всички екзони от *FGFR2* гена, което не доведе до откриването на молекулен дефект. Диагнозата при тези 4 пациента подлежи на ревизиране, тъй като беше изключен Apert синдром.



**Фигура 11** Секвенционен профил на мутацията c.755C>G, p.Ser 252Trp в екзон 7 на *FGFR2* гена при пациент с Apert синдром

**Синдромът на Apert** 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 Apert 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 трансверзия и прави впечатление, че те засягат два съседни кодона. Аналогично на мутациите във *FGFR3* гена, беше извършен анализ на околната нуклеотидна последователност в региона на двете мутации (Фигура 12). Прави впечатление наличието на палиндром CCGG и на множество прави и обратни повтори, които са C/T богати. Тези повтори заграждат симетрични елементи, с чието участие може да се обясни генерирането на мутационните преобразувания. Анализиранияте повтори биха могли да имат отношение към формирането на вторични структури, възпрепятстващи нормалните функции на полимеразата, което да обясни независимото възникване на мутационното събитие в една и съща позиция на генетичната последователност на *FGFR2*.



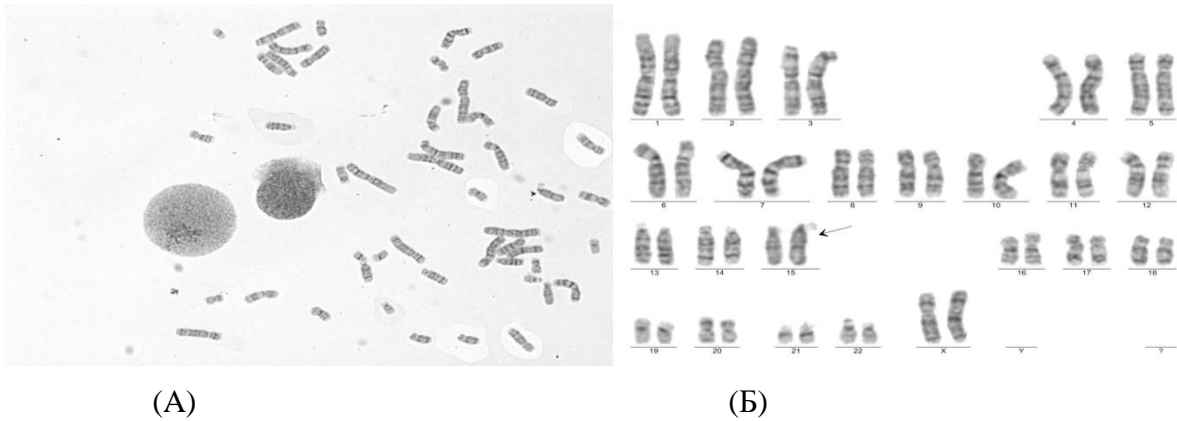


**Фигура 13.** А-Резултат от online софтуерния предиктор Polyphen2 за оценка на патогенността на мутацията FGFR2:p.Ser 252Trp; Б Пространствена структура на FGFR2 рецептора, моделирана с помощта на AlphaFold2 Със стрелка са отбелязани двете замени p.Ser252Trp и p.Pro253Arg, разположени една до друга

## ПАЦИЕНТИ СЪС СКЕЛЕТНА ДИСПАЗИЯ И НЕИЗЯСНЕН МОЛЕКУЛЕН ДЕФЕКТ

След проведени молекулярно-генетични изследвания върху гените *FGFR3* 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:

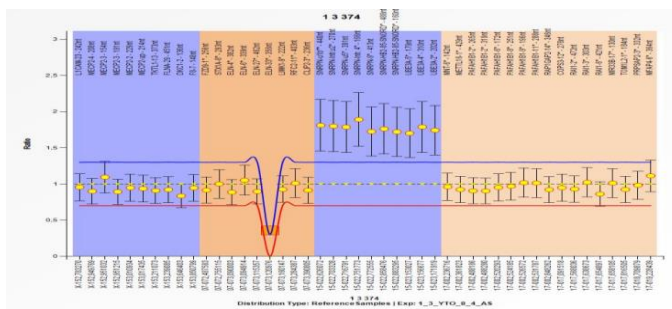
Първият пациент първоначално беше насочен с предполагаема клинична диагноза ахондроплазия, но впоследствие диагнозата беше ревизирана. Описани бяха нисък ръст, нестабилна походка, забавено невропсихомоторно развитие, дисморфични черти, микроцефалия и поява на унилатерална хипопигментация. В хода на диагностичното уточняване на пациента, започнаха да се обсъждат нови диагнози, поради комбинацията от дисморфични черти и кожни лезии, една от тях беше хипомеланоза на Ito (OMIM\*300337). На базата на тази информация беше проведено цитогенетично изследване (кариотипиране), при което се откри интересна и непубликувана до момента находка (Фигура 14).



**Фигура 14.**

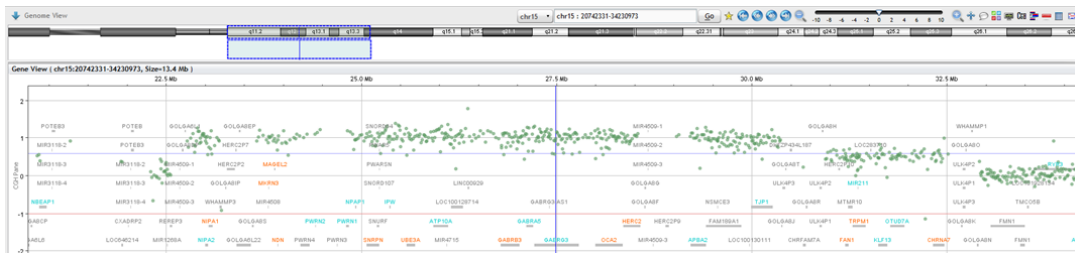
(А) Микроскопска снимка на метафазната пластинка, показваща dup(15)(q11.2q13.3);  
 (Б) Кариотип на пациента, със стрелка е обозначена откритата dup (15)(q11.2q13.3).

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 15)



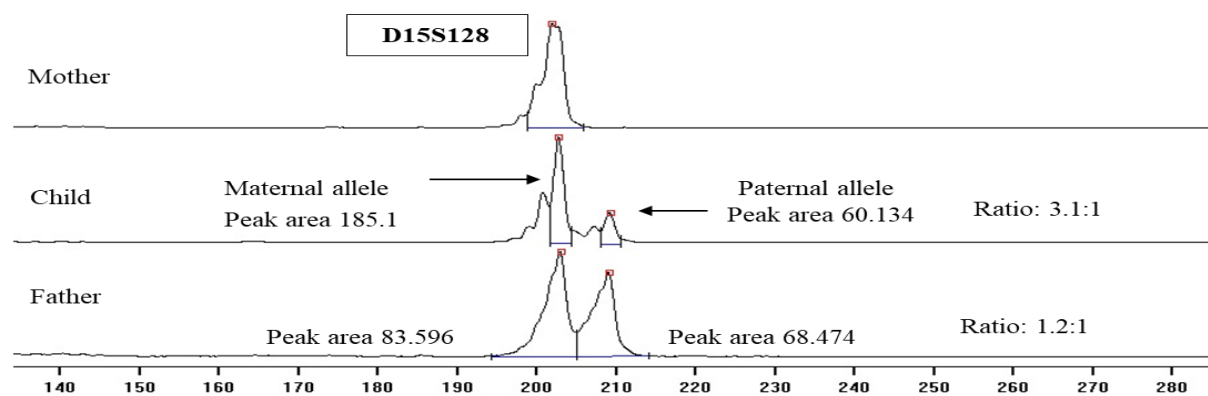
**Фигура 15.** MLPA профил, указващ допълнителен материал в дългото рамо на хромозома 15 в района 15q11.2.

За да бъдат изяснени границите на дупликацията, беше извършен aCGH анализ (Фигура 16), при който беше разкрита следната находка: arr [GRCh37] 15q11.2q13.3 (22,558,697-30,366,124) x4, 15q13.2q13.3 (30,652,489-32,462,701) x3.



**Фигура 16.** aCGH профил, указващ границите на дупликация (15)(q11.2q13.3), открита при индексния пациент: arr[GRCh37] 15q11.2q13.3 (22,558,697-30,366,124)x4, 15q13.2q13.3 (30,652,489-32,462,701)x3.

Като последна стъпка беше проведен сегрегационен анализ в семейството чрез QF-PCR на полиморфни локуси, за да идентифицираме произхода на хромозомното пренареждане. За анализ бяха избрани следните 6 маркери, локализирани на хромозома 15: D15S1513, D15S657, D15S643, D15S659, D15S128 и D15S822. Първите четири се оказаха неинформативни, докато последните два доказаха майчин произход на допълнителния материал върху хромозома 15q (Фигура 17).



**Фигура 17.** Сегрегационен анализ чрез QF-PCR на полиморфния маркер D15S128 в семейство с хипомеланоза на Ito. Сегрегационният анализ показва майчин произход на допълнителния материал върху хромозома 15q, съотношение на площите на майчин алел : бащин алел 3:1.

След направена литературна справка се оказва, че проксималният край на дългото рамо на хромозома 15 е склонен към цитогенетични аномалии от типа на делеции, дупликации, трипликации, транслокации и инверсии, както и инвертирани дупликации (15) [Castronovo et. al., 2014]. По литературни данни тези хромозомни 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 17, 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 [Pujana 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 7

**Таблица 7.** Резултати от проведеното екзомно секвениране.

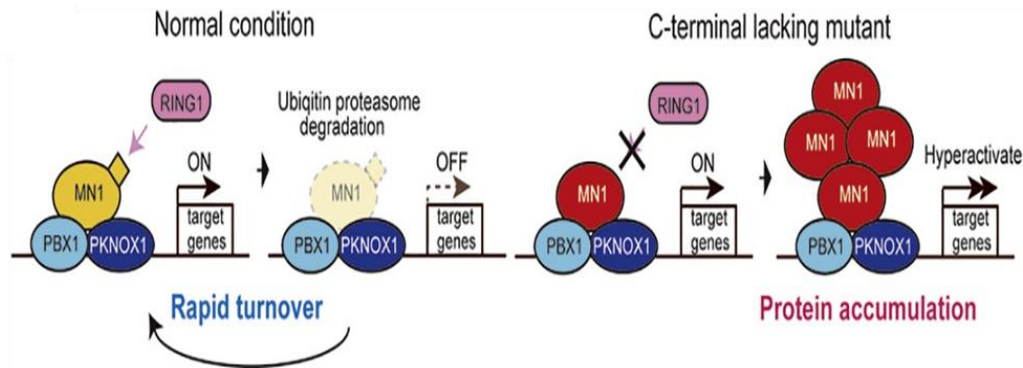
Ген	Вариант (UCSC,hg19)	Промяна на ниво транскрипт	Промяна на ниво аминокиселини	Тип вариант	Зиготност
MN1	Chr.22:g.28192789C>T	NM_002430.3: с.3743G>A	p.Trp1248Ter	Stop codon	Хетерозигот (De novo)

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.

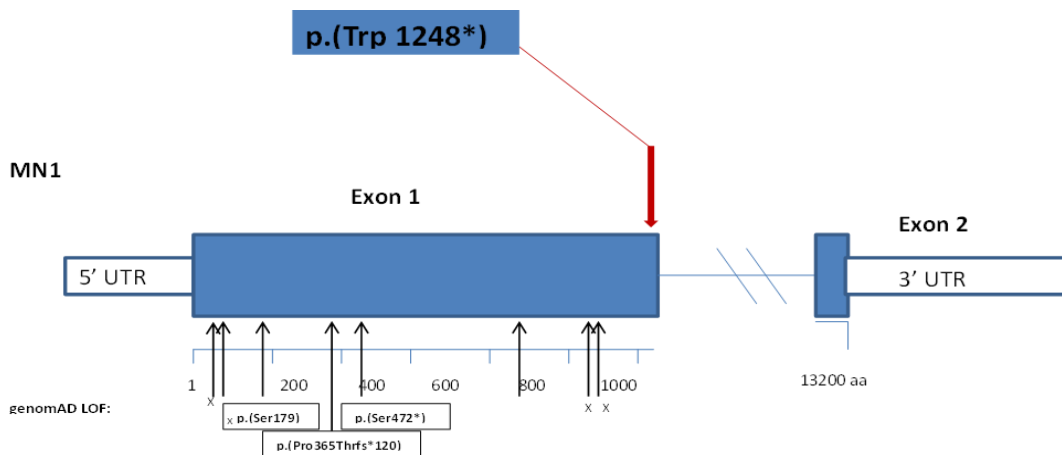
Генът *MN1* кодира транскрипционен кофактор, който е бил идентифициран за първи път като онкоген в менингиом [Lekanne et al., 1995]. Той си взаимодейства с други транскрипционни фактори, които се прикрепят към специфични области на ДНК и влияят на експресията активността на определени гени. Смята се, 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 Е3-убиквитинова лигаза. Въз основа на литературни проучвания, моделът,

според който С-терминалната делеция пречи на взаимодействащите молекули на *MN1*, свързани с убиквитин-медиирания 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 18).



**Фигура 18.** Патомеханизъм в резултат от С-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 19).



**Фигура 19.** Локализация Разпределение на С-терминиращата мутация с.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 19) се очаква да доведат до *MN1* транскрипти, които избягват nonsense-медирано разпадане на иРНК. Това предполага, че генетичните вариантите на *MN1*, засягащи този регион могат да доведат до експресията на С-крайно пресечен протеин (C-terminally truncated protein) с патогенен ефект. Уникалните фенотипове, свързани със С-терминални отрязващи мутации, които избягват nonsense-медирано разпадане на иРНК, са докладвани и за няколко други гена [White, 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' край на екзон 1 или в екзон 2) е нуклеотиден състав на този регион. Мутацията p.Trp1248Ter се генерира от преход G>A при CpG динуклеотид. Този мутационен профил е свръхпредставен сред мутациите на човешка зародишна линия [Acuna-Hidalgo, 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) (RMID:31834374)

МСТТ синдрома 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 сензоневрална)
- 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 леко 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, 2011; Davidson, 2012; Mak, 2020].

В подкрепа на предположенията за патогенната природа на варианта са:

- ✓ Предишни доклади за патогенната природа на stop кодон варианти в *MNI* гена (PMID:31834374)
- ✓ Stop кодон варианти в този регион на гена са съобщавани като патогенни в LOVD базата данни (напр.: p.Glu1249fsTer, p.Glu1260Ter, p.Gln1273Ter и др.)
- ✓ *De novo* произхода на варианта
- ✓ Отсъствието на варианта от всички контролни популации по проекта gnomAD

Откритият при нашия пациент генетичен вариант c.3743G>A в *MNI* гена не е докладван досега в световната база данни.

## 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.

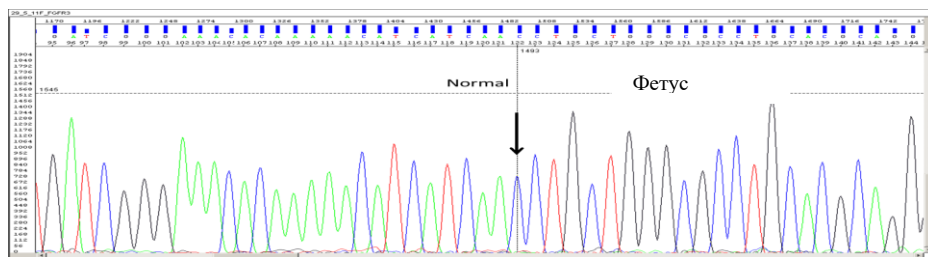
В Таблица 8 са представени клиничните данни и поводът за провеждане на дородова инвазивна процедура, както и резултатите от генетичния скрининг за мутации във *FGFR3* гена.

**Таблица 8.** 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 20).

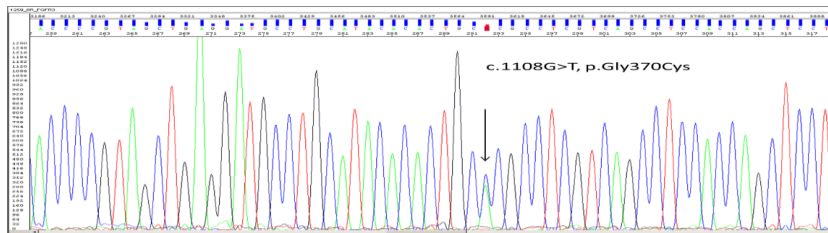


**Фигура 20.** Секвенционен профил от пренатална диагностика в семейство с хипохондроплазия. Фетусът не е унаследил фамилната мутация *FGFR3*:c.1620C>A, p.Asn540Lys.

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 **третия** 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* 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 21.

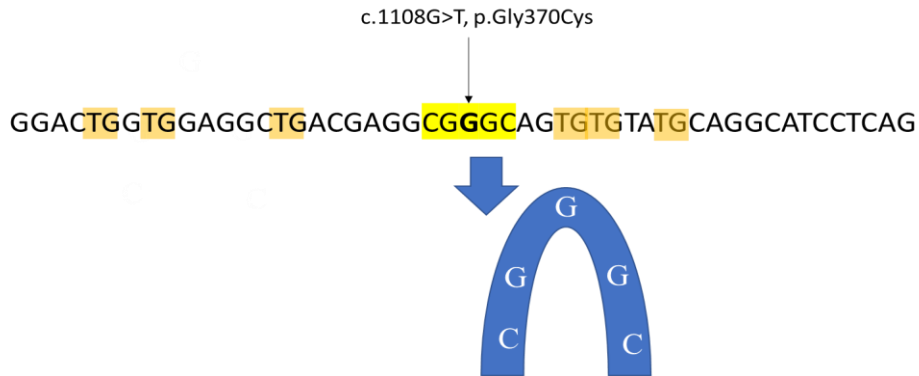


**Фигура 20.** Секвенционен профил на патогенния генетичен вариант *FGFR3*:c.1108G>T, p.Gly370Cys от пренатална диагностика, насочена по УЗ данни за скелетни аномалии.

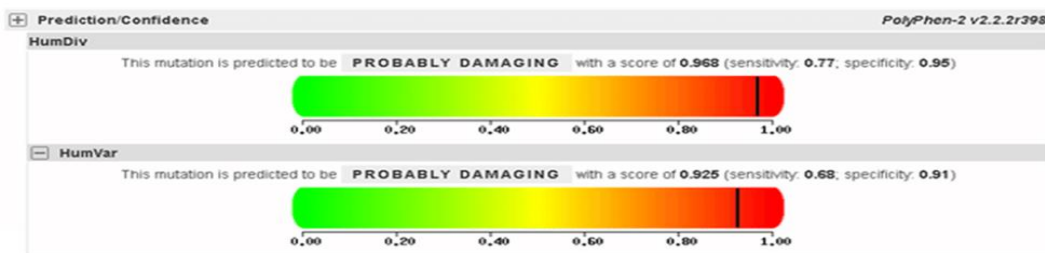
Танатофорна дисплазия (Thanatophoric dysplasia) представлява тежка форма на скелетна дисплазия, характеризираща се с множество скелетни малформации, като силно скъсени крайници и наличие на допълнителни кожни гънки на ръцете и краката. Танатофорна дисплазия тип I се характеризира с нормален череп и извити бедрени кости и се асоциира с патологични генетични варианти в *FGFR3* гена. Откритият вариант c.1108G>T, p.Gly370Cys е локализиран в екзон 10 на гена и е съобщаван в базите данни. Промененият кодон 370 попада в района на вътреклетъчния трансмембрания киназен домен (ТМ) на FGF рецептора (виж Фигура 6 - в зелено), който функционира чрез димеризация и след фосфорилиране.

Мутацията c.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 инициират 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 28). 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,

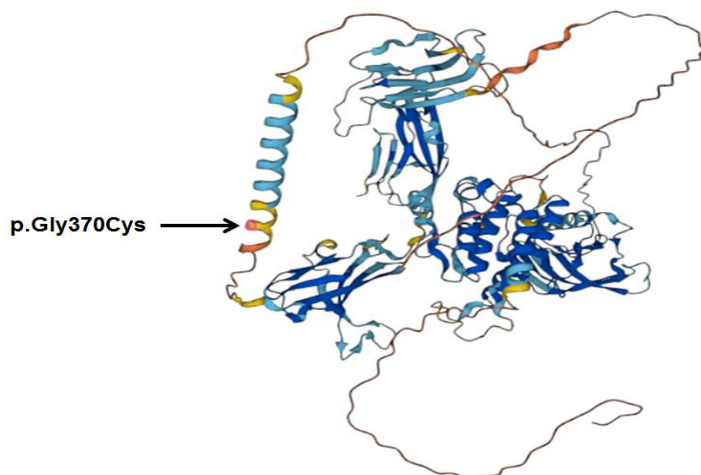
възпрепятстващи нормалните функции на полимеразата, което би могло да обясни възникването на мутацията в конкретна нуклеотидна позиция. Изчисленият коефициент на патогенност за мутацията с.1108G>T, p.Gly370Cys от предиктора PolyPhen2 е 0.95, което съответства на висока вероятност за патогенност (Фигура 29)



**Фигура 28.** 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 29.** А-Резултат от online софтуерния предиктор Polyphen2 за оценка на патогенността на мутацията *FGFR3*: с.1108G>T, p.Gly370Cys; Б- Пространствена структура на *FGFR3* рецептора, моделирана с помощта на AlphaFold2. Със стрелка е отбелязана замената 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 изявява 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 пациента бяха разпределени в групи по гени, съответстващи на дадената анамнеза и клинична диагноза.

В таблица 9 са представени групите пациенти, изследвани съответно за гените *COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1*, *COL11A1*, групирани по пол.

Таблица 9. Разпределение на пациентите по 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 11). 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 11.** Представяне на получените резултати след анализ на *COL1A1* гена.

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

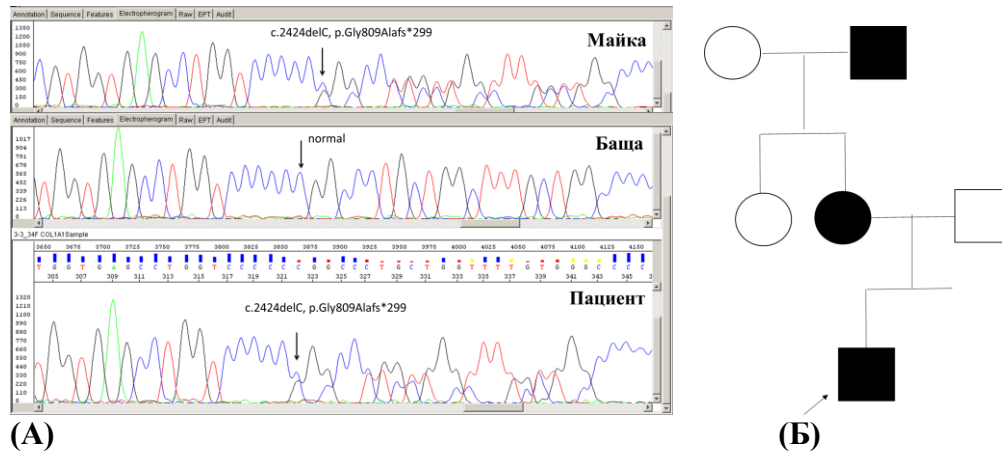
\*Семейство №1 / \*\*Семейство №2 / \*\*\*Семейство №3

### Семейство №1

Семейството беше насочено към 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 p.Gly809AlafsTer299 в екзон 36 на *COL1A1* гена. Генетичната находка е от типа мутации с изместване рамката на четене (т.нар. frameshift мутация) и делеция на един или няколко нуклеотида. 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 индексния пациент вариант p.Gly809AlafsTer299 представлява делеция на един С нуклеотид на 809 позиция в протеина, което води до изместване рамката на четене и преждевременно прекратяване на белтъчната синтеза след 299 кодона, заради генерирането на нов стоп-кодон.

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 молекулен дефект. Доказано беше хетерозиготно носителство на патологичния генетичен вариант *COL1A1*: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 19)



**Фигура 19.**

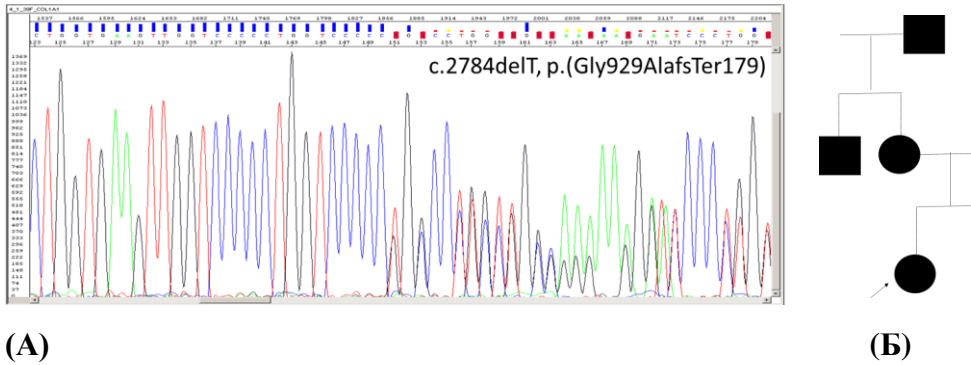
(А) Секвенционен профил на фамилната мутация COL1A1:p.Gly809AlafsTer299;  
 (Б) Родословно дърво на семейството, със стрелка е показан пробанда.

### 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 20



**Фигура 20.**

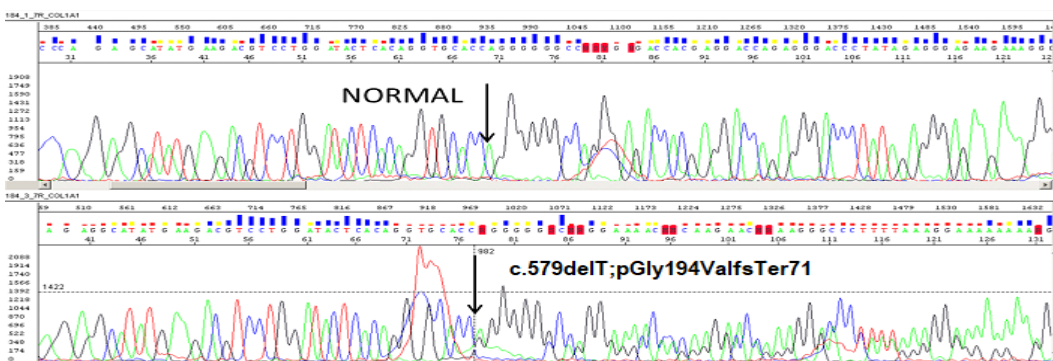
- (А) Секвенционен профил на фамилната мутация COL1A1: p.Gly929AlafsTer179;
- (Б) Родословно дърво на семейството, със стрелка е показан индексният пациент.

### 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 p.Gly194ValfsTer71 в 7 екзон на гена.

Откритият вариант p.Gly194ValfsTer71 представлява делеция на един Т 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 21).



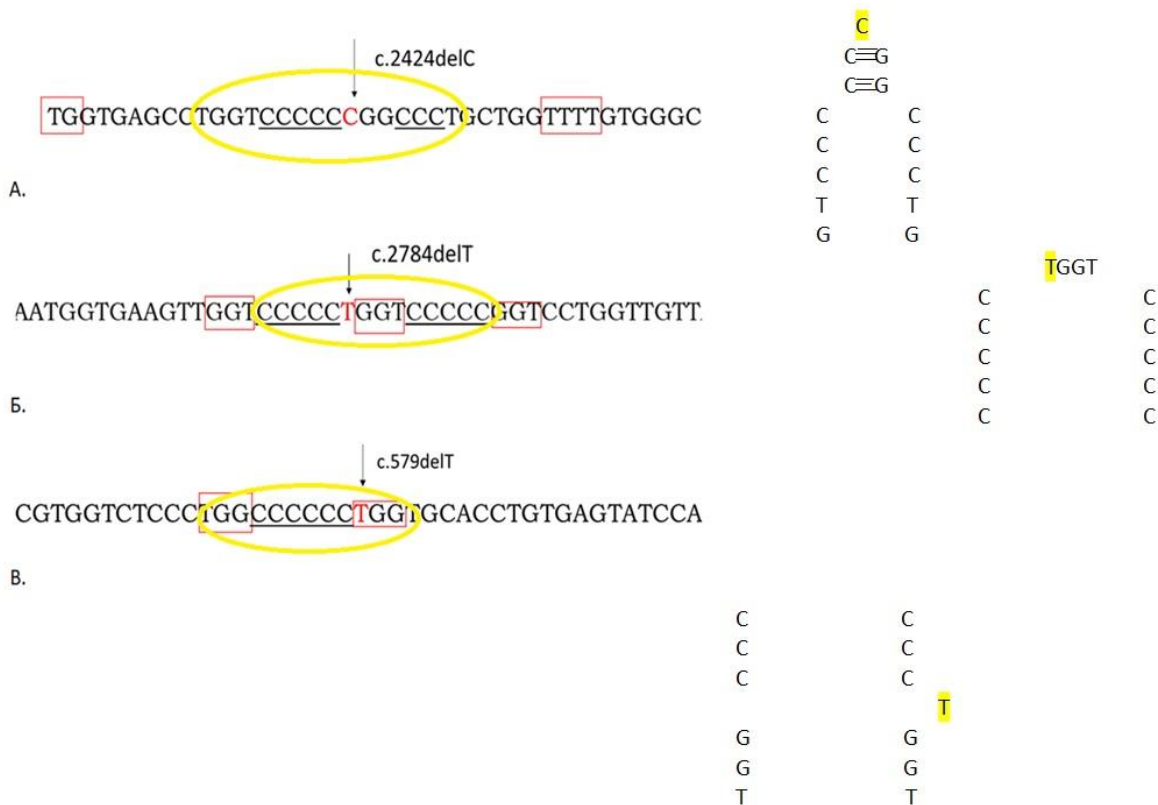
**Фигура 21.** Секвенционен профил на de novo възникналата мутация COL1A1:c.579delT в COL1A1 в изследваното семейство

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 дилетирания 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 полимеразата да създаде абсолютна симетрия в района. (Фигура 22 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 22 Б), които заграждат мястото на мутацията. В допълнение е налична петплетната С-богата последователност, която загражда позицията на дилетирания Т нуклеотид. Прави впечатление, че целият район около мястото на възникване на мутацията е богат на повтарящи се елементи, включително и съвършен симетричен елемент CCCCCTGGTCCCCC, 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 22 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 (Фигура 22)



**Фигура 22.**

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

А. 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 иницира 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 предизвикат количествени изменения в белтъчния продукт, асоциирани с по-лека клинична симптоматика;
- 3) Генетичните варианти могат да предизвикат 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 (каквото 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 array CGH анализ. Резултатите от проведената сравнителна геномна хибридизация

показаха наличие на делеция върху X-хромозомата Таблица 12. 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 12.** Резултатите от проведения array-CGH анализ.

Гени	Вариант (UCSC,hg19)	Тип на варианта/ патогенност
PLS3, SLC6A14	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 [Mannu et. al., 2017, Kampe et.al., 2017]. В подкрепа на патогенната природа на варианта и асоциацията му с клиничната изява на 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



## 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.

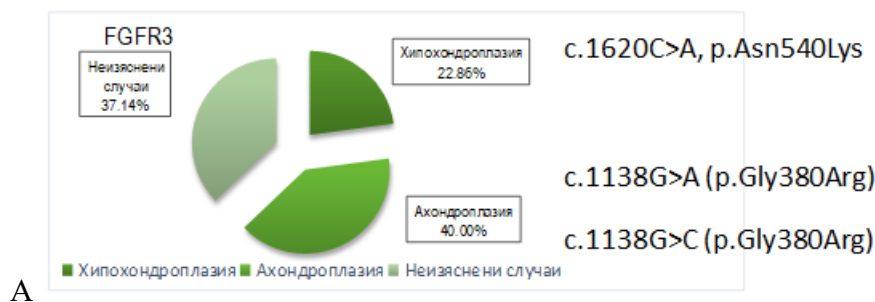
ПРИ 27 ПАЦИЕНТИ (87%) БЯХА ОТКРИТИ ИЗВЕСТНИ МУТАЦИИ:

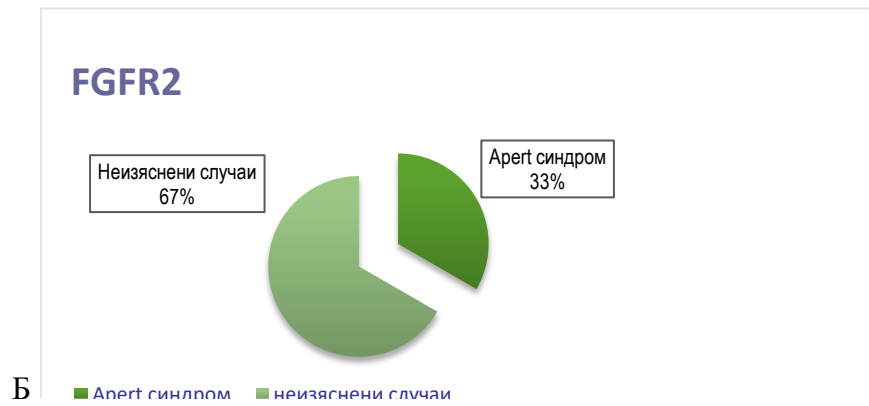
- ▶ *FGFR3*: c.1138G>A, p.Gly380Arg; c.1138G>C, p.Gly380Arg; c.1620C>A, p.Asn540Lys;
- ▶ *FGFR2*: c.755C>G, p.Ser252Trp;
- ▶ *COL1A1*: p.Gly809AlafsTer299; p.Gly929AlafsTer179; p.Gly194ValfsTer71.

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 25.





**Фигура 25.** 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;

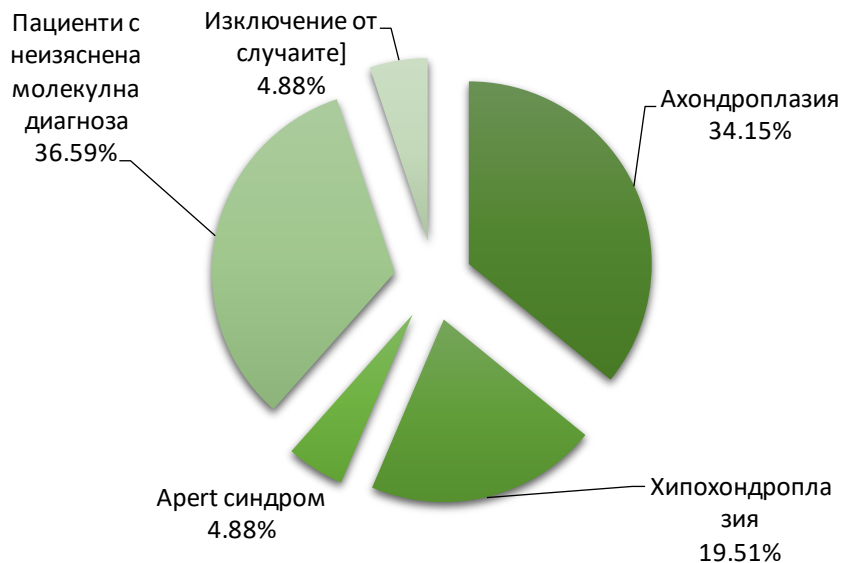
На диаграма „А“ са представени процентно доказаните случаи на пациенти с първоначална диагноза ахондро/хипохондроплазия (асоциирани с мутации в *FGFR3* гена), както и откритите мутации. В тази група бяха изследвани общо 35 пациенти, като при 14 (40.00%) пациента се доказва на молекулно ниво диагнозата 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 26.



**Фигура 26.** 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.

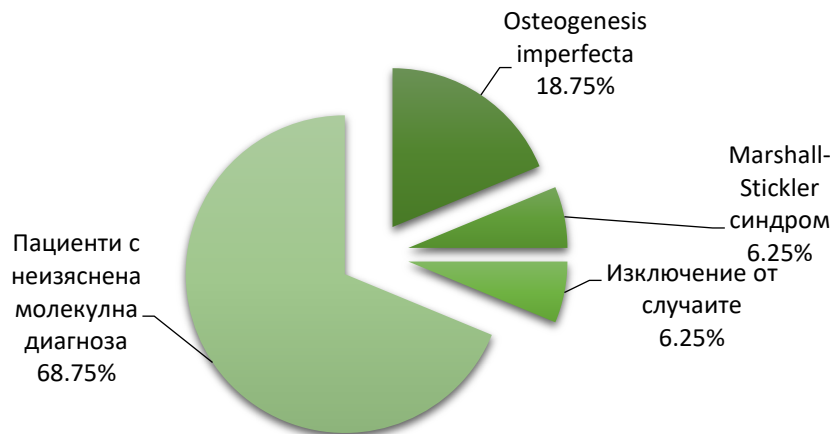
От таргетната група с пациенти, насочени с предполагаеми диагнози, включващи **нарушения в съединителната тъкан**, общо бяха изследвани 25 пациенти, като 16 от тях нямат родствена връзка. Бяха доказани на молекулярно ниво 3 патологии с диагноза *Osteogenesis imperfecta* тип I (мутации *COL1A1:c.242delC;p.Gly809AlafsTer299*;

*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 27.



**Фигура 27.** 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 Аpert 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 c.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*:c.3474+1G>A.

**БИБЛИОГРАФИЯ****Чуждоезична литература**

1. Acuna-Hidalgo R et al (2016) *Genome biology* 17.1.
2. Albená Todorova et al (1997) *Hum Mut.* 9:537-547
3. Aravidis C et al (2014) *J Matern Fetal Neonatal* 27:1502–6.
4. Barbosa M et al (2009) *Am J Med Genet.* 2009;149A:260.
5. Bochyńska, A. et al (2018) *Cells* 7, 17.
6. Byers PH et al (2012) *Annu Rev Genet.* 46:475-97.
7. Cassidy S et al (1996) *Am J Med Genet Part A* 62:206(A4).
8. Castronovo C et al (2014) *Am J Med Genet Part A* 999:1–10.
9. Chadwick D et al (1996) *Am J Hum Genet* 59A114(627).
10. Clayton-Smith J et al (1993) *J Med Genet* 30:529–531.
11. Crawford EC et al (1995) *Am J Hum Genet* 57A111(618).
12. Crolla JA et al (1995) *Hum Genet* 95:161–170.
13. Davidson L et al (2012) *World psychiatry* 11.2 (2012): 123-128.
14. Daubenev PE et al (1993) *J. Pediatr.* 1993; 152:715–6.
15. Fanganiello R et al (2007) *Molecular Medicine.* Vol. 13. No. 7. BioMed Central, 2007.
16. Farmaditya EP et al (2013) *Report of Indonesian patients.* 2013; 54(3): e72-e75
17. Fonseca R et al (2008) *Am J Med Genet A* 146:658–60.
18. Griebel V et al (1998) *Neuropediatrics* 20:234–7.
19. Herrmann J et al (1975) *Birth Defects* 11:76–103
20. Hogart A et al (2010) *Neurobiol Dis.* 38:181–91.
21. Holowinsky S et al (1993), *Am J Hum Genet* 53A125.
22. Huang B et al (1997) *Hum Genet* 99:11–17.
23. Jesse P et al (2012) *FRET*
24. Lekanne D et al (1995) *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 54.2: 224-235.
25. Locke D et al (2004) *J Med Genet* 41:175–182s
26. Mak C et al (2020) *Journal of neurology* vol. 143,1 (2020): 55-68.
27. Marini J et al (2017) *Nat. Rev. Dis. Prim.* 3, 17052. 10.1038/nrdp.2017.52
28. Mladenova et al (2019) *J Clin Med Genomics*
29. Michiko H et al (1996) *A neurocutaneous syndrome. Brain and Development* 9:141–53.
30. Mundhofir F et al (2013) *Singapore Med J* 54.3 (2013): e72-e75.
31. Nehal K et al (1996) *Arch Dermatol* 132:1167-70.
32. Nicol L et al (2019) *Bone* 120:70-74.
33. Orlova E et al (2017) *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 102.9 3546-3556.
34. Pascual-Castroviejo I et al (2008) *Springer Vienna* page 363–85.
35. Pellegrino J et al (1995) *Hum. Genet.* 96: 485-489
36. Penrose L et al (1955) *Parental age and mutation* 269:312–3.
37. Pettigrew A et al (1987) *Am J Med Genet Part A* 28A:791–802.
38. Planté-Bordeneuve V et al (2011) *The Lancet Neurology* 10.12 1086-1097.
39. Pujana M et al (2002) *Eur J Hum Genet* 10:26–35
40. Rauch F et al (2010) *Eur. J. Hum. Genet.* 18, 642–647
41. Reddy K et al (2000) *Clin Genet* 58:134–141
42. Ruggieri M et al (2000) *Journal of Child Neurology* 15:635–44
43. Rousseau F et al (1996), *Hormone research* vol. 45,1-2
44. Ruggieri M et al (2011) *Medlink Corporation.*
45. Ruggieri M et al (1996) *Neurology* 46:485–92
46. Rutland BM et al (2006) *Pediatric Neurology* 34:51–4
47. Shiang R et al (1994) *Cell.* 1994; 78: 335-342
48. Schinzel A et al (1994) *J Med Genet* 31:798–803
49. Song SH et al (2012) *Am J Med Genet A.* 158A:2456
50. Stoll et al. (1989) *Clinical genetics* 35.2 88-92.
51. Turleau, C et al (1986) *Hum. Genet.* 74: 185-187.
52. Ungaro P et al (2001) *J Med Genet* 38:26–34.
53. Uttarilli A et al (2019) *Bone* 120:204-211.
54. Van Dijk et al (2013) *Am J Med Genet Part A*
55. Vialard F et al (2003) *Am J Med Genet Part A* 118A:229–234.
56. White et al (2016) *Routledge.*
57. Zhytnik et al (2019) *Frontiers in genetics* vol. 10 722.

**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 patient 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 на докторанти