

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**

**КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ**

\*\*\*\*\*

**ДОЦ. АЛБЕНА ТОДОРОВА, ДБ**

**МУТАЦИИ, ФЕНОТИПНА ИЗЯВА И МЕХАНИЗМИ НА  
МУТАГЕНЕЗА ПРИ НЯКОИ НЕВРОМУСКУЛНИ И  
НЕВРОЛОГИЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ С ИНТЕЛЕКТУАЛЕН  
ДЕФИЦИТ**

# **ДИСЕРТАЦИЯ**

**За присъждане на научна степен**

**„ДОКТОР НА НАУКИТЕ“**

**по докторска програма „Молекулярна биология“  
професионално направление 4.3. „Биологически науки“  
област на висше образование 4.  
„Природни науки, математика и информатика“**

\*\*\*\*\*

**София, 2016**

Дисертационният труд съдържа 227 страници, онагледени с 116 фигури и 18 таблици. Библиографската справка включва 11 български източника, 328 чуждестранни източника и 29 електронни източника.

Дисертационният труд е обсъден на катедрен съвет към Катедра по Медицинска Химия и Биохимия, МУ-София на 02.12.2015г.

Във връзка с дисертационния труд са публикувани 14 статии в международни научни списания, от които 13 с импакт фактор, както и 1 монография и 1 глава от книга на международни издателства.

Публичната защита ще се състои на 03.02.2016 г.

**Научно жури:**

Акад. Проф. Д-р Ваньо Иванов Митев, дм, дбн  
Проф. Д-р Ивайло Людмилов Търнев, дм, дмн  
Проф. Д-р Венета Сашова Божинова-Чамова, дм  
Акад. Проф. Д-р Иван Георгиев Иванов, дбн  
Чл.Кор. Проф. Д-р Георги Христов Русев, дбн  
Проф. Д-р Иван Стефанов Иванов, дм  
Проф. Д-р Ваня Недкова Недкова-Коларова, дм

# **СЪДЪРЖАНИЕ**

<b>Използвани съкращения</b>	<b>6</b>
<b>Резюме</b>	<b>7</b>
<b>Summary</b>	<b>9</b>
<b>Въведение</b>	<b>11</b>
<b>1. Еволюция на технологиите в молекулярно-генетичната диагностика</b>	<b>13</b>
<b>2. Цел и задачи</b>	<b>18</b>
<b>3. Невромускулни заболявания</b>	<b>20</b>
<b>3.1. Прогресивна мускулна дистрофия тип Дюшен/Бекер</b>	<b>20</b>
3.1.1. Клинично описание и лабораторни изследвания	20
3.1.2. Молекулни основи	24
3.1.3. Генотип-фенотипни корелации	29
3.1.4. Собствени резултати	30
3.1.5. Обобщение на получените резултати и заключителни бележки	61
<b>3.2. Мускулна дистрофия пояс-крайник тип 2А</b>	<b>64</b>
3.2.1. Клинично описание и лабораторни изследвания	64
3.2.2. Молекулни основи	66
3.2.3. Генотип-фенотипни корелации	70
3.2.4. Собствени резултати	70
3.2.5. Обобщение на получените резултати и заключителни бележки	81
<b>3.3. Ламинопатии</b>	<b>82</b>

3.3.1. Клинично описание и лабораторни изследвания	83
3.3.2. Молекулни основи	84
3.3.3. Генотип-фенотипни корелации	87
3.3.4. Собствени резултати	89
3.3.5. Обобщение на получените резултати и заключителни бележки	104
<b>4. Неврологични и невродегенеративни заболявания с интелектуален дефицит</b>	<b>106</b>
<b>4.1. Синдром на чуплива X хромозома</b>	<b>106</b>
4.1.1. Клинично описание и лабораторни изследвания	107
4.1.2. Молекулни основи	108
4.1.3. Собствени резултати	111
4.1.4. Обобщение на получените резултати и заключителни бележки	128
<b>4.2. Синдром на Rett</b>	<b>129</b>
4.2.1. Клинично описание и лабораторни изследвания	130
4.2.2. Молекулни основи	132
4.2.3. Собствени резултати	136
4.2.4. Обобщение на получените резултати и заключителни бележки	152
<b>4.3. Епилептични енцефалопатии</b>	<b>154</b>
4.3.1. Ранна инфантилна епилептична енцефалопатия тип 9	155
4.3.2. Ранна инфантилна епилептична енцефалопатия тип 2	159
4.3.3. Собствени резултати	160
4.3.4. Обобщение на получените резултати и заключителни бележки	165
<b>4.4. Синдром на Dravet</b>	<b>167</b>

4.4.1. Клинично описание и лабораторни изследвания	167
4.4.2. Молекулни основи	168
4.4.3. Генотип-фенотипни корелации	171
4.4.4. Собствени резултати	171
4.4.5. Обобщение на получените резултати и заключителни бележки	176
<b>Заключение</b>	<b>178</b>
<b>Библиография</b>	<b>181</b>
Българска литература	181
Чуждестранна литература	182
Електронни източници	219
<b>Изводи</b>	<b>221</b>
<b>Приноси</b>	<b>223</b>
<b>Публикации във връзка с дисертацията</b>	<b>225</b>

## **ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ**

### **На латиница:**

**ALAT** - аланин-аминотрансфераза

**ASAT** - аспартат-аминотрансфераза

**CMD** – Cardiomyopathy dilated; дилатативна кардиомиопатия

**CNT** – Copy number test; тест за брой копия

**CPK** – creatine phosphokinase

**DIG** – Digoxigenin; дигоксигенин

**DMD/BMD** – Duchenne muscular dystrophy/Becker muscular dystrophy

**DS** – Dravet синдром

**EDMD** – Emery-Dreifuss muscular dystrophy

**EE** – Epileptic encephalopathy; Епилептична енцефалопатия

**EIEE** – Early Infantile Epileptic Encephalopathy; Ранна инфантилна епилептична енцефалопатия

**FXS** – Fragile X syndrome; синдром на чуплива X хромозома

**GEFS+** - Generalized Epilepsy with Febrile Seizures Plus; генерализирани епилепсии с фебрилни гърчове плюс

**LGMD1B** – Limb-girdle muscular dystrophy 1B

**LGMD2A** – Limb-girdle muscular dystrophy 2A

**MAE** – Myoclonic atstatic epilepsy; Миоклонична астатична епилепсия

**MLPA** – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification; Мултиплексна лигазно-зависима амплификация

**MS-MLPA** – Methylation Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification; Специфична по отношение на метилирането мултиплексна лигазно-зависима амплификация

**MT** – Methylation test; тест за метилиране

**NGS** - NextGeneration Sequencing; Секвениране от нова генерация; Секвениране от ново поколение

**OMIM** – Online Mendelian Inheritance in Man

**PCR** – Polymerase Chain Reaction, Полимеразна Верижна Реакция

**RT-PCR** – Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

**RTT** – Rett синдром

**SMEI** - Severe Myoclonic Epilepsy in Infancy

**SSCP** – Single Strand Conformation Polymorphism, Конформационен Полиморфизъм в Едноверижни Фрагменти

**TP-PCR** – Triple primed PCR

### **На кирилица:**

**АЕЛ** - Антиепилептични лекарства

**ДМД/БМД** – Дюшен мускулна дистрофия/Бекер мускулна дистрофия

**ЕДМД** – Емери-Драйфус мускулна дистрофия

**КК или КФК** – Креатинкиназа или креатин-фосфокиназа

**ПКМД1Б** – Пояс-крайник мускулна дистрофия 1Б

**ПКМД2А** – Пояс-крайник мускулна дистрофия 2А

## РЕЗЮМЕ

В ерата на бурно развиващите се геномни технологии, специалистите по молекулярна диагностика ежедневно се сблъскват с редица предизвикателства. Нашите познания за човешкия геном, за взаимодействието между генетични и епигенетични фактори, за това как да интерпретираме всеки резултат и да анализираме генотип-фенотипните корелации, се променят ежедневно. Това до голяма степен е свързано с огромните възможности на съвременните технологии, което също изисква големи усилия от страна на специалистите постоянно да надграждат квалификационните си умения и да бъдат в крак с технологиите от нова генерация.

Настоящият труд целеше да проследи еволюцията на геномните технологии (от хибридизацията по Southern, през PCR и MLPA анализ до ерата на биоинформатиката и секвениране с лазерна детекция) и тяхното приложение в неврогенетиката за нуждите на молекулярната диагностика. Бяха използвани конкретни примери невромускулни, неврологични и невродегенеративни заболявания с интелектуален дефицит, за да се представи еволюцията на технологиите от една страна и проблемите с които се сблъскахме в хода на диагностичната дейност, от друга. Успеваемостта на молекулярно-генетична диагностика при семейства с клинична диагноза мускулна дистрофия тип Duchenne/Becker е близка до 100% (~67% при семействата с липсващ индексен пациент); при мускулна дистрофия пояс-крайник тип 2A ~ 85%; при ламинопатии - 71%; при синдром на чуплива X хромозома – 11%; при синдром на Rett – 36%; при епилептични енцефалопатии с ранно начало – 36% и при Dravet синдром – 31%.

Представите ни в областта на генетиката също претърпяха съществен поврат. Простичките моногенни заболявания с ясна етиология на унаследяване също се оказа, че имат своите предизвикателства, като например, как да докажем хетерозиготна делеция на един или повече екзони на ДНК или РНК ниво, преодолявайки маскиращия ефект на здравия алел или да докажем, че синонимна замяна има в действителност патогенен сплайсинг ефект. Доказването, оразмеряването и интерпретирането на динамични мутации в човешкия геном, експандирането или контрахирането на тези мутации в хода на унаследяването в поколенията, както и оценката на различни профили на метилиране, ни поднасяха често изненади и изискваха от наша страна постоянно да разработваме и оптимизираме нови по-съвършени методики, на които можем да се доверим в ежедневната ни диагностична практика. И накрая, но не на последно място епилептичните

енцефалопатии и епилептични синдроми преобърнаха нашите представи за генотип-фенотипни корелации с установяването на едни и същи генетични дефекти в рамките на едно семейство, които могат да са свързани както с асимптоматично носителство така и с тежка клинична симптоматика. За момента можем само да предполагаме намесата на гени модификатори и други генетични и епигенетични фактори. Този факт затруднява изключително много медико-генетичното консултиране в засегнатото семейство.

Изследването на механизмите на мутагенеза в човешкия геном показва, че редица мутации възникват *de novo*, причинени от независими мутационни събития, но засягат едни и същи нуклеотиди или генни региони. На теория, това са случайни и независими мутационни събития, но практически засягат винаги една и съща точка, което не изглежда да е случайно, а по-скоро предполага прякото участие на околната секвенция в провокирането на мутационните събития. Възникването на комплексни мутационни събития върху един алел също до голяма степен би могло да се обясни с геномната архитектура на региона.

Най-важният урок в ежедневната ни диагностична практика (особено днес в ерата на модерните геномни технологии, с помощта на които можем да анализираме целия геном на всеки пациент), остава интерпретирането на резултатите от генетичните изследвания в контекста на клиничната симптоматика на пациента. Всеки конкретен резултат, колкото и убедително да изглежда на пръв поглед като патогенен или непатогенен трябва да се интерпретира с повишено внимание.

## **SUMMARY**

Every day, biologists face a number of challenges in the field of molecular diagnostics, during the era of the fast development of the genome technologies. Our knowledge about the human genome, the interactions between genes and the influence of epigenetic factors, the interpretation of every result and genotype-phenotype correlations change every day. All this is associated with the enormous possibilities of the novel technologies, requiring also efforts from the professionals to upgrade their qualification skills and to be aware with the next generation technologies.

The aim of the present work was to follow the evolution of the genome technologies (starting from Southern hybridization, through PCR and MLPA analysis up to the era of bioinformatics and sequencing with laser detection) and their application in neurogenetics for the needs of molecular diagnostics. Neuromuscular, neurological and neurodegenerative disorders with intellectual deficit were used as examples in order to follow the technology evolution on the one hand, and the problems which we faced during the diagnostics, on the other. The success of molecular diagnostics in the families with Duchenne/Becker muscular dystrophy is close to 100% (~67% for the families with unavailable index patient); in limb-girdle muscular dystrophy type 2A ~85%; in laminopathies – 71%; in fragile X syndrome – 11%; in Rett syndrome - 36%; in early onset epileptic encephalopathy – 36% and in Dravet syndrome 31%.

Our understanding in the field of genetics has also dramatically changed. The monogenic disorders with clear etiology of inheritance proved to be challenging as well, for example how to clarify heterozygous deletion of one or more exons on DNA or RNA level, overcoming the masking effect of the healthy allele, or how to prove that a synonymous change has actually a pathogenic splice effect. The detection, sizing and interpretation of the dynamic mutations in the human genome, the expansion or contraction of these mutations during the transmission from one generation to another, as well as the assessment of different methylation profiles, often surprised us and required constantly to develop and to optimize new more reliable methods we can trust in our daily diagnostic practice. And last but not least, epileptic encephalopathies and epileptic syndromes changed dramatically our understanding about genotype-phenotype correlations with the detection of the same genetic defect within different family members, varying from an asymptomatic carrier status to severe clinical cases. For the moment, we can just suspect the influence of modifier genes or other genetic and epigenetic factors, making the medico-genetic counseling in the affected families even more complicated.

The investigation of mechanisms of mutagenesis in some genetic disorders showed that many mutations arise *de novo*, but in a great number of patients they affect always the same nucleotides or gene regions. Theoretically, these mutation events are accidental and independent, but practically they affect always one and the same point suggesting the direct participation of the neighboring sequence in mutagenesis. The generation of complex mutation events affecting a single allele could also be explained by the genome architecture in the proper region.

The most important lesson in our daily diagnostic practice (especially today in the modern genome technologies era when we can analyze the whole genome of a given patient) is the interpretation of the results from genetic testing in the context of the patient's clinical symptoms. Every single result, no matter how convincing its pathogenic or nonpathogenic effect seems, needs to be interpreted with care.

## ВЪВЕДЕНИЕ

Молекулярно-генетичната диагностика в България стартира средата на 80-те години, когато в световен мащаб биват картирани и клонирани първите човешки гени. Така например генът *CFTR*, отговорен за заболяването муковисцидоза е картиран и клониран 1989 г [Riordan et al., 1989] и веднага започва да се използва в диагностичната практика за верифициране на диагнозата и профилактика в засегнатите семейства. Няколко години по-рано е картиран и  $\beta$ -глобиновият ген (*HBB*), като започва скринирането му за изясняване на молекулните характеристики на  $\beta$ -таласемия [Lin et al., 1985]. Муковисцидоза и  $\beta$ -таласемия представляват най-честите наследствени заболявания в България, с честота на носителство 1:20-1:30 индивида [Kalaydjieva et al., 1989; Angelicheva et al., 1997], което обуславя първоначалния интерес на генетиците към тези заболявания. Съвсем скоро след това, започва и развитието на неврогенетиката у нас, като интересът първоначално е насочен към най-честото невромускулно заболяване при момчета - прогресивна мускулна дистрофия тип Дюшен/Бекер (Duchenne/Becker muscular dystrophy, DMD/BMD). *DMD* генът, един от най-големите известни до сега човешки гени, беше картиран и клониран през 1987 г [Koenig et al., 1987], което постави началото на молекулярно-генетичната диагностика на това тежко инвалидизиращо заболяване с летален изход в ранна юношеска възраст. Почти веднага след откриването на гена този вид молекулярно-генетична диагностика стана достъпна и за българските DMD/BMD семейства, които от години са издирвани, клинично охарактеризирани и картотекирани от невролозите Митко Абаджиев и Янко Янков [Абаджиев и сътр., 1977; Янков личен архив, непубликувани данни], както и от други техни предшественици [Йорданов и сътр., 1964; Божинов и сътр., 1973].

В следствие много генетични заболявания бяха охарактеризирани на молекулярно-генетично ниво, бяха изяснени молекулните им характеристики за нашата популация и бяха разработени и оптимизирани за рутинно приложение диагностични методи за анализ на засегнатите семейства. На тази база молекулярно-генетичната диагностика у нас следваше световните постижения по отношение на диагностиката и профилактиката на семействата, засегнати от наследствени заболявания. През годините молекулярно-генетичната диагностика у нас не е изоставала нито в технологично отношение, нито по отношение на спектъра от разработени тестове и верифицирани диагнози в сравнение със световните постижения. Вече години молекулярно-генетичната диагностика у нас не е фокусирана само върху най-честите генетични заболявания за

България, а цели да охарактеризира на молекулно ниво всяко заболяване, макар и с ниска честота, според нуждите на засегнатите семейства.

Понастоящем класифицирането на заболяванията е сериозно предизвикателство, поради наличието на редица заболявания с близка, припокриваща се клинична картина, както и едно и също заболяване може да се прояви с широк спектър от клинични вариации (дори в рамките на едно семейство). Клиничните критерии (основни и допълнителни), на базата на които се цели максимално точно класифициране и субкласифициране на заболяванията, непрекъснато се променят и актуализират, позовавайки се на нарастващата информация и познания за заболяванията, произхождащи най-вече от задълбочени проучвания на молекулно ниво. Постоянно се налагат промени в класификациите на заболяванията с цел да се отразят най-новите постижения по отношение на засегнатия ген или гени, на типа дефект, на типа мутации, епи(генетични) изменения и т.н. Изясняването на молекулните характеристики на дадено заболяване има значение не само аз адекватна диагностика и профилактика на пациента и неговото семейство, но и в ерата на геномиката придобива все по-голямо значение за генна терапия и индивидуализиран терапевтичен подход. Медицината днес се намира в преходен етап и от ерата на Хипократ, основана на наблюдение на клиничните симптоми, преминава в геномната ера, превръщайки се в молекулна медицина.

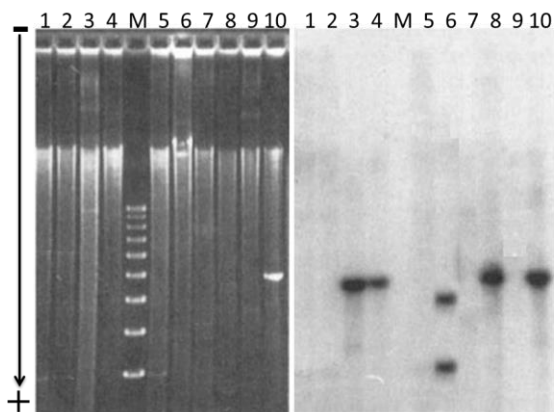
Бурното развитие на технологиите разкрива нови прицелни места (таргети) на молекулно ниво. Нови биомаркери навлизат в клиничната практика, създаващи нови предизвикателства за медици, генетици, биолози и биохимици. Ежедневно се сблъскваме и с ограничения, като факта, че не всички пациенти могат да бъдат изследвани с помощта на биомаркери, както и че прилагането на прицелна терапия или генна терапия по отношение на определени клинични симптоми, не винаги води до очаквания резултат. Това налага специалистите постоянно да опознават и да си изясняват възможностите на новите технологии и техните приложения в рутинната диагностична практика. Налага се работа в екип на мултидисциплинарно ниво, приобщавайки новопоявилата се специалност биоинформатика, която придобива все по-голяма популярност.

В последните години много редки болести бяха охарактеризирани на молекулно ниво у нас посредством ген-по-ген аналитичен подход, което е свързано с огромна експериментална дейност, както в технологично, така и в клинично-практическо отношение.

Днес е налице геномен аналитичен подход, който позволява изследване на генома на даден пациент, интерпретация на получената необятна база данни и на тази основа молекулярно-генетично верифициране на диагнозата при пациента.

## **1. Еволюция на технологиите в молекулярно-генетичната диагностика**

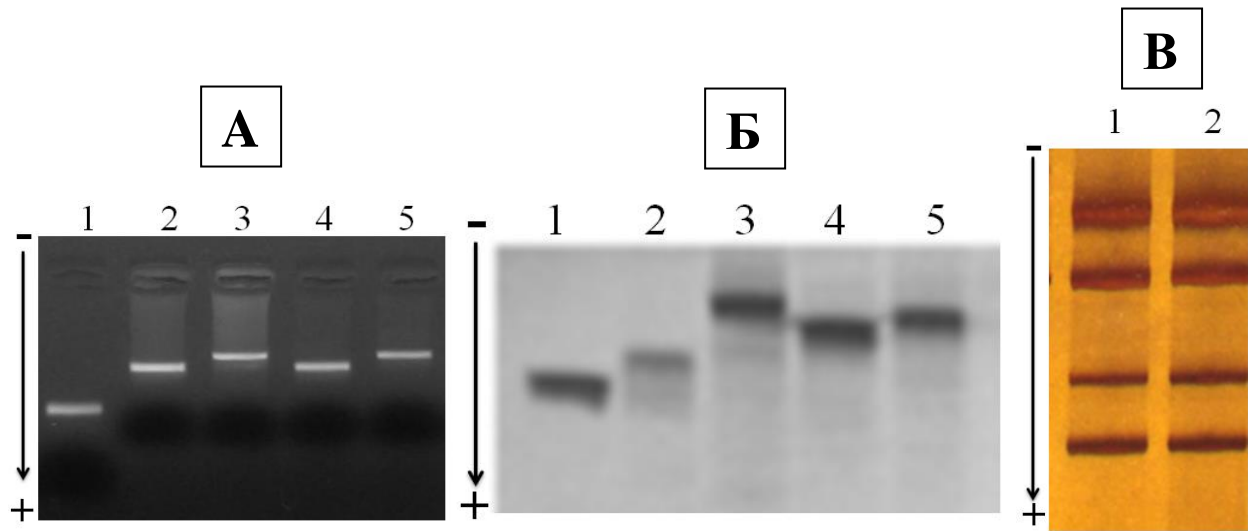
С бурното развитие на технологиите, използвани в молекулярно-генетичната диагностика, възможностите ни за анализиране на човешки гени се увеличават съществено. В края на 80-те години на миналия век основна техника за генетичен анализ е технологията на трансфер на ДНК от гел върху мембранен носител посредством Southern blot и последваща хибридизация със специфични за гена сонди. С помощта на този метод се откриват големи делеции и дупликации, както и експанзии в различни гени. Тази методика е доста трудоемка, в някои случаи интерпретацията на резултатите е затруднена и се налага използване на радиоактивно белязани сонди, което я прави много малко приложима в днешно време (основно за оценка на големи експанзии, Фигура 1).



**Фигура 1.** Агарозна електрофореза на геномен дайджест и автордиография след хибридизация с радиоактивно белязана сонда.

В последствие през 1983 г. се разработва амплификацията на генни фрагменти чрез PCR, революционно откритие, за което Kary Mullis получава Нобелова награда. PCR методиката е много по-удобна, бърза и лесна за изпълнение, както и много достъпна като цена. Може да се изпълнява в мултиплексен вариант. Това предполага да познаваме нуклеотидната последователност на региона, който искаме да изследваме. Получените PCR фрагменти могат да се визуализират чрез агарозна електрофореза и оцветяване с етидиев

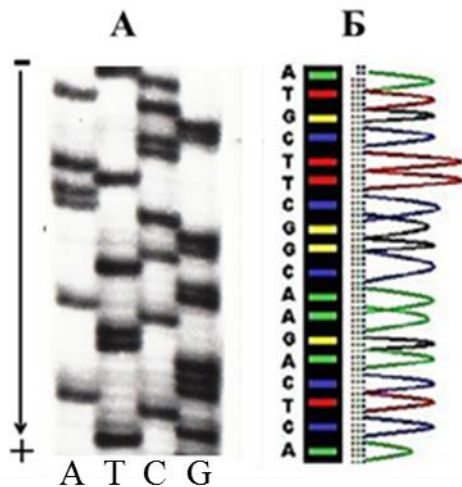
бромид или чрез акриламидна електрофореза с радиоактивно маркиране или оцветяване със сребърен нитрат (Фигура 2).



**Фигура 2.** Визуализация на PCR фрагменти чрез агарозна електрофореза и оцветяване с етидиев бромид (А); чрез акриламидна електрофореза с радиоактивно маркиране (Б) и чрез акриламидна електрофореза след оцветяване със сребърен нитрат (В).

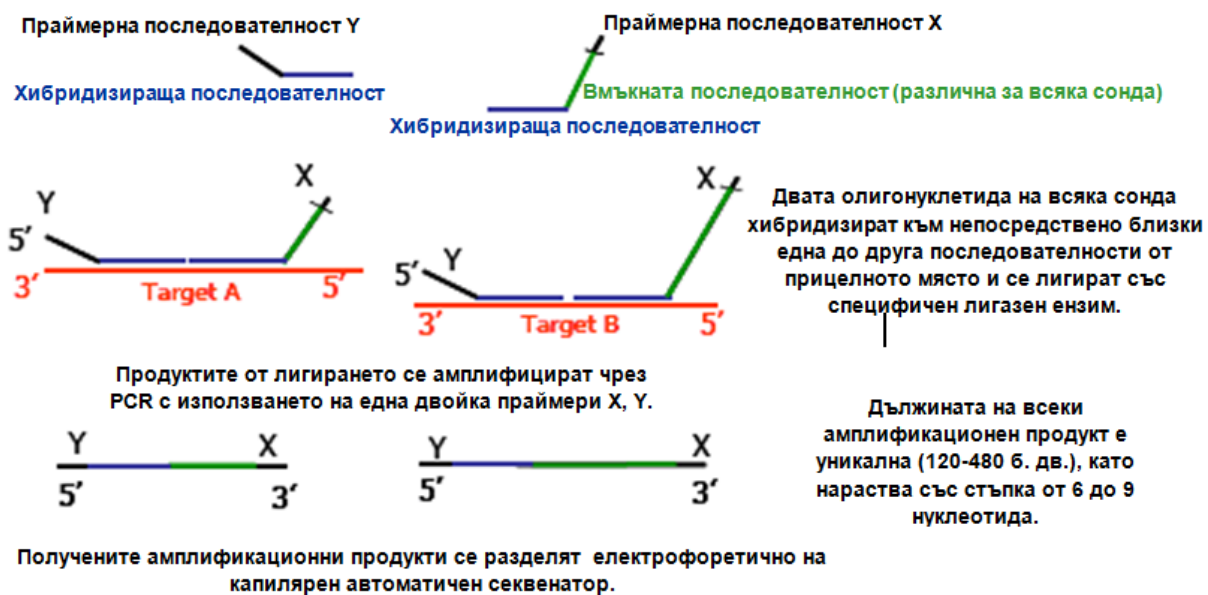
В последствие, на базата на амплификация чрез PCR са разработени полуколичествени методи за откриване на дупликации или за доказване на хетерозиготно носителство на делеции [Bronzova et al., 1994; Todorova et al., 1996; Miorin et al., 1997] (цитирани са само собствени разработки по темата, които са представени по-надолу в резултати).

Търсенето на точкови мутации, малки frameshift или in frame делеции, инсерции, дупликации или комплексни мутационни реаранжировки се постига най-точно чрез секвениране по Sanger [Sanger, 1981]. Първоначално тази методика се изпълняваше чрез радиоактивно белязане в акриламидна електрофореза (Фигура 3А). Около 2000 г. се появиха за рутинно приложение в диагностичната практика автоматичните секвенатори с капилярна електрофореза и лазерна детекция (Фигура 3Б).



**Фигура 3 (А).** Секвенционен профил чрез радиоактивно белязване чрез акриламидна електрофореза; **(Б).** Секвенционен профил чрез лазерна детекция чрез капилярна електрофореза.

В периода около 2003-2004 г. беше разработен новият метод за геномно профилиране Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) (Фигура 4) [www.mlpa.com].

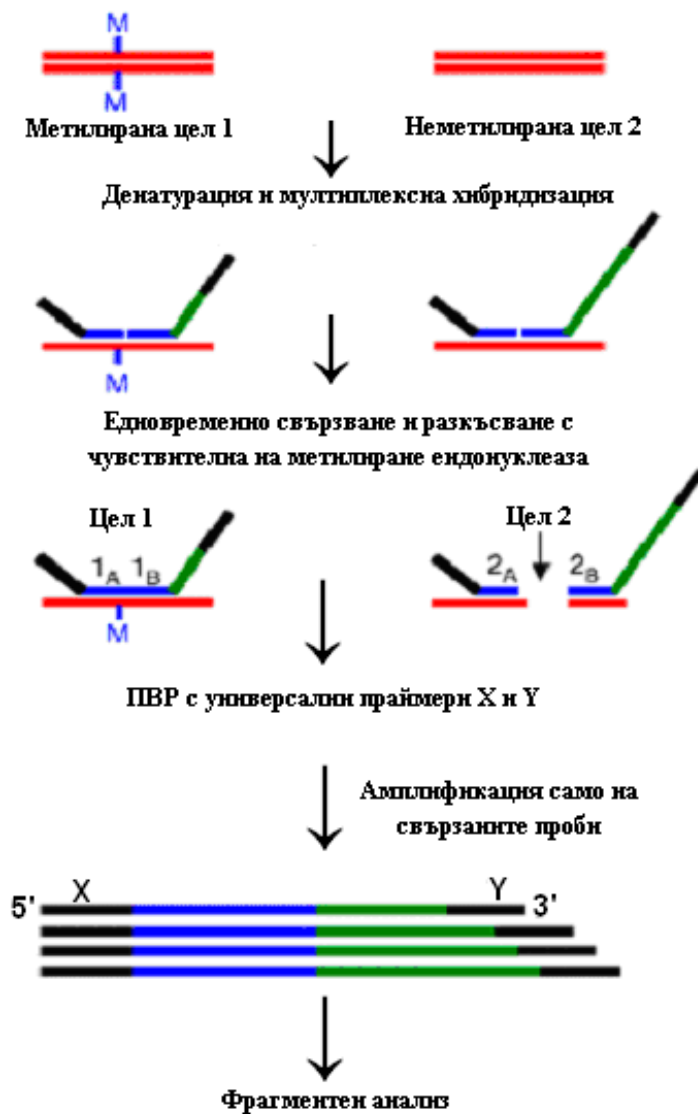


**Фигура 4.** Принцип на MLPA метода.

Този метод позволява да се анализират до 45 нуклеотидни фрагмента в една реакция, като едновременно с това се оценява количествено броя копия, получени при амплификацията на всеки фрагмент. Амплификационните продукти се разделят посредством капилярна електрофореза и лазерна детекция. MLPA китовете са разработени за откриване на делеции или дупликации на един или повече екзони. Фрагментите се

сравняват като площ на получените пикове, както в рамките на една проба, така и спрямо контролни проби, анализирани едновременно с изследвания пациент.

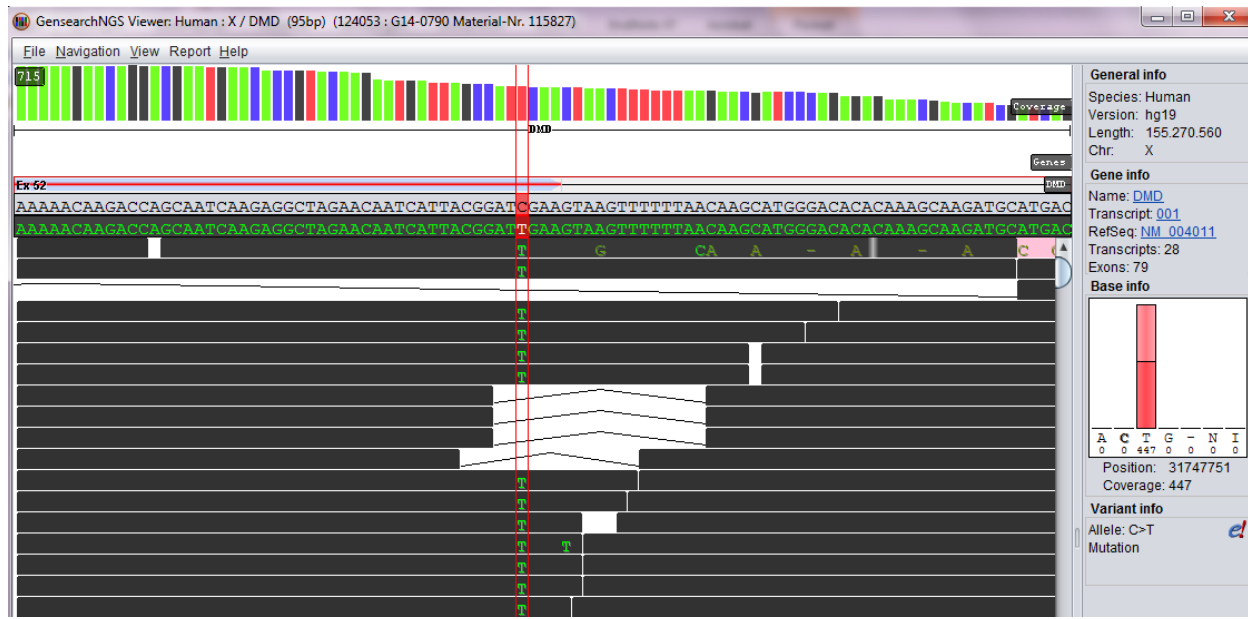
В последствие методът е модифициран и за оценка на метилирани и неметилирани геномни фрагменти (methylation specific MLPA, MS-MLPA) и на тази база дава информация за отклонения в метилирането (methylation test, MT). За целта се използва специфична по отношение на метилирането рестриктаза *HhaI*, която рестрицира неметилирана CpG последователност, без да упражнява своето действие върху метилирана последователност (Фигура 5) [Nygren et al, 2005].



**Фигура 5. Принцип на MS-MLPA метода [Nygren et al, 2005]**

Подобно на класическия MLPA анализ, първоначално геномната ДНК се подлага на денатурация и хибридизация със специфични сонди, някои от които хибридизират към последователности разпознавани от рестрикционната ендонуклеаза *HhaI*. Следва реакция на лигиране и едновременно с това подлагане на рестрикция с ензима *HhaI*, който е чувствителен на метилиране. В последствие лигираните фрагменти се размножават чрез PCR. Пробата, която не е срязана от ензима е метилирана, тя ще се амплифицира и дава PCR продукт. Ако CpG мястото не е метилирано, образувания комплекс ДНК/сонда ще се среже от ендонуклеазата и при последващата амплификация няма да се получи продукт.

С навлизането на NextGeneration Sequencing (NGS) технологиите и тяхното осъвършенстване за диагностично приложение, панел от повече от 30 мускулно специфични гени може да бъде анализиран в рамките на 10 дни (Фигура 6).



**Фигура 6.** NGS профил на nonsense мутация c.7657C>T, p.Arg2553\* в екзон 52 на *DMD* гена.

## **2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

**Настоящият труд цели** да представи постиженията ни в областта на молекулярно-генетичната диагностика на някои невромускулни и неврологични заболявания на развитието: прогресивна мускулна дистрофия тип Duchenne/Becker, мускулна дистрофия пояс-крайник тип 2A, мускулна дистрофия Emery-Dreyfuss, синдром на чуплива X хромозома, синдром на Rett, епилептични енцефалопатии тип 9 и тип 2, Dravet синдром.

**Изследвани гени:** DMD, CAPN3, LMNA, FMR1, MECP2, FOXP1, CDKL5, PCDH19, SCN1A.

### **ЗАДАЧИ:**

1. Скрининг за мутации в посочените гени. Преглед на технологичния прогрес при скрининговите методи.
2. Изясняване патогенния ефект на откритите генетични изменения и връзката им с фенотипната изява на заболяването.
3. Скрининг за носителство на мутации в посочените гени. Преглед на технологичния прогрес при скрининговите методи за изясняване на носителски статус.
4. Проследяване унаследяването и фенотипната изява на мутации в посочените гени.
5. Изследване на мозаицизъм при някои от таргетните гени.
6. Изследване механизмите на мутагенеза при някои от таргетните гени.
7. Изработване на диагностични алгоритми (системни подходи) за молекулярно-генетична диагностика на представените заболявания, съобразени със съвременните технологии.

Нашите познания в областта на генетиката също претърпяха съществен поврат от сравнително простите за интерпретиране моногенни заболявания с ясна етиология и начин на унаследяване до сложните интерпретации на генетични изменения в комбинация с други генетични и епигенетични регулаторни фактори, унаследяване на динамични мутации (експанзии), оценка на различни профили на метилиране и накрая епилепсиите, където

един и същ генетичен дефект в рамките на едно семейство може да е свързан както с асимптоматично носителство така и с тежка клинична симптоматика.

В следващите глави ще направя опит да представя през какви трудности преминахме, какво научихме и до колко сме готови за ерата на геномната диагностика.

### **3. НЕВРОМУСКУЛНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ**

#### **3.1. ПРОГРЕСИВНА МУСКУЛНА ДИСТРОФИЯ ТИП ДЮШЕН/БЕКЕР, ДМД/БМД (DUCHENNE/BECKER MUSCULAR DYSTROPHY, DMD/BMD)**

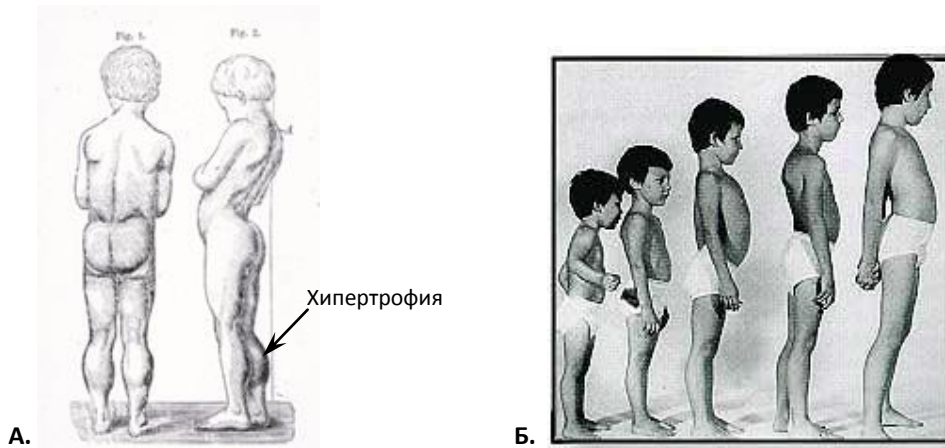
##### **3.1.1. Клинично описание и лабораторни изследвания**

Прогресивната мускулна дистрофия Дюшен/Бекер, Duchenne/Becker muscular dystrophy (DMD/BMD, OMIM#310200; 300376) е наследствено, X-свързано, рецесивно заболяване. Двете алелни форми, на Дюшен (ДМД) и на Бекер (БМД), се различават, както по тежестта на протичане на болестта, така и по честотата на разпространение на заболяването. ДМД се среща с честота 1 на 3 500 живородени момчета и представлява най-честото невромускулно заболяване в детска възраст, а БМД се среща с честота 1 на 30 000 живородени момчета.

Най-голям принос за клиничното охарактеризиране и диагностициране на прогресивната мускулна дистрофия и по-точно на нейната по-тежко протичаща форма на Дюшен, има Duchenne de Boulogne [1868].

През 1955 Becker и Kiener описват прогресивна мускулна дистрофия, която не се различава клинично от формата на Дюшен, но протича значително по-леко. От 1962 г. тази форма се означава като X-свързана прогресивна мускулна дистрофия, форма на Бекер.

По отношение на **клиничните симптоми**, характерна особеност на прогресивната мускулна дистрофия, която я отличава от останалите невромускулни заболявания е, че засяга предимно мускулите на долните крайници. Електромиографското изследване показва миогенна увреда, с наличие на полифазни акционни потенциали с малка продължителност и ниска амплитуда. Дистрофичният процес започва от проксималната мускулатура на долните крайници, като преминава към мускулатурата на горните крайници едва в по-късните стадии на болестта. Типична находка е хипертрофията на прасците и промяната в позата и стойката на тялото (Фигура 7А, Б). Двете форми на болестта ДМД и БМД се различават помежду си най-вече по времето на поява на първите симптоми и по тежестта на клиничната изява.



**Фигура 7 (А).** Хипертрофия на прасците в резултат на замяна на нормалната мускулна тъкан със съединителна и мастна тъкан; **(Б).** Промяна на позата в хода на прогресията на заболяването, поява на лумбална лордоза и сколиоза <http://dxline.info/diseases/becker-muscular-dystrophy>; [mmcneuro.wordpress.com](http://mmcneuro.wordpress.com).

**Първите симптоми** на ДМД се появяват, когато детето започне да извършва по-активни движения. Засегнатите момчета прохождат по-късно, падат по-често, имат затруднение при изкачването на стълби, проявяват нежелание за игра в клекнало положение. С възрастта състоянието се усложнява и въпреки известните индивидуални вариации в прогресията на заболяването, към 10 - 12 годишна възраст пациентите са приковани на инвалиден стол. Около 90% от момчетата умират преди да са навършили 20 години, от респираторни проблеми или сърдечна недостатъчност, поради засягане на дихателната и сърдечна мускулатура.

При формата на Бекер (БМД) болестта протича по подобен начин, но значително по-забавено. Заболяването се проявява към 11<sup>-та</sup> година, инвалидизацията настъпва около 27±8 годишна възраст с летален изход около 42±14 години.

**Интелектуален дефицит** е твърде вариабилна характеристика на ДМД/БМД фенотипа. Някои проучвания показват при 30% от болните по-нисък коефициент на интелигентност [Emery, 1988]. Когнитивните проблеми и умственото изоставане се срещат по-често при пациенти с ДМД, отколкото при БМД пациенти. Патогенезата на когнитивните нарушения е комплексна, като основно се дължи на мутации downstream в 3` края на гена. Тези мутации нарушават регулацията на експресията на някои специфични

изоформи на дистрофина Dp140, Dp71, Dp116, които са локализирани в централната нервна система. Мутациите, засягащи мозъчно-специфичните изоформи на дистрофина нарушават невроналното зреене и развитие, синаптогенезиса, както и вътреклетъчната хомеостаза на нервната и глиална клетка. Когнитивните нарушения при български ДМД/БМД пациенти бяха подробно изследвани в последните години и са представени в няколко научни публикации у нас и в световната литература [Чамова и сътр. 2012; Chamova et al., 2013], като публикувахме и монография по въпроса [Chamova, Tournev, Todorova, 2011].

**Сърдечно засягане** и тежки кардиомиопатии са докладвани при 33.5% от ДМД и при 48.8% от БМД случаите [Nigro et al., 1994]. Резултатите от проведени кардиологични изследвания при български пациенти в корелация с генетичните находки са представени в научни публикации [Bronzova et al., 1993; Todorova et al., 2003a]. Кардиомиопатия (преклинична или изявена) беше наблюдавана почти при всички изследвани български пациенти от ранна възраст. Нашите резултати показаха умерено изразена пулмонална хипертония, което предполага, че рестриктивен респираторен синдром и пулмонално миокардно нарушение участват в патогенезата на сърдечното засягане с ранно начало [Bronzova et al., 1993]. Тежка дилатативна кардиомиопатия с начало на 14 годишна възраст и екзитус на 18 годишна възраст установихме при пациент с 16 bp делеция в екзон 44 на *DMD* гена [Todorova et al., 2003a]. Мутации в този регион се предполага, че се асоциират с по-висок риск от сърдечно засягане.

В клиничната диагностиката на ДМД/БМД се използват комплекс от **параклинични показатели** с различна информативност и диагностична стойност. Основен диагностичен критерий е активността на *креатинфосфокиназата (КК или КФК)* в серума. Този ензим катализира фосфорилирането на креатина в мускулните клетки. При пациенти с ДМД/БМД в резултат на увреждане цитоскелета и мембраната на мускулните клетки ензимът се освобождава в кръвния серум и стойностите се повишават стотици, хиляди пъти. Такова екстремно повишение на КК не се наблюдава при нито едно от другите невромускулни заболявания. При случаите с БМД се наблюдават по-ниски ензимни активности [Цветанова, 1979], което се дължи на по-доброкачествения ход на заболяването и на по-бавната прогресия. До сега не са цитирани случаи на ДМД или БМД, които в началото на заболяването да показват нормални стойности на КК. Логично е откритото намаление на стойностите на КК с напредване на възрастта, което се дължи на изконсумиране на мускулната тъкан в хода на дистрофичния процес [Йорданов и сътр., 1964; Божинов и сътр.,

1973; Цветанова, 1979]. От изоензимите на КК, с най-голямо значение за диагностиката е МВ формата.

Високи стойности на КК се срещат и при 70% от жените носителки на болестта, което дава възможност този показател да бъде използван и при доказване на носителство у роднини на болните [Цветанова, 1979]. Фалшиво негативни резултати се наблюдават при 30% от жените носителки на мутации в *DMD* гена.

В резултат на дистрофичния процес се повишава концентрацията на много други мускулно специфични ензими и изоензими в серума - лактат дехидрогеназа, глюкозо 1,6 дифосфат алдолаза, аланин-аминотрансфераза (ALAT), аспартат-аминотрансфераза (ASAT), пируват киназа.

Клиничните и параклинични критерии за поставяне на диагноза ДМД/БМД са обобщени в Таблица 1.

**Таблица 1.** Критерии за диагностика на мускулна дистрофия тип Дюшен/Бекер

Критерии	ДМД	БМД
1. Първите симптоми	Преди 5-годишна възраст.	След 10-годишна възраст.
2. Инвалидизация	Преди 13-годишна възраст.	След 16-годишна възраст.
3. Продължителност на живота	При 90% от случаите летален изход преди 20-тата годишнина.	До 42±14 години.
4. Клинични симптоми	Прогресивна, симетрична мускулна слабост, предимно на проксималните мускули на крайниците, като първоначално обхваща само долните крайници. Често се наблюдава хипертрофия на прасците. Тежки кардиомиопатии са докладвани при 33.5% от ДМД и при 48.8% от БМД случаите. Често прогресията на заболяването води до респираторни проблеми.	В редица случаи, за дълго време единствен признак на заболяването е слабост на четириглавия бедрен мускул. При някои пациенти в късни етапи от развитие на болестта се наблюдават контрактури на лакетните стави.
	При 30% от пациентите се забелязва умствено изоставане.	
5. Електромиография	Къса продължителност, ниски амплитуди, полифазни потенциали на действие, фибрилации и позитивни вълни. Нормална скорост на проводимост на моторния и сензорен нерв.	
6. Креатин фосфокиназа в серума	Най-малко 10-кратно повишение на КК в серума (в зависимост от възрастта и подвижността).	Най-малко 5-кратно повишение на КК в серума (в зависимост от възрастта и подвижността).
7. Мускулна биопсия –хисто-химични данни	Атрофирани и хипертрофирани мускулни влакна разположени разпръснато или на малки групи, огнища от регенериращи мускулни фибри.	
	Наблюдават се хиалинови клетки, разрастване на епи- и перимизилна съединителна тъкан и мастната тъкан, разцепване на клетки (splitting), поява на вътрешни кръгове в цитоплазмата на клетката (coil fibre).	Наблюдават се разпръснати некротични влакна, различна степен на разрастване на мастната и съединителната тъкан в зависимост от етапа на заболяването.
8. Мускулна биопсия имуно-хистохимични данни	Пълна липса на дистрофин в мускулните клетки; при под 5% от случаите се наблюдава слабо положителна реакция на дистрофин при всички мускулни клетки (faint reaction); в някои случаи се откриват	Присъствие на дистрофин в намалено количество и/или наличие на дистрофин с атипична молекулна маса.

	единични или група мускулни клетки с възстановена синтеза на дистрофин (reverted fibres).	
9. ДНК анализ	Мутация в <i>DMD</i> ген и хаплотип идентичен с този при други болни членове на семейството.	
10. Семейна история	Фамилно заболяване със скачено с пола унаследяване.	

**За диагностика на ДМД:**

А. При първи случай в семейството трябва задължително да присъстват критерии:

- а) преди 5<sup>-тата</sup> година - 4, 5, 6, 7, 8
- б) между 5 и 12 годишна възраст - 1, 2, 4, 5, 6 (поне веднъж), 7, 8
- в) след 12<sup>-тата</sup> година - 1, 2, 4, 5, 6 (поне веднъж), 7 (или 8)

Б. При пореден случай в семейството са задължителни следните критерии:

- а) преди 5<sup>-тата</sup> година - 6 и 10
- б) между 5 и 12 годишна възраст - 1, 4, 5, 6 (поне веднъж), 7, 8
- в) след 12<sup>-тата</sup> година - 1, 2, 4, 5, 6 (поне веднъж)

**За диагностика на БМД:**

А. При първи случай в семейството са задължителни критерии: 2, 4, 5, 6 или 7, 8

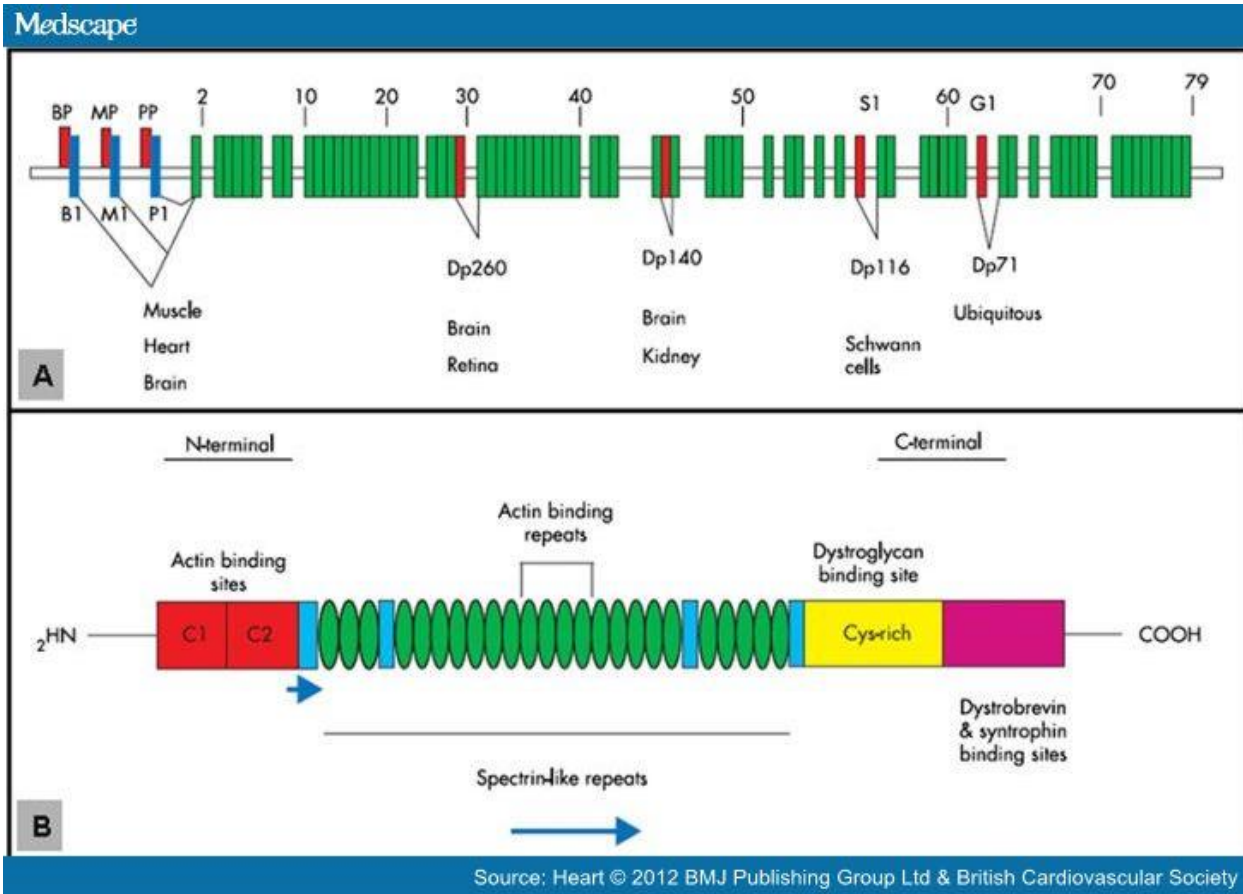
Б. При пореден случай в семейството:

- а) когато пациентът е роднина по права линия на друг болен - 6 (поне два пъти)
  - б) при по-далечно родство - 2, 4, 5, 6 или 7, 8
- Данните представени в таблицата са по Emery, 1994.

В болшинството от случаите (~70%) ДМД има фамилна история, като се предава от клинично здрави майки на техните синове. Останалите 30% от случаите са *de novo*.

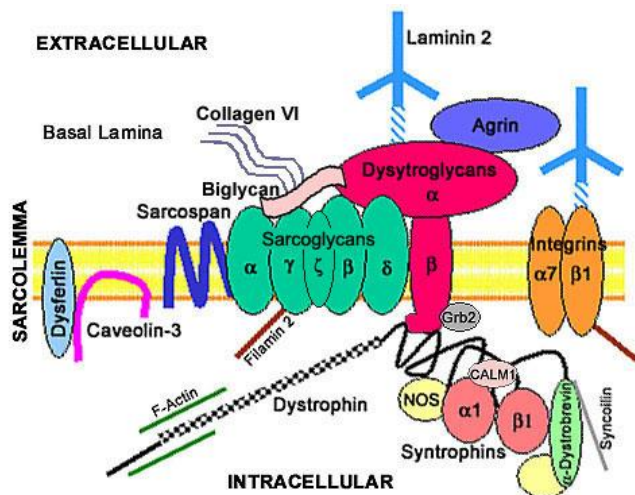
### **3.1.2. Молекулни основи**

**DMD генът** е картиран и клониран на X хромозомата, Xp21 (OMIM\*300377) [Monaco et al., 1985; van Ommen et al., 1986, 1987]. *DMD* генът има 79 екзона [Roberts et al., 1993] и покрива 2.3 милиона бази от късото рамо на X хромозомата. Генът съдържа най-малко седем различни промоторни области, отговорни за тъканно специфични белтъчни изоформи (виж по-горе когнитивни нарушения) (Фигура 8 А). Белтъчният му продукт е наречен дистрофин, с молекулна маса 427 kD и е изграден от 3685 аминокиселини [Hoffman et al., 1987].



**Фигура 8 (А).** Структура на *DMD* гена и локализация на промоторните области, отговорни за тъканно специфични белтъчни изоформи; (Б). Структурна и функционална доменна организация на дистрофина [http://www.medscape.com/viewarticle/758553\_7].

**Дистрофинът** съдържа четири структурно и функционално обособени региона (домена) - N-краен с актин свързващи места, спекtrin-подобен повторен участък, цистеин-богат дистрогликан-свързващ сайт и С-краен домен, отговорен за свързването с дистробревин и синтрофин (Фигура 8 Б). С помощта на електронно-микроскопски изследвания е проучена молекулната организация на дистрофин-гликопротеиновия комплекс, поддържащ цялостта на скелетно-мускулната клетка [Mendell et al., 2006] (Фигура 9).



**Фигура 9.** Модел на дистрофин-гликопротеинов комплекс и връзка между ламинин в екстрацелуларния матрикс и актин в субсарколемалния цитоскелет.

Със своя N-краен домен дистрофинът свързва актина в субсарколемалния цитоскелет, а чрез своя C-краен домен се свързва с  $\beta$ -дистрогликана от дистрогликановия комплекс, разположен в сарколемата. От своя страна  $\alpha$ -дистрогликанът контактува с ламинин в екстрацелуларния матрикс. Така посредством трансмембранните компоненти на дистрофин-гликопротеиновия комплекс дистрофинът участва в осъществяването на връзка между екстрацелуларния матрикс и цитоскелета в клетката. Дистрофинът се свързва и с различни цитоплазмени компоненти като синтрофини и други.

<http://www.neuromuscular.wustl.edu/musdist/dag2/htm>

Природата на *DMD* гена, неговите размери и специфични секвенционни особености вероятно са отговорни за високата мутационна честота на гена – приблизително  $1 \times 10^{-4}$  гена на генерация, една от най-високите честоти докладвани до момента.

Най-често откриваните **мутации** при ДМД и БМД пациенти, ~60-65% са **делеции** на един или повече екзони от гена [den Dunnen et al., 1987; Malhotra et al., 1988; Vaumbach et al., 1989; Oshima et al., 2009]. Делециите са разположени в два горещи делеционни региона на гена, дистален около екзон 44 и проксимален около 7<sup>ми</sup> екзон. Установено е, че съотношението на проксималните към дисталните делеции е 1:3 при изолирани случаи и 1:1 при фамилни случаи. Вероятно проксималните делеции се случват по-рано в ембрионалното развитие, поради което имат по-голям шанс да се унаследят, докато дисталните делеции се случват по-късно и по-често причиняват изолирани случаи. Следователно вероятността за възникване на проксимални нови мутации е около 30%, а на дистални – 4% [Passos-Bueno et al., 1992].

Предполага се, че **точките на разкъсване** на гена за генериране на делеции лежат в интроните. На тази база беше направено проучване на разпределението на делеционните начални и крайни точки на разкъсване (като за начална условно се приема 5', а за крайна 3' позицията на делецията) по дължината на гена, при групи пациенти от различни популации [Danieli et al., 1993]. Данните показват популационни разлики. Интрон 7 се явява еднакво засегнат от начални и крайни точки на разкъсване, докато в интрон 44 от главната гореща делеционна област са концентрирани предимно 5' точки на разкъсване. Точките на

разкъсване изглежда се натрупват преимуществено в някои интрони. Тези интрони във времето може да акумулират разлики при различни популации, което авторите отдават на действието на генетичния дрефт. Честотата на делециите и разпределението на точките на разкъсване по дължината на *DMD* гена бяха проучени подробно и при български пациенти [Todorova et al., 1996] (виж по-долу раздел „Собствени резултати“).

Точното картиране и прецизиране позицията на разкъсване на гена в хода на делетирането на дадена последователност е затруднено поради огромните и неизвестни интронни секвенции, където тези точки на разкъсване попадат. Все още почти нищо не е известно за механизмите на разкъсване на гена и генериране на мутации и в частност на големи делеции. Наблюдава се еднаква или много близка мутационна честота при мъже и жени [Mueller and Grimm, 1986; Darras et al., 1988; Bakker, 1989], което свидетелства за участието както на мейотични така и на митотични събития в този сложен процес. Ясно е обаче, че механизмът за генериране на делеции не е просто неравновесен кросинговър, защото в противен случай делециите и дупликациите би трябвало да се случват с еднаква честота, а експерименталните данни показват много по-ниска честота на дупликации.

Резултатите показват, че около **30% от делециите са de novo** възникнали в болните деца. Майки на болни деца с ДМД/БМД, при които е отхвърлено носителство в лимфоцитарната ДНК, имат риск повторно да родят болно дете поради т. нар. **герминативен мозаицизъм**, който се среща с честота 14%-18% [Bakker et al., 1989]. Мозаицизмът се обяснява с мутация, настъпила в единична клетка в организма в някои от ранните етапи на ембриогенезата, при което е засегнат само клонът от клетки, нейни наследници. Мутацията може да засегне както соматични така и герминативни клетки. Жена, с герминативен мозаицизъм може да предаде в потомството си както нормални, така и мутантни алели. Възникването на соматичен мозаицизъм е обяснение на редките случаи на жени с ДМД [Matthews et al., 1995]. Друго обяснение на феномена клинично изявено носителство е преимущественото инактивиране на здравата X хромозома. Тежестта на изявата на болестта в тези случаи зависи от процентното съотношение на клетки с активна болна X хромозома. Герминативен мозаицизъм се наблюдава по-често при проксимални мутации (79%) отколкото при дистални (21%) [Bakker et al., 1989].

**Дупликациите** са друг вид молекулен дефект, засягащ *DMD* гена. Те са отговорни за болестния фенотип в ~7% от случаите [White et al., 2006]. За тях също е характерно

специфично разпределение по интрони. Този тип мутации са концентрирани главно в проксималната част на гена с гореща точка в интрон 7 [Galvagni et al., 1994].

Дупликациите в *DMD* гена се дължат най-вероятно на хомоложна и нехомоложна вътрехромозомна рекомбинация с участието на повторени елементи като *Alu* секвенции [Hu et al., 1991; Bailey et al., 2003]. Грешки в репликацията също могат да доведат до възникване на големи делеции и дупликации в *DMD* гена [Baldrich et al., 1992].

Причини за по-ниската честота на дупликации в сравнение с тази на делециите:

- делециите е по-вероятно да водят до клинична изява. Това обяснение изглежда малко вероятно при ДМД/БМД, където фенотипът зависи главно от рамката на четене, а не от природата на нарушението.

- не всички механизми, водещи до възникване на делеции генерират дупликации като реципрочен продукт.

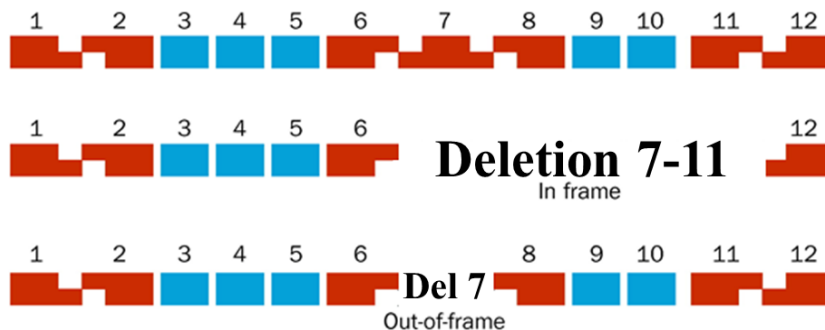
- дупликациите са нестабилни и се превръщат сравнително бързо в делеции.

Друга причина за ниския процент на докладваните дупликации в дистрофиновия ген беше дългогодишната липса на достатъчно чувствителен и удобен за рутинно приложение метод за откриване на дупликации. Тази причина вече е елиминирана с въвеждането на нов количествен метод за детекция на делеции/дупликации в *DMD* гена Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA) метод [www.mlpa.com] (виж по-надолу текста). На тази база честотата на дупликациите в *DMD* гена към днешна дата е прецизно установена около 7%.

При около 25% от пациентите не се откриват големи делеции или дупликации и молекулярният дефект остава неизвестен. В тези случаи става въпрос за **точкови мутации** – еднуклеотидни замени, малки делеции, дупликации или инсерции, които водят до възникване на стоп кодон (nonsense), промяна на рамката на четене (frameshift), замяна на една аминокиселина с друга (missense) или оказват влияние върху снаждането на иРНК (splice-site mutations). Охарактеризирането на този тип дефекти в *DMD* гена представляваше най-голямо предизвикателство за генетиците в последните години, поради огромните размери на *DMD* гена и трудното му покриване с наличните тогава несъвършени технологии като SSCP (single strand conformation polymorphism) анализ и секвениране по Sanger екзон по екзон с радиоактивно маркиране и отчитане на резултатите чрез автордиография (виж по-надолу в глава резултати).

### 3.1.3. Генотип-фенотипни корелации

Интерес представлява връзката между вида на молекулярния дефект и тежестта на изява на заболяването. Тъй като, при пациенти с форма на Дюшен и форма на Бекер е засегнат един и същи ген (алелни заболявания), вероятно разликата в тежестта на протичане на заболяванията се дължи на различен тип молекулен дефект. Опит за обяснение на разликите във фенотипната изява на заболяването прави Monaco през 1988 година. Според неговата хипотеза, делеции/дупликации, които водят до промяна на рамката на четене (frameshift делеции), са отговорни за по-тежката форма на заболяването [Monaco et al., 1988]. Обратно, в случаите когато рамката на четене остава незасегната (in frame делеции), се наблюдава по-леко протичане на болестта (Фигура 10).



**Фигура 10.** Схематично представяне на *in frame* и *out-of-frame* делеции.

Frameshift мутациите обикновено са свързани с тежката форма на заболяването, тъй като при промяна на рамката на четене се генерира преждевременно прекратяване на транслацията. In frame делециите могат да доведат до намаляване експресията на белтъка или намаляване на неговата функционална активност. Субституциите водят до два типа мутации - nonsense и missense мутации. При nonsense мутациите замяната на една база с друга води до генериране на стоп кодон. В резултат се получава преждевременно спиране на транслацията и съответно дистрофин не се синтезира. Missense мутациите са свързани със замяната на една аминокиселина с друга, или настъпва промяна само в триплета без да променя аминокиселината в белтъка. Nonsense мутациите са отговорни за изява на заболяването. За разлика от тях обаче, при missense мутации такава сигурност не съществува. Тази замяна може да е полиморфизъм, който не се отразява върху фенотипната

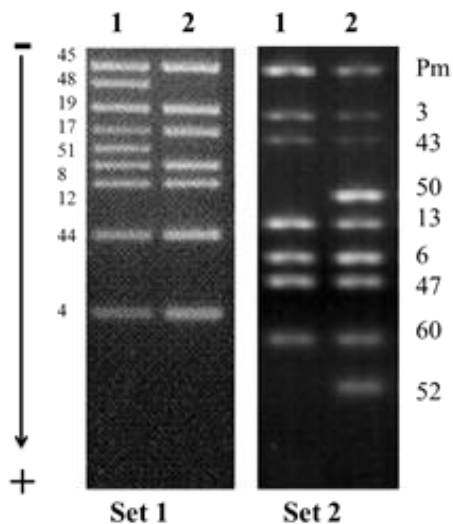
изява на гена. Не е изключено, обаче, натрупването на повече от една missense мутация да оказва ефект върху тежестта на клинична изява.

### **3.1.4. Собствени резултати: 20 годишен опит в ДНК диагностиката и профилактиката на прогресивна мускулна дистрофия тип Дюшен/Бекер**

Бурното развитие на генетиката от ерата на картиране и клониране на първите човешки гени и търсене на мутации ген-по-ген до ерата на прочитане на целия човешки геном и приложение на геномните технологии в диагностиката на пациенти, се визуализира много добре върху такъв огромен ген, какъвто е *DMD* генът. Аз имах шанса да започна кариерата си в областта на молекулярната диагностика именно с диагностика на *DMD* гена, което в началото на 90-те години на миналия век от технологична гледна точка беше истинско предизвикателство. Генът вече беше картиран и клониран, но поради огромните му размери и технологични ограничения, беше немислимо да го анализираме изцяло.

#### **Делеции в *DMD* гена**

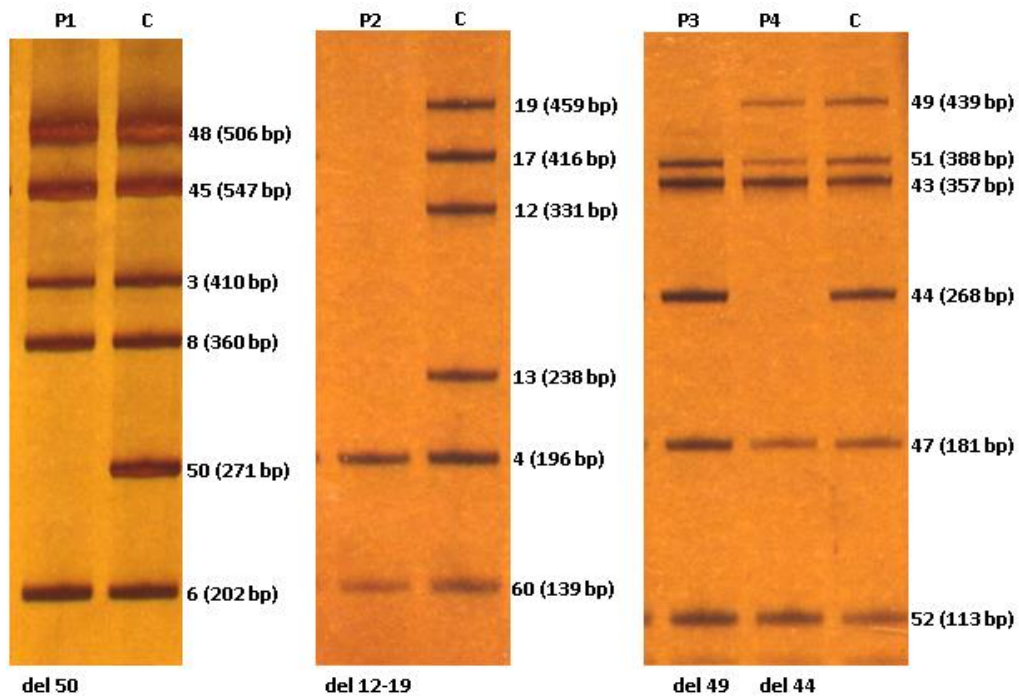
Благодарение на високата честота на делециите (~65%) и преимущественото им разположение в делеционни горещи точки по дължината на гена, диагностичните лаборатории в цял свят разполагахме с праймери за 18 екзона, които се анализираха в две мултиплексни реакции от по девет екзона, съгласно оригиналните протоколи на Chamberlain et al., [1989] и Beggs et al., [1990]. Съчетаното използване на двата набора от праймери, позволяваше откриване на 98% от делециите при индексните пациенти. При момчета, липсата на PCR продукт за даден екзон показва, че този екзон(и) липсва(т) в генома на пациента (Фигура 11). За да се постигне добро разделяне на 9 PCR фрагмента в една реакция и да може да се даде категоричен диагностичен резултат, разделянето се извършваше чрез 3% NuSieve агарозна електрофореза, след продължителна 4-5 часова битка за стапяне на агарозата и приготвяне на този висок процент гел (Фигура 11). Получените резултати често пъти бяха с незадоволително качество и се налагаше повторение. Същата методика се използваше и за целите на пренаталната диагностика в засегнатите семейства, при установяване на фетус от мъжки пол.



**Фигура 11.** Агарозна гел електрофореза на мултиплексен PCR; Set 1 Chamberlain; Set 2 Beggs.  
 Set 1 проба 2 – делеция на екзони 48-51;  
 Set 2 проба 1 – делеция на екзони 50-52.

В последствие, тази трудоемка методика, водеща до редица проблемни при интерпретиране на резултатите беше модифицирана в колаборация с екипа на проф. Gian-Antonio Danieli, University of Padua, Italy. Изследваните 18 екзона, бяха разделени в 3 реакции по 6 екзона (вместо 2 по 9 екзона), като разделянето се извършваше посредством акриламидна вертикална електрофореза и фрагментите се отчитаха след оцветяване със сребърен нитрат (Фигура 12) [Todorova et al., 1996]. По този начин интерпретацията на получените резултати беше недвусмислена и категорична. Единственото условие за успешното интерпретиране на резултатите с помощта на тази методика, беше нуждата да се познава статията на Neilan et al., [1993], които установиха, че екзони 45 и 48 от *DMD* гена в акриламидна решетка не мигрират по размер, а по конформация и съответно по-тежкият екзон се движи по-бързо в гела, а по-лекият по-бавно (виж Фигура 12).

С помощта на мултиплексна амплификация на 18 екзона от *DMD* гена успяхме да изясним около 65-68% от случаите с ДМД/БМД. Откритите делеции при български пациенти са съобщавани многократно в литературата [Bronzova et al., 1994; Todorova et al., 1996; Todorova, 1999, дисертационен труд].



**Фигура 12.** Мултиплексен PCR в акриламидна електрофореза, оцветяване със сребърен нитрат. P1-4 – пациент, C – контрола; P1 – делеция на екзон 50; P2 – делеция на екзони 12-19; P3 – делеция на екзон 49; P4 – делеция на екзон 44. Амплифицираните екзони и техният размер в базови двойки (bp) са представени в дясно. Делетираните екзони са показани отдолу. Екзони 45 и 48 в акриламиден гел не мигрират по размер, а по конформация.

В колаборация с екипа на проф. Gian-Antonio Danieli, University of Padua, Italy успяхме да излезем извън обсега на рутинно изследваните 18 екзона от дистрофиновия ген, като имахме възможност да анализираме допълнителни единични екзони в 5' и 3' края на делецията, с цел да се определят точните граници на делетирания фрагмент. От научна гледна точка търсенията ни бяха фокусирани върху разпределение на делеционните точки на разкъсване по дължината на *DMD* гена [Danieli et al., 1993]. Резултатите показаха, че има популационни разлики, като най-богат на точки на разкъсване се явяваше интрон 44 от *DMD* гена, наречен „класическа“ гореща точка [Danieli et al., 1993]. Изследването при български пациенти отново показва уникални генетични характеристики за нашата популация. При изследването на сравнително малка група български пациенти по онова време (84 пациента) най-богат на точки на разкъсване се оказа интрон 50 (16%), а в региона 45-51 интрон бяха позиционирани повече от 54% от делеционните граници [Todorova et al., 1996]. Към 2015 година броят на изследваните ДМД/БМД пациенти е 260, от които 147 (73%) ДМД; 57 (22%) БМД и 13 (5%) с междинен фенотип. Цялата група пациенти е скринирана за делеции по дължината на *DMD* гена. Откритите делеции са 174

(174/260=67%). Този процент отговаря на очаквания по литературни данни (виж обзора). Делециите, открити при български пациенти са представени в Таблица 2.

**Таблица 2.** Делеции при български пациенти с ДМД/БМД.

№	Диагноза	Делеция	Reading frame	5' breakpoint в интрон	3' breakpoint в интрон
1	ДМД	13-50 с.1483-?_7309+?del	out-of-frame	12	50
2	ДМД	3-21...24 с.94-?_2803+?del.....	---	2	---
3	ДМД	49-50 с.7099-?_7309+?del	out-of-frame	48	50
4	ДМД	50-52 с.7201-?_7660+?del	out-of-frame	49	52
5	ДМД	45-50 с.6439-?_7309+?del	out-of-frame	44	50
6	ДМД	53-54 с.7661-?_8027+?del	out-of-frame	52	54
7	ДМД	45-52 с.6439-?_7660+?del	out-of-frame	44	52
8	ДМД	51-54 с.7310-?_8027+?del	out-of-frame	50	54
9	ДМД	51-52 с.7310-?_7660+?del	in-frame	50	52
10	ДМД	51 с.7310-?_7542+?del	out-of-frame	50	51
11	БМД	45-48 с.6439-?_7098+?del	in-frame	44	48
12	БМД	45 с.6439-?_6614+?del	out-of-frame	44	45
13	ДМД	4-12 с.187-?_1482+?del	in-frame	3	12
14	ДМД	1- 47 с.-244-?_6912+?del	липса на иРНК и белт. продукт	Промотор	47
15	БМД	11-44 с.1150-?_6438+?del	in-frame	10	44
16	БМД	45-51 с.6439-?_7542+?del	in-frame	44	51
17	БМД	3 с.94-?_186+?del	in-frame	2	3
18	ДМД	49-51 с.7099-?_7542+?del	in-frame	48	51
19	ДМД	52 с.7543-?_7660+?del	out-of-frame	51	52
20	ДМД	49-51 с.7099-?_7542+?del	in-frame	48	51
21	ДМД	48-50 с.6913-?_7309+?del	out-of-frame	47	50

22	БМД	6 c.358-?_530+?del	out-of-frame	5	6
23	ДМД	48-51 c.6913-?_7542+?del	in-frame	47	51
24	ДМД	45-54 c.6439-?_8027+?del	out-of-frame	44	54
25	БМД	45-48 c.6439-?_7098+?del	in-frame	44	48
26	ДМД	46-50 c.6615-?_7309+?del	out-of-frame	45	50
27	ДМД	48-50 c.6913-?_7309+?del	out-of-frame	47	50
28	ДМД	35...41-45 .....c.5740-?_6614+?del	---	---	45
29	ДМД	18...19...20 ...c.2293-?_2380+?del..	---	---	---
30	ДМД	50 c.7201-?_7309+?del	out-of-frame	49	50
31	ДМД	50-52 c.7201-?_7660+?del	out-of-frame	49	52
32	ДМД	48-51 c.6913-?_7542+?del	in-frame	47	51
33	ДМД	6-7 c.358-?_649+?del	out-of-frame	5	7
34	ДМД	12-34...40 c.1332-?_4845+?del...	---	11	---
35	ДМД	49-50 c.7099-?_7309+?del	out-of-frame	48	50
36	ДМД	1 c.-244-?_31+?del	липса на иРНК и белт. продукт	Промотор	1
37	БМД	3-7 c.94-?_649+?del	out-of-frame	2	7
38	ДМД	44 c.6291-?_6438+?del	out-of-frame	43	44
39	ДМД	51 c.7310-?_7542+?del	out-of-frame	50	51
40	ДМД	51-55 c.7310-?_8217+?del	out-of-frame	50	55
41	ДМД	48-50 c.6913-?_7309+?del	out-of-frame	47	50
42	ДМД	42-45 c.5923-?_6614+?del	out-of-frame	41	45
43	ДМД	48-51 c.6913-?_7542+?del	in-frame	47	51
44	БМД	45-48 c.6439-?_7098+?del	in-frame	44	48
45	ДМД	46-51 c.6615-?_7542+?del	out-of-frame	45	51
46	ДМД	52 c.7543-?_7660+?del	out-of-frame	51	52
47	ДМД	44 c.6291-?_6438+?del	out-of-frame	43	44
48	ДМД	12-29...31	---	11	---

		c.1332-?_4071+?del....			
49	ДМД	50 c.7201-?_7309+?del	out-of-frame	49	50
50	ДМД	49-51 c.7099-?_7542+?del	in-frame	48	51
51	БМД	45-47 c.6439-?_6912+?del	in-frame	44	47
52	ДМД	44 c.6291-?_6438+?del	out-of-frame	43	44
53	ДМД	49-50 c.7099-?_7309+?del	out-of-frame	48	50
54	ДМД	48-50 c.6913-?_7309+?del	out-of-frame	47	50
55	ДМД	42-43 c.5923-?_6290+?del	out-of-frame	41	43
56	ДМД	49-50 c.7099-?_7309+?del	out-of-frame	48	50
57	ИМД	45-51 c.6439-?_7542+?del	in-frame	44	51
58	БМД	45-49 c.6439-?_7200+?del	in-frame	44	49
59	ДМД	46-51 c.6615-?_7542+?del	out-of-frame	45	51
60	ИМД	3-7 c.94-?_649+?del	out-of-frame	2	7
61	ДМД	49-54 c.7099-?_8027+?del	out-of-frame	48	54
62	ДМД	45-51 c.6439-?_7542+?del	in-frame	44	51
63	ДМД	49-52 c.7099-?_7660+?del	out-of-frame	48	52
64	ДМД	44 c.6291-?_6438+?del	out-of-frame	43	44
65	ДМД	30...32-43 ...c.4345-?_6290+?del	---	---	43
66	ДМД	53 c.7661-?_7872+?del	out-of-frame	52	53
67	ДМД	49-50 c.7099-?_7309+?del	out-of-frame	48	50
68	ДМД	3-11 c.94-?_1331+?del	out-of-frame	2	11
69	ДМД	45-52 c.6439-?_7660+?del	out-of-frame	44	52
70	ДМД	49-50 c.7099-?_7309+?del	out-of-frame	48	50
71	ДМД	[17]...18 c.1993-?_2168+?del...	---	16	---
72	ДМД	53-54 c.7661-?_8027+?del	out-of-frame	52	54
73	ДМД	52 c.7543-?_7660+?del	out-of-frame	51	52
74	ДМД	48-50 c.6913-?_7309+?del	out-of-frame	47	50

75	ИМД	51 c.7310-?_7542+?del	out-of-frame	50	51
76	БМД	45-47 c.6439-?_6912+?del	in-frame	44	47
77	ДМД	45-54 c.6439-?_8027+?del	out-of-frame	44	54
78	ДМД	44 c.6291-?_6438+?del	out-of-frame	43	44
79	ИМД	48-50 c.6913-?_7309+?del	out-of-frame	47	50
80	ДМД	48-50 c.6913-?_7309+?del	out-of-frame	47	50
81	БМД	45 c.6439-?_6614+?del	out-of-frame	44	45
82	ДМД	51-52 c.7310-?_7660+?del	in-frame	50	52
83	ДМД	51-52 c.7310-?_7660+?del	in-frame	50	52
84	ДМД	51-52 c.7310-?_7660+?del	in-frame	50	52
85	ДМД	50-52 c.7201-?_7660+?del	out-of-frame	49	52
86	ДМД	3-7 c.94-?_649+?del	out-of-frame	2	7
87	БМД	45-47 c.6439-?_6912+?del	in-frame	44	47
88	БМД	45-47 c.6439-?_6912+?del	in-frame	44	47
89	ДМД	45-50 c.6439-?_7309+?del	out-of-frame	44	50
90	ДМД	44 c.6291-?_6438+?del	out-of-frame	43	44
91	ДМД	45-52 c.6439-?_7660+?del	out-of-frame	44	52
92	ДМД	8-42 c.650-?_6117+?del	out-of-frame	7	42
93	ДМД	12-43 c.1332-?_6290+?del	in-frame	11	43
94	ДМД	12-45 c.1332-?_6614+?del	in-frame	11	45
95	ДМД	48-50 c.6913-?_7309+?del	out-of-frame	47	50
96	БМД	45-48 c.6439-?_7098+?del	in-frame	44	48
97	ДМД	46...[47] ...c.6763-?_6912+?del	---	---	47
98	ДМД	5-6 c.265-?_530+?del	out-of-frame	4	6
99	ДМД	48 c.6913-?_7098+?del	in-frame	47	48
100	ДМД	51 c.7310-?_7542+?del	out-of-frame	50	51
101	ДМД	[45]...46	---	44	---

		c.6439-?_6614+?del			
102	ДМД	79 c.11047-?_*2691+?del	нестабилна иРНК	78	5' UTR
103	ДМД	49-52 c.7099-?_7660+?del	out-of-frame	48	52
104	ДМД	49-52 c.7099-?_7660+?del	out-of-frame	48	52
105	ДМД	46...47-54...59 ...c.6763-?_8027+?del..	---	---	---
106	ДМД	46-52 c.6615-?_7660+?del	out-of-frame	45	52
107	ДМД	49-50 c.7099-?_7309+?del	out-of-frame	48	50
108	ДМД	16-17 c.1813-?_2168+?del	out-of-frame	15	17
109	БМД	45-48 c.6439-?_7098+?del	in-frame	44	48
110	ИМД	46...47-51 ...c.6763-?_7542+?del	---	---	51
111	ДМД	7...8-43 ...c.650-?_6290+?del	---	---	43
112	ИМД	46-50 c.6615-?_7309+?del	out-of-frame	45	50
113	ДМД	49-50 c.7099-?_7309+?del	out-of-frame	48	50
114	БМД	45-47 c.6439-?_6912+?del	in-frame	44	47
115	БМД	45-48 c.6439-?_7098+?del	in-frame	44	48
116	БМД	45-53 c.6439-?_7872+?del	in-frame	44	53
117	ДМД	45-50 c.6439-?_7309+?del	out-of-frame	44	50
118	ДМД	52 c.7543-?_7660+?del	out-of-frame	51	52
119	ДМД	55 c.8028-?_8217+?del	out-of-frame	54	55
120	ДМД	58 c.8548-?_8668+?del	out-of-frame	57	58
121	БМД	45-49 c.6439-?_7200+?del	in-frame	44	49
122	БМД	45-48 c.6439-?_7098+?del	in-frame	44	48
123	ДМД	18...19-21...42 ...c.2293-?_2803+?del..	---	---	---
124	БМД	48 c.6913-?_7098+?del	in-frame	47	48
125	ДМД	46...47-51 ...c.6763-?_7542+?del	---	---	51
126	БМД	45-47 c.6439-?_6912+?del	in-frame	44	47
127	ДМД	51 c.7310-?_7542+?del	out-of-frame	50	51

128	ДМД	44 c.6291-?_6438+?del	out-of-frame	43	44
129	ДМД	46-50 c.6615-?_7309+?del	out-of-frame	45	50
130	ДМД	49-50 c.7099-?_7309+?del	out-of-frame	48	50
131	ДМД	18-37 c.2169-?_5325+?del	out-of-frame	17	37
132	ДМД	8-53 c.650-?_7872+?del	out-of-frame	7	53
133	ДМД	50-52 c.7201-?_7660+?del	out-of-frame	49	52
134	ДМД	46-50 c.6615-?_7309+?del	out-of-frame	45	50
135	ИМД	... 3-6 ... 8 ...c.94-?_530+?del...	---	---	---
136	БМД	3-7 c.94-?_649+?del	out-of-frame	2	7
137	ДМД	46-52...60 c.6615-?_7660+?del...	---	45	---
138	БМД	45-47 c.6439-?_6912+?del	in-frame	44	47
139	БМД	45-47 c.6439-?_6912+?del	in-frame	44	47
140	ИМД	45 c.6439-?_6614+?del	out-of-frame	44	45
141	БМД	45-48 c.6439-?_7098+?del	in-frame	44	48
142	ИМД	45-50 c.6439-?_7309+?del	out-of-frame	44	50
143	ДМД	46-49 c.6615-?_7200+?del	out-of-frame	45	49
144	БМД	45-47 c.6439-?_6912+?del	in-frame	44	47
145	ДМД	2...3-6...8 ...c.94-?_530+?del...	---	---	---
146	ДМД	4...6-13...17 ...c.358-?_1602+?del...	---	---	---
147	ДМД	48-50 c.6913-?_7309+?del	out-of-frame	47	50
148	ДМД	51 c.7310-?_7542+?del	out-of-frame	50	51
149	ДМД	45-48 c.6439-?_7098+?del	in-frame	44	48
150	БМД	45-47 c.6439-?_6912+?del	in-frame	44	47
151	БМД	45-47 c.6439-?_6912+?del	in-frame	44	47
152	БМД	3-7 c.94-?_649+?del	out-of-frame	2	7
153	ДМД	44 c.6291-?_6438+?del	out-of-frame	43	44
154	БМД	45-47	in-frame	44	47

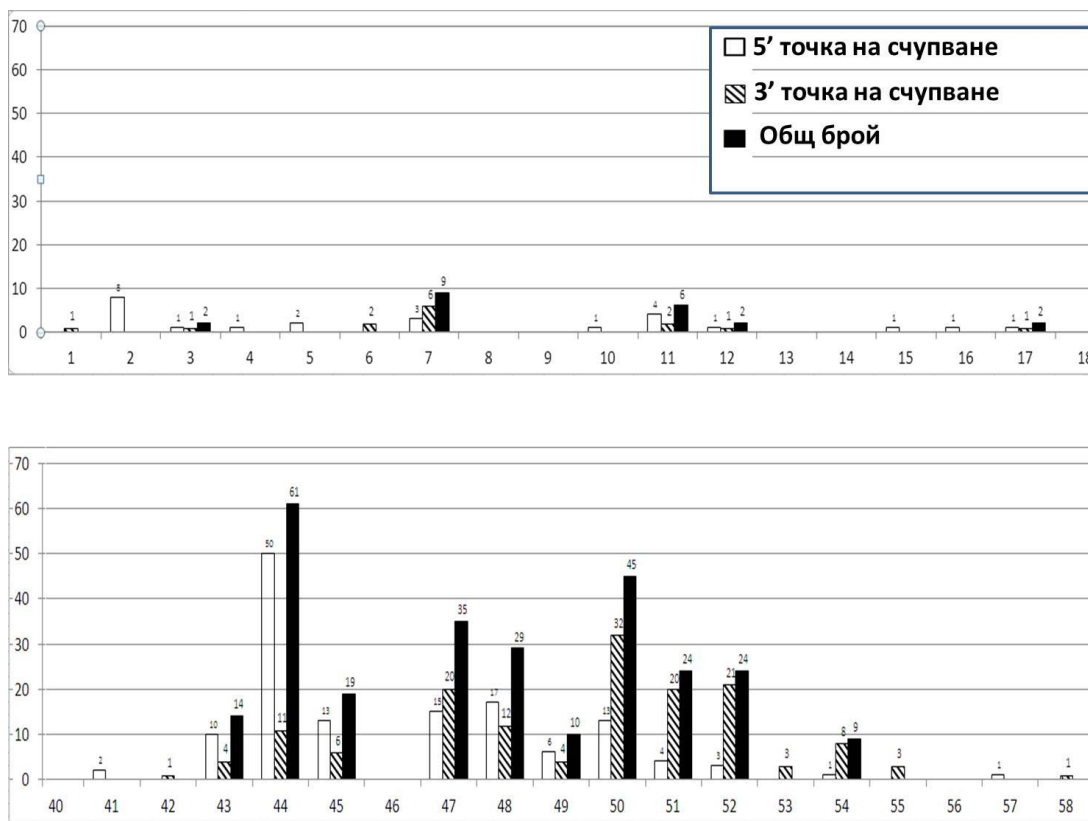
		c.6439-?_6912+?del			
155	БМД	45-47 c.6439-?_6912+?del	in-frame	44	47
156	ДМД	46-55 c.6615-?_8217+?del	out-of-frame	45	55
157	ДМД	46-50 c.6615-?_7309+?del	out-of-frame	45	50
158	ДМД	45-50 c.6439-?_7309+?del	out-of-frame	44	50
159	БМД	45-47 c.6439-?_6912+?del	in-frame	44	47
160	ДМД	8-11 c.650-?_1331+?del	out-of-frame	7	11
161	ДМД	44 c.6291-?_6438+?del	out-of-frame	43	44
162	БМД	45-47 c.6439-?_6912+?del	in-frame	44	47
163	БМД	45-47 c.6439-?_6912+?del	in-frame	44	47
164	ДМД	45-54 c.6439-?_8027+?del	out-of-frame	44	54
165	ДМД	45-48 c.6439-?_7098+?del	in-frame	44	48
166	ДМД	45-52 c.6439-?_7660+?del	out-of-frame	44	52
167	ДМД	48-50 c.6913-?_7309+?del	out-of-frame	47	50
168	ДМД	46-47 c.6615-?_6912+?del	out-of-frame	45	47
169	ДМД	45-49 c.6439-?_7200+?del	in-frame	44	49
170	ДМД	49-54 c.7099-?_8027+?del	out-of-frame	48	54
171	ДМД	51 c.7310-?_7542+?del	out-of-frame	50	51
172	ДМД	46-52 c.6615-?_7660+?del	out-of-frame	45	52
173	ДМД	44 c.6291-?_6438+?del	out-of-frame	43	44
174	БМД	45-47 c.6439-?_6912+?del	in-frame	44	47

ИМД – интермедиерна мускулна дистрофия

При 153 от откритите делеции беше възможно да се оцени ефекта на делецията върху рамката на четене на генетичната информация и в 102 от случаите (102/153=67%) делецията нарушава рамката на четене (out-of-frame), докато в останалите 51 случая (51/153=33%) рамката на четене се запазва (in-frame). При 18 пациента с ДМД фенотип

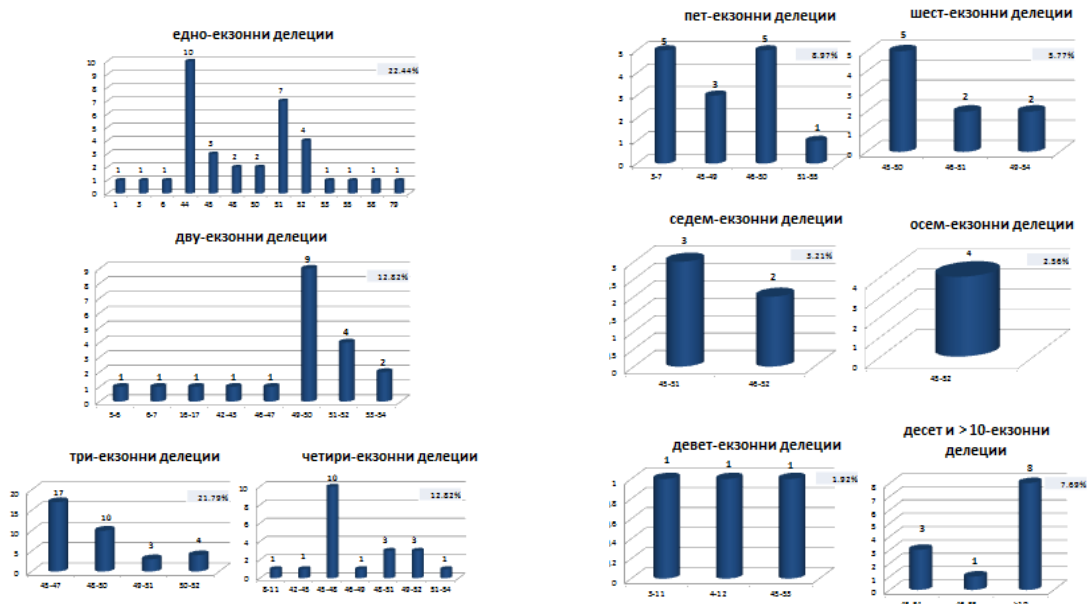
делецията е in-frame и при 6 пациента с БМД фенотип делецията е frameshift. Това са около 16%, които противоречат на хипотезата на Мопасо и сътр. [1988] за връзка между нарушена рамка на четене на генетичната информация и тежестта на клинична изява на заболяването.

Прецизно бяха позиционирани по интрони 321 делеционни точки на разкъсване (deletion breakpoints). Разпределението им по интрони е представено в Таблица 2 и схематично на Фигура 13. Новите резултати по отношение разпределението на делеционните точки на разкъсване при български пациенти, вече на базата на значително по-голяма група анализирани делеции и съответно breakpoints показват, че нашите резултати не се различават от общоевропейските. Най-голям брой точки на разкъсване 19% попадат в 44 интрон (61/321), следван от 50 интрон 14% (45/321), който остава като специфична характеристика на делециите при български ДМД/БМД пациенти (виж Фигура 13). В региона 40-ти-55-ти интрон бяха позиционирани 87% от делеционните граници (Фигура 13).



**Фигура 13.** Разпределение на 5' и 3' делеционните точки на разкъсване по интрони.

По отношение на броя делетирани екзони, делециите в *DMD* гена са твърде разнообразни. Най-чести са делециите на един и три екзона, следвани от делеции на два и четири екзона (Фигура 14). Големи делеции на 6 и повече екзона са сравнително рядко срещани (Фигура 14).

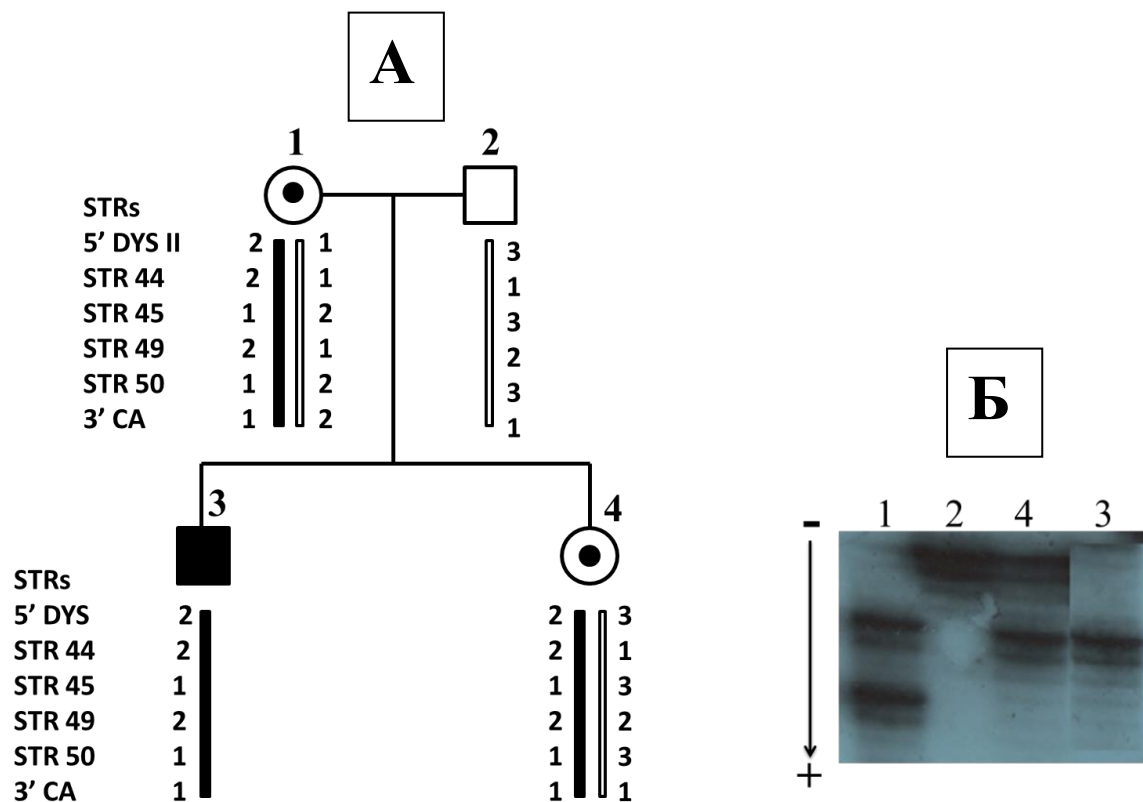


**Фигура 14.** Големина на делециите в *DMD* гена при български пациенти. Делетираните екзони са представени с цифри под всеки бар. Броят пациенти, носещи една и съща делеция е представен над всеки бар. Честотата на всяка група делеции е представена в проценти в горния десен ъгъл на всеки плот.

### Определяне на носителство в засегнатите семейства посредством индиректен полиморфен анализ

В останалите семейства с неясен генен дефект (~35%), по онова време няхаме други технологични възможности за търсене на дупликации и точкови мутации. Поради това, клиничната диагноза се приемаше за достоверна и за изясняване на носителския статус на жените от рисковите фамилии, както и за целите на пренаталната диагностика, прилагаме индиректен анализ за проследяване унаследяването на засегнатия ген във фамилията. Този вид анализ се извършва с помощта на високоинформативни полиморфни маркери, разположени в двата края и във вътрешността на *DMD* гена. Полиморфните маркери се амплифицираха радиоактивно с помощта на 5'- P<sup>32</sup> – маркиран праймер и

радиоактивна денатурираща акриламидна електрофореза с възможност за разделяне на алели с 2 bp разлика. Резултатите се отчитаха след автордиография (Фигура 15А, Б).

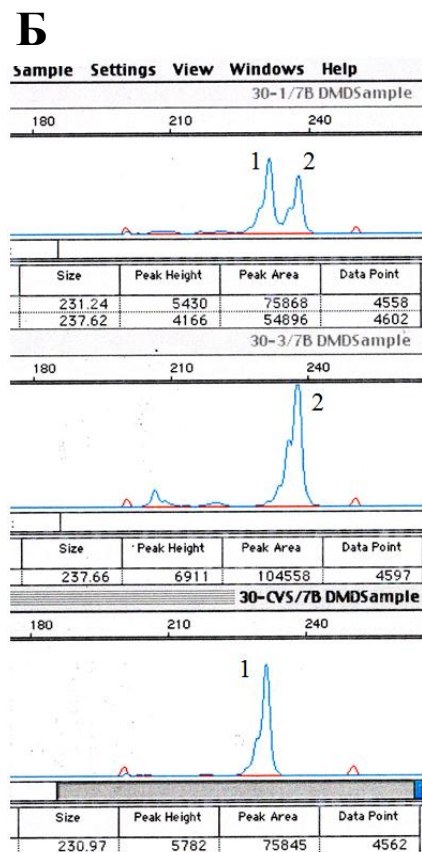
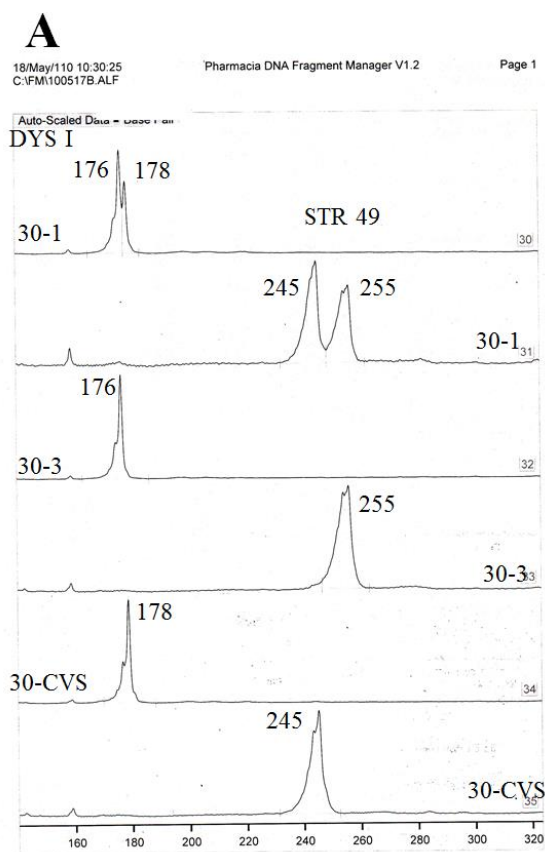


**Фигура 15 (А).** Индиректен полиморфен анализ в ДМД семейство и **(Б).** радиоактивна денатурираща полиакриламидна гел електрофореза. Сестрата носи същия майчин *DMD* ген, както и болното момче, в резултат на което тя е диагностицирана като носител.

В индиректния анализ на семействата с ДМД/БМД се използваха главно полиморфни (CA)<sub>n</sub> динуклеотидни повтори, които бяха добре охарактеризирани като брой алели, честота и процент хетерозиготност за българската популация (Таблица 3) [Bronzova, Todorova et al., 1995]. Поради това, тези маркери продължават да се използват и днес, но само като потвърдителен тест в диагностиката на ДМД/БМД, както и за целите на популационната генетика и тестовете за идентификация на индивида. За щастие, полиморфният анализ вече не се извършва радиоактивно, а се използват флуоресцентни (6-FAM или Cy5) 5'-крайно белязани праймери и електрофоретични техники с лазерна детекция в гелово (ALF Express, Farmacia; Фигура 16 А) или капиларно (ABI310 Genetic Analyzer, Applied Biosystem, California; Фигура 16 Б) изпълнение.

**Таблица 3.** Процент хетерозиготност на маркери, асоциирани с *DMD* гена за българската популация.

Маркер	5' DYS I	5' DYS II	STR 44	STR 45	STR 49	STR 50	3' CA
Хетерозиготност	0.71	0.76	0.81	0.85	0.90	0.77	0.38



**Фигура 16 (А).** Полиморфен индиректен анализ с флуоресцентна детекция на Су5 белязане и **(Б).** 6-FAM белязане.

Използваните маркери днес в асоциация с *DMD* гена са представени в Таблица 4.

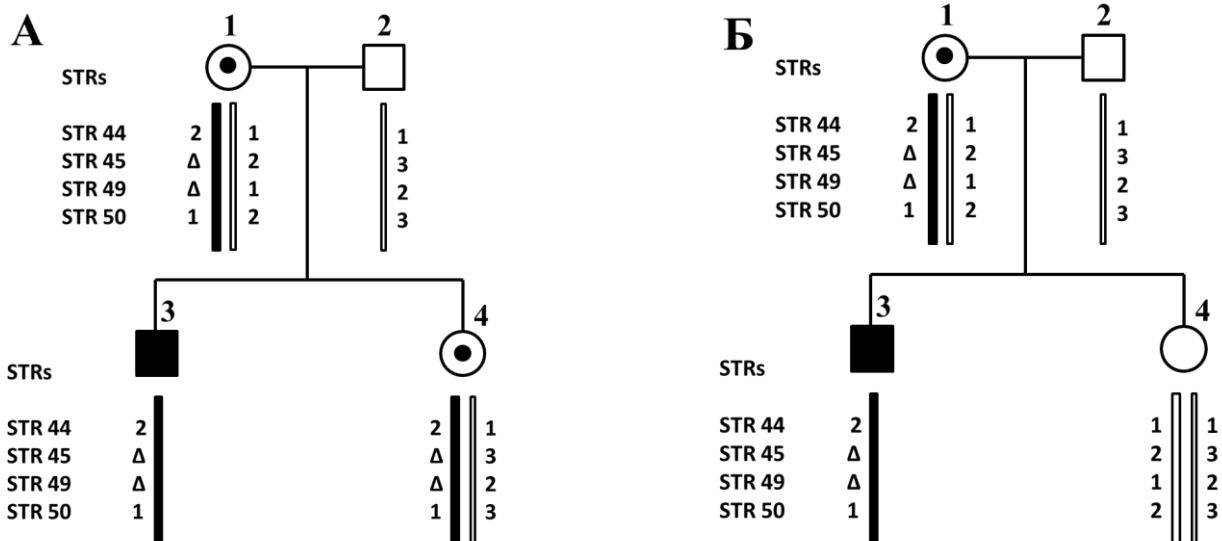
**Таблица 4.** Маркери в и около *DMD* гена, използвани за индиректен анализ.

Маркер	Повтор	Локализация в <i>DMD</i> гена	Дължина в bp	Хетероз. честота	Цитат
5' DYS-III	c.-140132 (TA)8(CA)10	5' Dp427c promoter	252	0.59	Feener [1991]
5' DYS-I	c.-132222 (TG)6(TA)10	5' Dp427c promoter	180	0.61	Feener [1991]
5' DYS-II	-129241 (CA)15	5' Dp427c promoter	206	0.77	Feener [1991]
STR07A	(TC)5TT(CT)12 (CA)17	Интрон 7	226	0.68	DB: Leiden
STR07B	(AC)18	Интрон 7	231	0.44	DB: Leiden
STR-44	(TG)6GG(TG)15 TA(TG)2(AG)14	Интрон 44	196	0.86	Clemens [1991]
44SK12	(GT)18	Интрон 44	181	0.38	Kochling [1995]
44SK21	(GT)22	Интрон 44	165	0.87	Kochling [1995]
STR-45	(CA)28	Интрон 45	172	0.89	Clemens [1991]
STR-48	(GT)18	Интрон 48	105	0.70	DB: Leiden
STR-49	(AC)24	Интрон 49	249	0.93	Clemens [1991]
STR-50	complex (CA)16	Интрон 50	241	0.72	Clemens [1991]
3'DYS CA	c.*461(CA)8 (TACA)1_2(CA)6	Екзон 79	133	0.34	Oudet [1990]
3'-19n8	(GT)18	200 kb 3'екзон 79	148	0.58	King [1994]

DB: Leiden – [www.dmd.nl](http://www.dmd.nl)

Използването на индиректен анализ за диагностични цели крие своите рискове, поради факта че диагнозата може да е неточна, в резултат на което генетичната интерпретация на проблема в семейството е също неточна. С напредването на възможностите за изследване на по-голям брой невромускулни гени установихме, че редица семейства, които са били първоначално с диагноза ДМД бяха неправилно диагностицирани и на базата на генетичния резултат диагнозата беше ревизирана на мускулна дистрофия тип 2А (Limb-girdle muscular dystrophy type 2A, LGMD2A, calpainopathy OMIM#253600) [Georgieva et al., 2005].

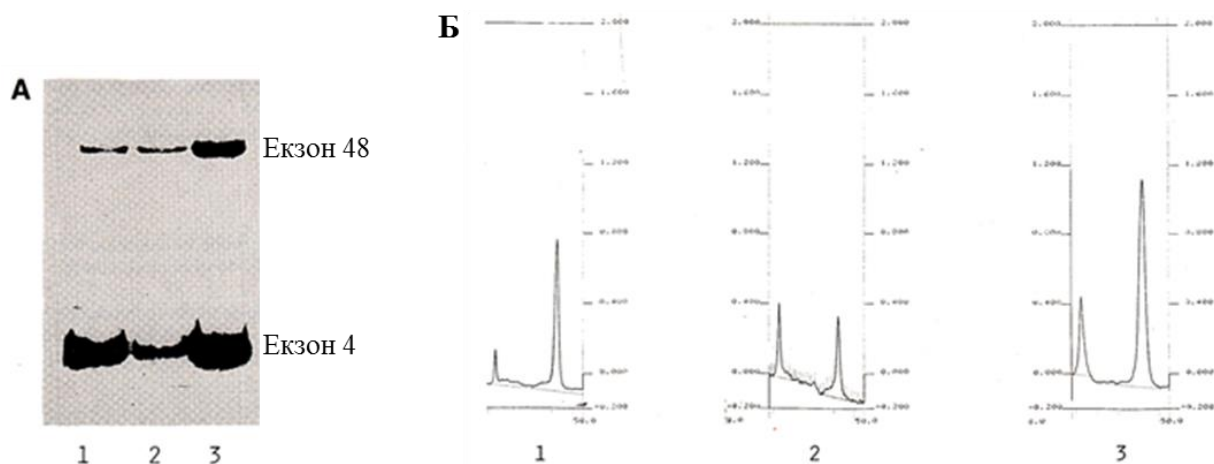
Определянето на носителство на засегнатия ген при жените от ДМД семействата винаги е било сериозно предизвикателство в технологично отношение, поради маскиращия ефект на незасегнатия ген от другата X хромозома. Дълги години технологиите бяха безсилни да преодолеят този проблем и определянето на носителство се базираше на индиректно проследяване на засегнатата X хромозома в поколенията. В някои случаи, ако пациентът е с делеция в *DMD* гена и разполагаме с полиморфни маркери в района на делецията е възможно да се установи загуба на родителски алел в хода на индиректния анализ. Например, провеждаме индиректен анализ в семейство с ДМД: засегнато момче, дъщеря и двамата родители (Фигура 17 А, Б). Болното момче носи *in frame* делеция на екзони 45-49 (ex45ex49del -> c.6439-?\_7200+?del). Индиректният анализ цели да установи кой майчин *DMD* ген, този с делецията (унаследен от болното момче) или другият без делеция е унаследен от дъщерята и на тази база да се отговори на въпроса дали дъщерята е носителка на *DMD* делеция. Полиморфен маркер в делецията показва, че дъщерята има само един алел в този регион и той е идентичен с бащиния. Майката също има само един алел, защото тя най-вероятно е носителка на делецията, открита при нейния син, но този алел не присъства в генотипа на дъщерята. Следователно имаме загуба на майчин алел и директно установяване наличие на делеция при дъщерята (Фигура 17А). В случай че майчиният здрав алел присъства в генотипа на дъщерята, тогава директно се доказва неносителство на *DMD* делеция (Фигура 17Б). Възможно е генотипът на майката да покаже наличие на два алела (хетерозиготен профил) в района на делеция, открита при сина, което показва че майката е неносител на тази делеция в лимфоцитарната си ДНК. Най-вероятно в този случай се касае за нововъзникнал дефект, каквито са ~30% от случаите с ДМД/БМД, но такава находка не е основание за непровеждане на пренатална диагностика при следващи бременности, поради риск от герминативен мозаицизъм 14%-18% [Bakker et al., 1989]. С описаните по-горе примери става ясно, че в някои случаи индиректният анализ може да ни даде директни отговори за носителския статус при рисковите жени.



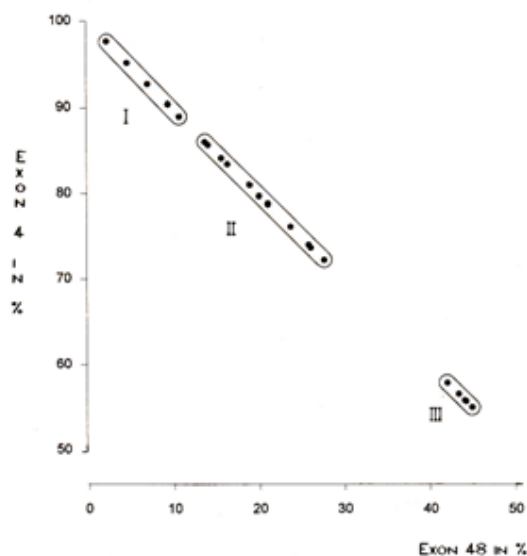
**Фигура 17 (А).** Индиректен анализ в семейство с делеция на екзони 45-49. Майка и сестра носителки; директно доказване на носителство при сестрата чрез загуба на майчин алел в делецията; **(Б).** директно доказване на неносителство при сестрата чрез установяване на хетерозиготност в делецията.

### Определяне на носителство в засегнатите семейства с доказана делеция при индексния пациент

Фактът, че в района на делецията жените носителки имат наполовина намалено алелно съдържание спрямо неносителките ни подтикна да разработим полуколичествен метод за доказване на носителство [Bronzova, Todorova, Kalaydjieva, 1994]. За целта използвахме дуплексен PCR: в една реакция бяха амплифицирани два екзона, един в делецията и един извън делецията, играещ ролята на контрола. Амплификацията беше изпълнявана радиоактивно при 17 цикъла на експоненциално размножаване, при което добивът зависи от количеството ДНК матрица (едно или две копия). Получените продукти бяха разделяни в акриламиден гел и резултатите се визуализираха след автордиография (Фигура 18А). За по-точна количествена оценка на броя алелни копия във всеки един фрагмент, фрагментите от автордиографските плаки бяха подложени на денситометрия и количествена оценка (Фигура 18Б). В някои случаи резултатите получени при носителки на делеции, включващи екзон 48 се разграничаваха трудно от тези при нормални контроли (Фигура 19 групи I и II). Поради това затруднение в интерпретацията на резултатите, както и поради радиоактивното изпълнение на теста и нуждата от специална денситометрична апаратура тази методика беше използвана за диагностични цели много кратко време.



**Фигура 18.** Полуколичествен метод за доказване на хетерозиготно носителство на делеции на базата на амплификация на два екзона, единият в делецията, другият извън нея. **(А).** Радиоактивна електрофореза на двата амплификационни продукта. **(Б).** Денситометрия. Проба 1 – хетерозиготна делеция на екзон 48; проба 2 – хетерозиготна делеция на екзон 4; проба 3 – нормална контрола.



**Фигура 19.** Пропорция на екзонните пикове след денситометрична обработка.

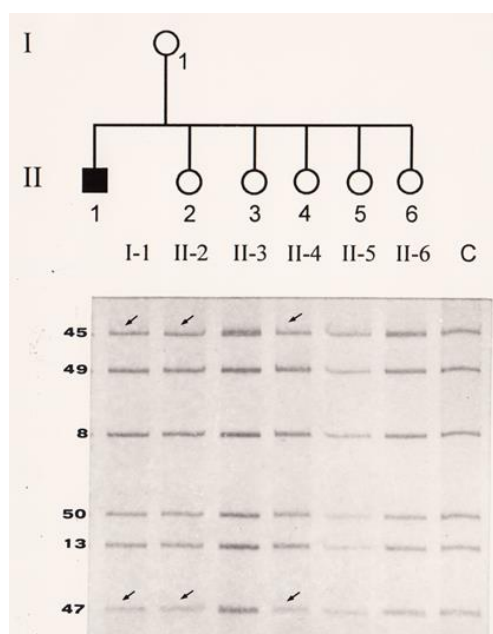
I – носителки на делеция, включваща екзон 48

II – неносителки

III - носителки на делеция, включваща екзон 4

Същата идея за полуколичествена оценка на носителство при рисковите жени от засегнатите ДМД/БМД фамилии беше доразвита по-късно в съвместните ни разработки с Dr. Marta Miorin от екипа на проф. Gian-Antonio Danieli, University of Padua, Italy [Miorin, Todorova et al., 1997]. Методиката се базираше отново на мултиплексен полу-количествен PCR, анализиран в акриламиден гел със сребърно оцветяване, както при скрининга за

делеции при засегнатите момчета. За да може да се използва за полуколичествена оценка на броя копия във всеки амплификационен фрагмент, въведохме някои модификации. Количеството на всички ДНК проби, които се анализират в една серия трябва да е еднакво (100 ng разредена ДНК) и размножаването се провежда при 17 цикъла (експоненциална фаза на амплификация). Идеята беше, че при стартиране с еднаква матрица при всички проби и при провеждане на PCR амплификацията в експоненциална фаза, броят копия които получаваме за всеки фрагмент във всяка проба са количествено сравними и зависят от наличните алели в генотипа на пациента (един алел при наличие на делеция или два алела при нормален резултат) (Фигура 20). При тези рестриктивни условия на изпълнение на PCR дори без помощта на денситометър могат директно да се визуализират разлики в интензивността на получените фрагменти. Сравнението беше извършвано спрямо контролни проби (хоризонтално) и спрямо контролни фрагменти в рамките на всяка проба (вертикално).

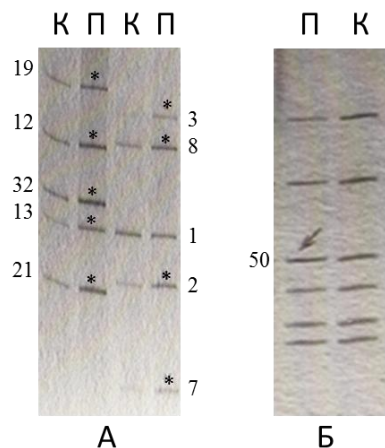


**Фигура 20.** Полуколичествен метод за доказване на хетерозиготно носителство на делеции в рамките на едно семейство. Делетираните екзони 45 и 47 са посочени със стрелки.

### Дупликации в *DMD* гена

Изпълнението на PCR за полуколичествена оценка на брой копия във всеки амплификационен продукт вече беше доказало своите възможности, поради което се породиха идеята да се използва същата методика за търсене на дупликации при засегнатите

момчета. Очакваните резултати бяха един алел за нормален резултат и два алела при наличие на дупликация. Търсенето на дупликации в *DMD* гена винаги е било голямо предизвикателство, поради огромния размер на дуплицираните фрагменти. Възможности в това направление имаха само най-големите световни лаборатории, които имаха специфична апаратура за провеждане на електрофореза в пулсово електрично поле, единствената техника с възможност за детекция на дупликации в *DMD* гена по това време [Den Dunnen et al., 1989]. Разработеният от нас полуколичествен мултиплексен PCR беше приложен при български пациенти, които оставаха с неясен молекулен дефект след прилагане на делеционен скрининг. С помощта на тази методика бяха открити първите две дупликации у нас: dupl 48-50 и dupl 2-32...33 (Фигура 21) [Todorova et al., 1996]. В последствие, тези два молекулни дефекта бяха потвърдени с навлизането на новите модерни MLPA технологии за количествен анализ (виж Таблица 5). Потвърдителните резултати разкриха безпорните качества за времето си на разработената от нас полуколичествена методика по отношение на точност, прецизност и възпроизводимост на резултатите.



**Фигура 21.** Полуколичествен метод за доказване на дупликации. Дуплицираните екзони са представени със звездичка и стрелка.

(А). Дупликация на екзони 2-32; (Б). Дупликация на екзон 50.

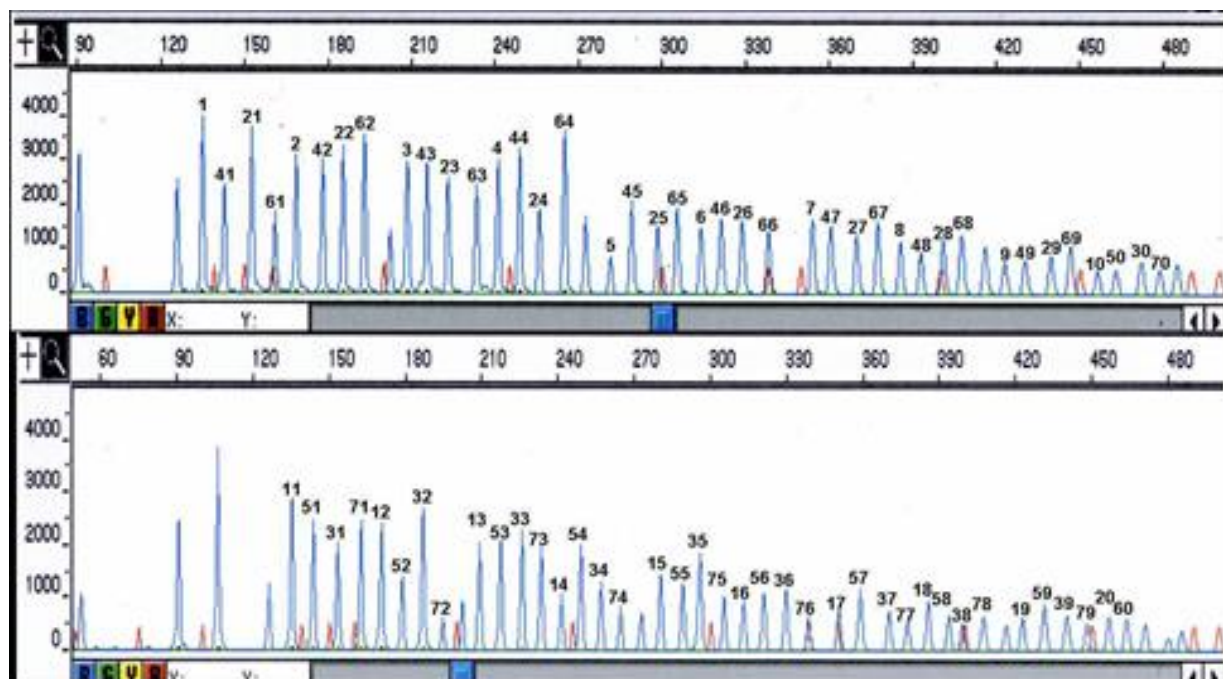
К – контрола; П - пациент

Наличните по онова време диагностични методи за анализ на *DMD* гена имаха някои сериозни недостатъци: не беше възможно да се реши проблемът на семейството, ако индексният пациент е починал; не беше възможно (или беше възможно в редки случаи) да се изследват директно жени за носителство; при липса на делеция диагнозата оставаше под съмнение и др.

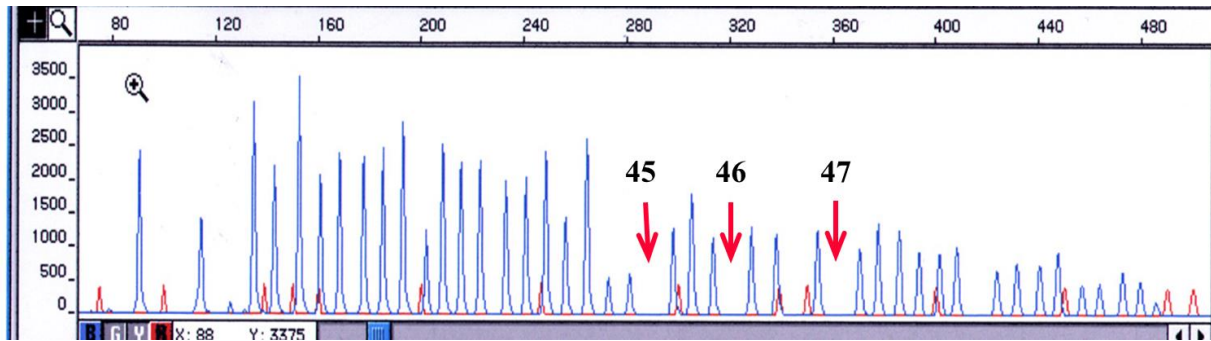
Години по-късно, през 2003-2004 г. в колаборация с екипа на проф. Jurgen Horst, University of Muenster, Germany, започнахме оптимизиране на MLPA анализ за диагностичното му приложение при ДМД/БМД пациенти. С помощта на тази уникална методика огромният *DMD* ген можеше да се покрие изцяло в две мултиплексни реакции по

48 фрагмента, сред които освен 79-те екзона на гена бяха включени и референтни фрагменти. Разделянето на амплификационните продукти се извършва в капилярна електрофореза с флуоресцентна лазерна детекция (Фигура 22). При болните момчета делециите се откриват лесно на базата на загуба на амплификационен продукт за един или няколко екзона (Фигура 23). Дупликациите обаче, се интерпретират по-трудно на базата на количествена оценка на амплификационните продукти с помощта на математически Excel алгоритми или специфични софтуери (Фигура 24). В програма Excel провеждаме тройно изчисление на площта на всеки пик отнесен към: (1) средно аритметична площ на двата съседни пика; (2) средно аритметична площ на двата най-близки контролни пика; (3) средно аритметична площ на всички контролни пикове в реакцията. При съотношение на площите >1.9-2.0 по трите изчисления, резултатът се интерпретира като дупликация (Фигура 24).

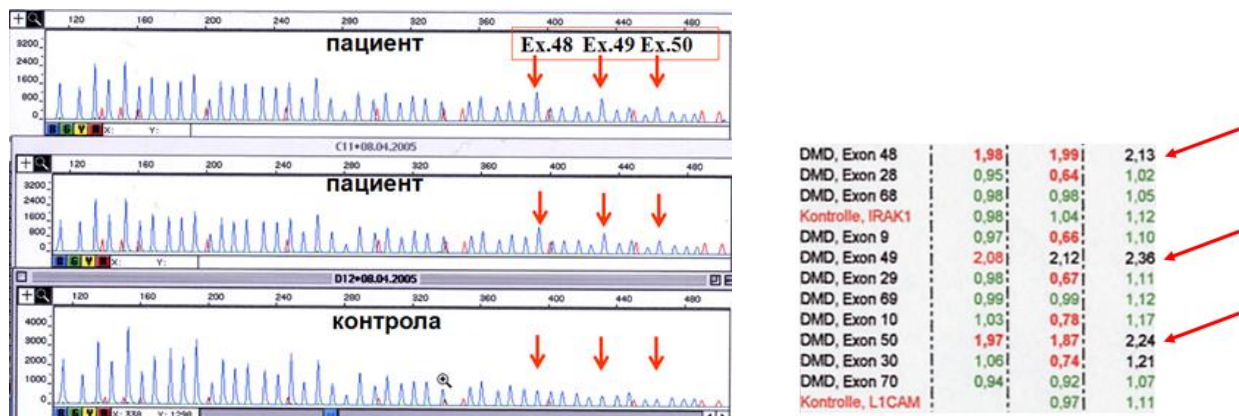
С помощта на този уникален анализ успяхме да покрием пълния спектър от делеции в DMD гена, а откриването на дупликации вече не беше непосилна задача.



**Фигура 22.** Нормален MLPA електрофоретичен профил на двата набора SALSA PO34 и SALSA PO35 за *DMD* гена. Съответните екзони са представени над всеки пик. Ненадписаните пикове са контролни фрагменти. Червени пикове – ROX500 стандарт.



**Фигура 23** MLPA профил при пациент с делеция на екзони 45-47 (ex45ex47del -> с.6439-?\_6912+?del).



**Фигура 24.** MLPA профил при пациент с дупликация на екзони 48-50 (ex48ex50dup -> с.6913-?\_7309+?dup) и математически Excel алгоритъм за интерпретация на резултата.

Към 2015 година съм изследвала за дупликации 58 пациента с ДМД/БМД. Откритите дупликации, ефектът им върху рамката на четене на генетичната информация и разпределението на дупликационните точки на разкъсване по интрони са представени в Таблица 5.

Откритите 8 дупликации (15%=8/52) при български пациенти са два пъти повече от очакваните по литературни данни около 7% [White et al., 2006]. По отношение на readingframe хипотезата на Мопасо и сътр. [1988] в тази група мутации има само едно изключение. Това е една от най-големите дупликации, открити в нашата извадка (Dup 7-39), обхващаща около 1/3 от гена и причиняваща разместване рамката на четене на генетичната информация, но въпреки това тази дупликация е свързана с лека фенотипна изява на заболяването.

**Таблица 5.** Дупликации при български пациенти с ДМД/БМД.

№	Диагноза	Дупликация	Reading frame	5' breakpoint в интрон	3' breakpoint в интрон
1	ДМД	Dup 2-10 с.32-?_1149+?dup	out-of-frame	1	10
2	ДМД	Dup 51 с.7310-?_7542+?dup	out-of-frame	50	51
3	БМД	Dup 13-40 с.1483-?_5739+?dup	in-frame	12	40
4	ДМД	Dup 48-50**** с.6913-?_7309+?dup	out-of-frame	47	50
5	ДМД	Dup 2-33**** с.32-?_4674+?dup	out-of-frame	1	33
6	ДМД	Dup 8-13 с.650-?_1602+?dup	out-of-frame	7	13
7	ДМД	Dup 8-11 с.650-?_1331+?dup	out-of-frame	7	11
8	БМД	Dup 7-39 с.531-?_5586+?dup	out-of-frame	6	39

\*\*\*\* - Доказани и с полуколичествен анализ

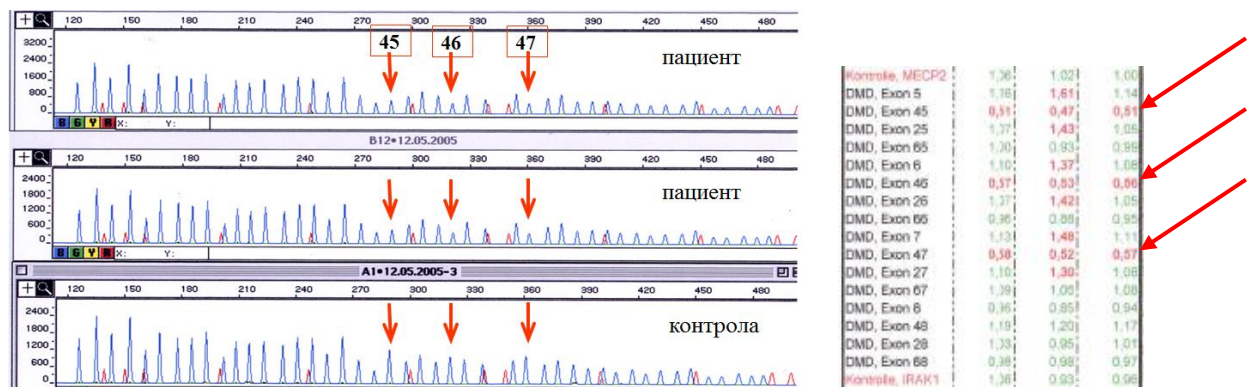
За дупликациите също е характерно специфично разпределение по интрони, като по литературни данни, този тип мутации са концентрирани главно в проксималната част на гена с гореща точка в интрон 7 [Galvagni et al., 1994]. Въпреки малката бройка открити дупликации при български пациенти прави впечатление, че около 67% от дупликационните точки на разкъсване попадат в проксималната част на гена, в съгласие с литературните данни.

Освен за откриване на дупликации, MLPA анализът дава възможност да се изследват и директно жени за носителство на делеции и дупликации, както и семейства с починал индексен пациент. До момента сме изследвали 9 такива семейства и сме открили делеции като молекулна причина за заболяването при 6 от тях (67%).

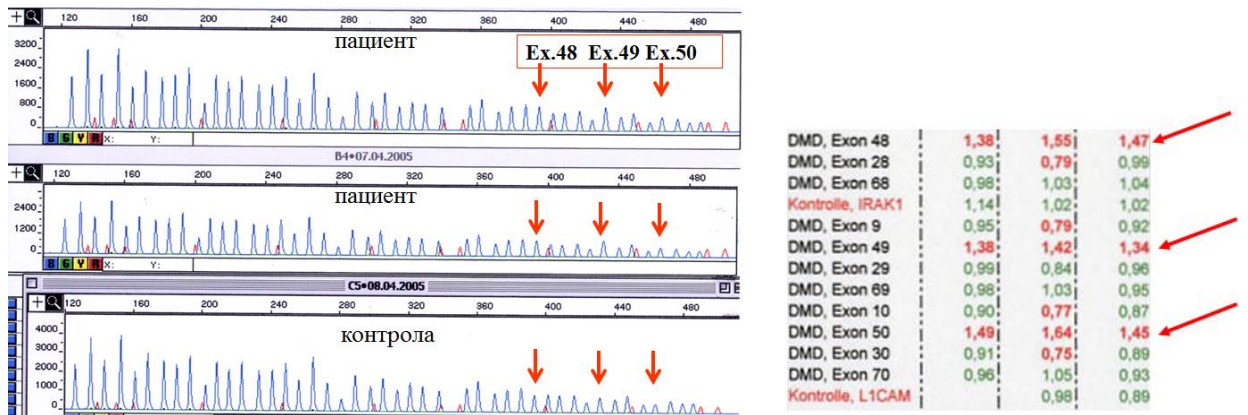
**MLPA анализ за директно изясняване на носителски статус при жени от рискови семейства с доказана делеция или дупликация при индексния пациент**

Носителството на делеция се оценява количествено като намаляване площта на делетираните фрагменти наполовина (Фигура 25), а носителството на дупликации – като

увеличаване площта на дублицираните фрагменти (Фигура 26). Необходима е математическа обработка на резултатите в програма Excel за по-прецизна интерпретация на броя копия в даден генен регион (Фигури 25 и 26). В програма Excel, отново както при теста за дубликации при момчетата, провеждаме тройно изчисление на площта на всеки пик отнесен към: (1) средно аритметична площ на двата съседни пика; (2) средно аритметична площ на двата най-близки контролни пика; (3) средно аритметична площ на всички контролни пикове в реакцията. При съотношение на площите под 0.6 по трите изчисления, резултатът се интерпретира като хетерозиготна делеция, а при съотношение на площите над 1.3 по трите изчисления, резултатът се интерпретира като хетерозиготна дубликация (Фигура 26).



**Фигура 25.** MLPA профил при жена, носителка на делеция на екзони 45-47 (ex45ex47del -> с.6439-?\_6912+?del) и математически Excel алгоритъм за интерпретация на резултата.



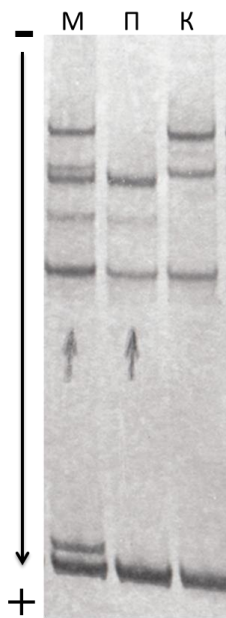
**Фигура 26.** MLPA профил при жена, носителка на дубликация на екзони 48-50 (ex48ex50dup -> с.6913-?\_7309+?dup) и математически Excel алгоритъм за интерпретация на резултата.

Малки делеции, инсерции, дупликации или точкови мутации остават в повечето случаи неоткрити с тази техника. В някои изключително редки случаи се оказва възможно MLPA анализът да е от помощ и при откриване на точкови мутации (виж по-надолу текста). Поради това, при липса само на един екзон от електрофоретичния профил на ДМД/БМД пациент, този екзон се проверява с PCR. При един ДМД пациент, липсващ екзон 46 от MLPA профила беше амплифициран и секвениран в последствие, без да доведе до откриването на нуклеотидна замяна. Това е единственият нерешен случай в световен мащаб, без обяснение за причината водеща до изчезване на сигнала за екзон 46 от MLPA профила на пациента. Детето е осиновено и не беше възможно да се извършат допълнителни изследвания в семейството за изясняване на молекулярния дефект, причинил заболяването и на тази база да се прецени причината за загубата на екзон 46 от MLPA профила.

### **Точкови мутации**

Останалите мутации в *DMD* гена с честота около 25% са nonsense и missense мутации, малки делеции (от един до няколко нуклеотида в рамките на един екзон) и мутации, нарушаващи сплайсинга. Откриването на този вид дефекти беше най-затруднено технологично, поради огромните размери на гена и изследването екзон по екзон чрез радиоактивно секвениране, изглеждаше като да „търсиш игла в копа сено“. В средата на 90-те години на миналия век, когато започнаха да се появяват първите публикации на точкови мутации в *DMD* гена [Lenk et al., 1993; Saad et al., 1994], секвенирането беше трудоемка, радиоактивна и сравнително скъпа методика. Скринингът за точкови мутации при български пациенти започна в колаборация с екипа на проф. Gian-Antonio Danieli, University of Padua, Italy се основаваше на SSCP (single-strand conformation polymorphism) анализ [Todorova and Danieli, 1997]. Този метод се базира на факта, че някои точкови мутации променят конформационната подвижност на едноверижни ДНК фрагменти, което дава възможност за промяна в електрофоретичния профил, при анализиране на пациенти спрямо нормални контроли (Фигура 27). Този тест беше много продължителен във времето (за ген с размерите на *DMD* бяха необходими около 2-3 години за да се скринира напълно при група от около 15 пациента), много трудоемък и с незадоволителна чувствителност (не всички мутации в дадения регион променят конформацията и могат да се открият чрез

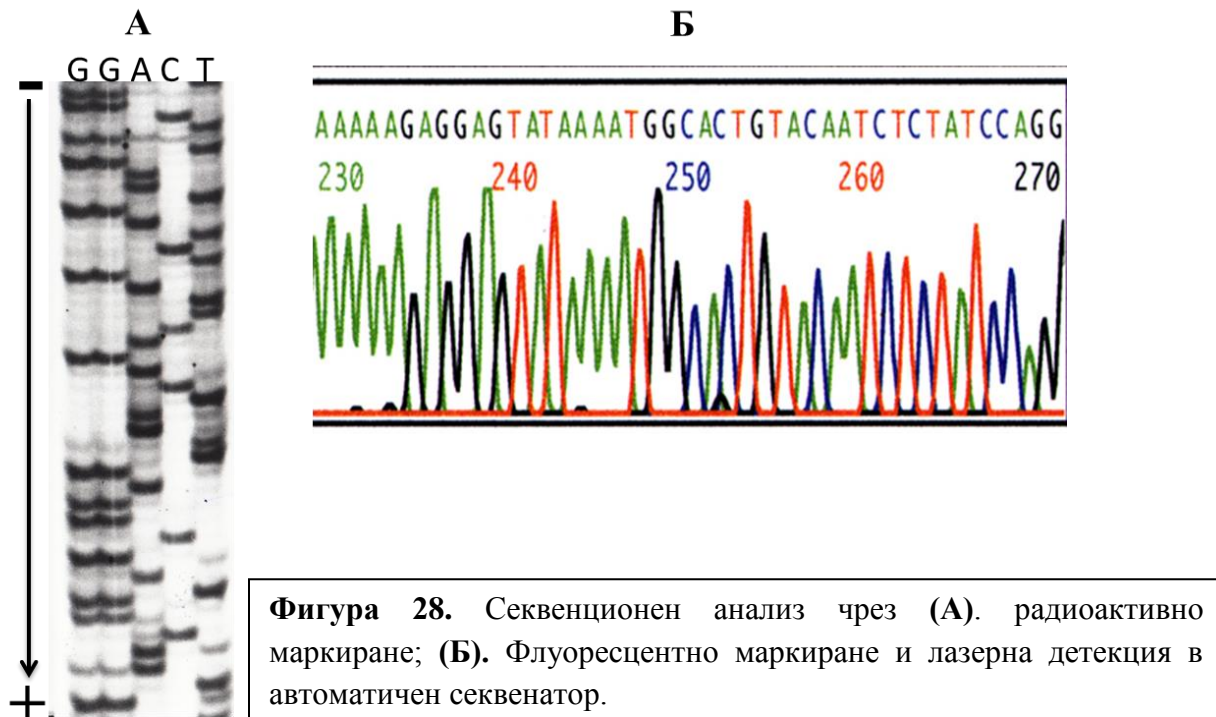
SSCP анализ), поради което не се прилагаше рутинно за диагностични цели. Освен това, при откриването на специфичен електрофоретичен профил се налагаше в последствие секвениране на съответния екзон, за да се установи какво причинява променената конформация. Нерядко ентузиазмът на изследователите беше помрачаван от откриването на полиморфизъм, а не мутация, което за съжаление нямаше как да се знае предварително, освен като се извърви целият път от SSCP анализа до разчитане на секвенционните автордиографии.



**Фигура 27.** SSCP профил на екзон 41 от *DMD* гена. Пациент (П) мутантен профил, сравнен с нормална контрола (К) и майка (М), хетерозиготен носител на мутацията.

По същото време се появи една модификация на секвенционния анализ, на базата на амплификация, а именно *cycle sequencing*. Извършваше се в обикновен PCR апарат и облекчи доста изпълнението на тази техника, която за кратко време се превърна в основна диагностична методика. Разделянето на фрагментите все още се извършваше в денатурираща полиакриламидна гел електрофореза с радиоактивно маркиране (Фигура 28А). Само една крачка ни делеше от бурното развитие на геномната ера и финализирането на Човешкия геномен проект през 2001 г. [Collins et al., 2003], а именно изобретяването на капилярните секвенатори с флуоресцентно маркиране на нуклеотидите и лазерна детекция на сигнала (Фигура 28Б) (Applied Biosystems), което стана достъпно за диагностичните

лаборатории около 2000 г. Ерата на радиоактивните амплификации и секвениране беше изцяло зад гърба ни.



Все пак, изследването на всичките 79 екзона на *DMD* гена е продължителен, трудоемък и все още сравнително скъп анализ. Откритите точкови мутации при български пациенти са представени в Таблица 6.

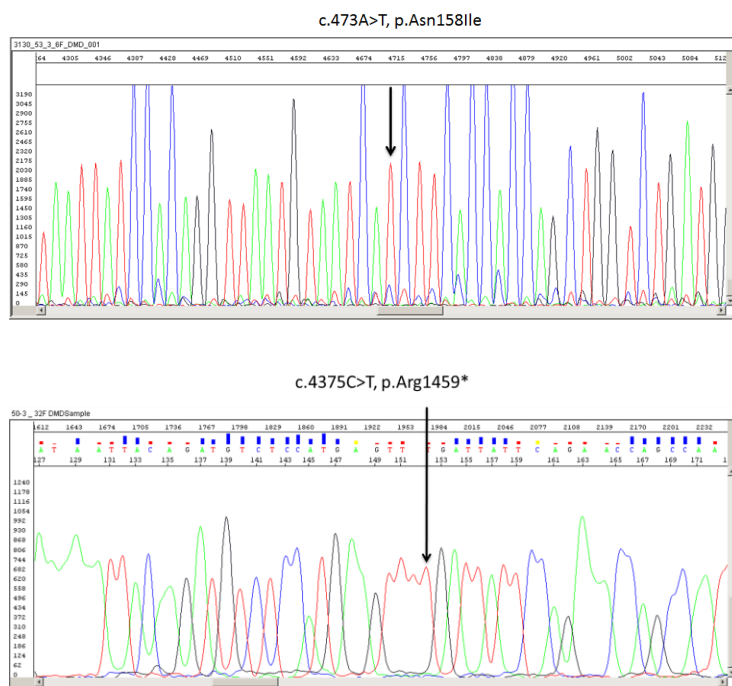
**Таблица 6.** Точкови мутации и малки делеции при български пациенти с ДМД/БМД.

№	Диагноза	Екзон	Нуклеотидна замяна	Аминокиселинна замяна
1	ДМД	44	del16bp	Frameshift
2	ДМД	59	c.8776C>T	p.Gln2926*
3	ДМД	7	c.583C>T	p.Arg195*
4	ДМД	и17	c.2169-2A>G	Сплайсинг мутация
5	ДМД	3	c.178C>T	p.Gln60*
6	ДМД	24	c.3220G>T	p.Glu1074*
7	ДМД	и64	c.9361+1G>A	Сплайсинг мутация

8	ДМД	59	c.8929_8932delAAAG	p.Lys2977Serfs*11
9	ДМД	43	c.6276C>G	p.Tyr2092*
10	ДМД	6	c.473A>T	p.Asn158Ile
11	ДМД	23	c.2991C>G	p.Tyr997*
12	ДМД	41	c.5845delC	p.Gln1949fs*33
13	ДМД	16	c.1975G>T	p.Glu659*
14	ДМД	32	c.4375C>T	p.Arg1459*

\*- стоп кодон; и-интрон

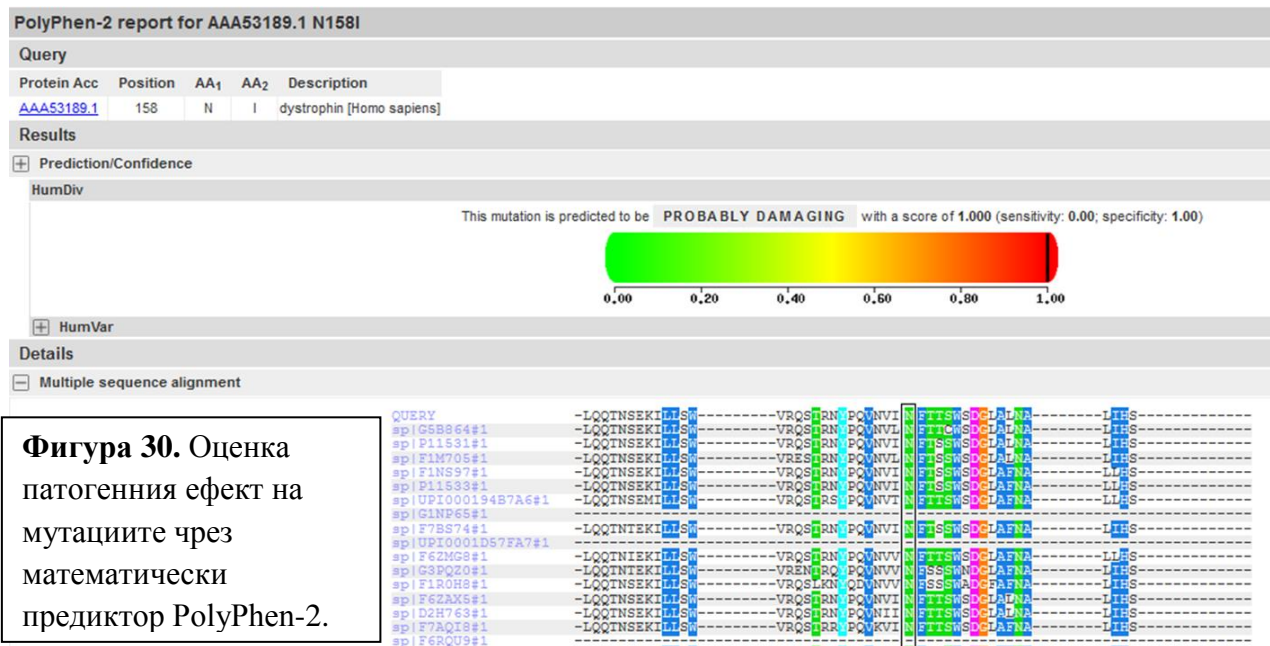
Някои секвенционни профили на мутации в *DMD* гена са показани на Фигура 29.



**Фигура 29.** Секвенционни профили на мутации в *DMD* гена.

Към 2015 г. са открити 11 точкови нуклеотидни замени и 3 малки делеции на един или няколко нуклеотида при български пациенти. Всички точкови мутации са открити при ДМД пациенти. Прави впечатление, че само една от откритите мутации е missenes. Аминокиселинната замяна в екзон 6 p.Asn158Ile беше анализирана с математическите предиктори за оценка патогенния ефект на замяната върху белтъчната структура и/или

функция (PolyPhen2 v.2.2.2). Резултатът е представен на Фигура 30, като мутацията беше оценена като патогенна със скор 1.000.



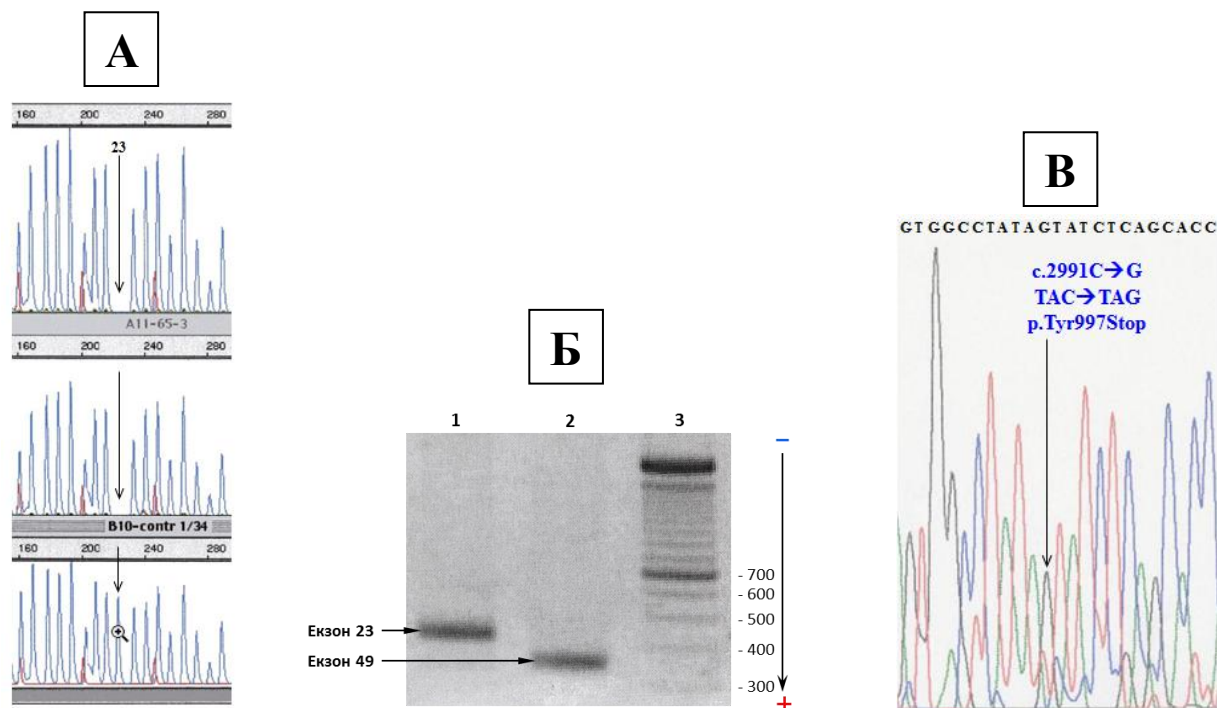
**Фигура 30.** Оценка патогенния ефект на мутациите чрез математически предиктор PolyPhen-2.

Останалите точкови мутации и малки делеции причиняват преждевременно прекратяване на белтъчната синтеза чрез директно генериране на стоп кодон или чрез разместване на рамката на четене на генетичната информация и в последствие генериране на стоп кодон. Две от точковите мутации нарушават сплайсинга.

По отношение на разпределението на точковите мутации по екзони, прави впечатление изключителната разпръснатост на мутациите по цялата дължина на гена с почти равномерно засягане на дисталния и проксималния регион (виж Таблица 6).

Две от точковите мутации при нашите пациенти са открити чрез MLPA посредством изчезване на екзон от електрофоретичния профил, без да се налага цялостно секвениране на *DMD* гена [Todorova et al., 2008; 2009]. В тези случаи мутацията блокира хибридизацията и/или лигирането на специфичните сонди за даден екзон и той изчезва от електрофоретичния профил (Фигура 31А). При липса само на един екзон от електрофоретичния профил на ДМД/БМД пациент, този екзон се проверява с PCR (Фигура 31Б). При наличие на амплификационен продукт, той се секвенира и обикновено се

установява каква е причината за изчезването на фрагмента от MLPA профила, като например точкова мутация (Фигура 31В).

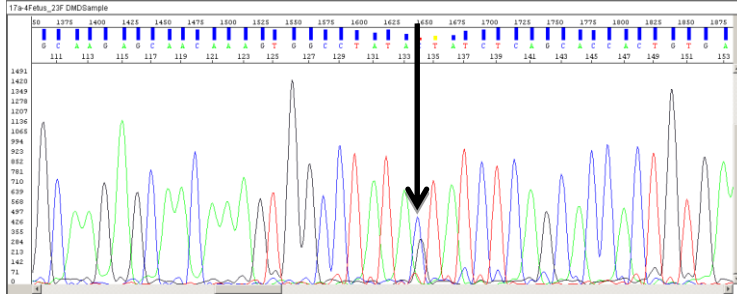


**Фигура 31.** Доказване на точкова мутация в екзон 23 на *DMD* гена чрез загуба на фрагмент в MLPA профила на пациента. **(А).** MLPA профил с липсващ екзон 23; **(Б).** PCR на екзон 23; **(В).** Секвенционен профил и откриване на точкова мутация p.Tyr997\*.

### **Изясняване на носителски статус при жени от рискови семейства с доказана точкова мутация при индексния пациент**

Определянето на носителския статус на жените в засегнатите ДМД/БМД семейства беше изключително трудна задача през годините (виж по-горе). Откриването на променен електрофоретичен профил в хода на SSCP анализа можеше да се използва и за директно доказване или отхвърляне на носителство при жените от семейството на конкретен пациент, който е диагностициран посредством SSCP анализ (виж Фигура 27). При жени хетерозиготни носители на точковата мутация се установява двоен електрофоретичен профил комбинация от нормалния и патологичния (виж Фигура 27). При жени неносители, профилът е идентичен с този при нормални контроли.

Секвенционните технологии по Sanger и NGS дават възможност директно да бъде установена точкова мутация в генома на всяка жена от рискови семейства с ДМД/БМД (Фигура 32).



**Фигура 32.** Секвенционен профил на жена носителка на точкова мутация в *DMD* гена

### Точкови мутации в *DMD* гена и механизми на мутагенеза

В научно отношение, откриването на точкови мутации в *DMD* гена, постави въпроса за причината, която води до възникване на тези мутации. Основно се приемаше предположението, че мутациите възникват в хода на сперматогенезата. Сперматозоидните клетки претърпяват множество деления през жизнения си цикъл и са по-податливи на генериране на мутации, особено в такъв огромен ген като *DMD*. В началото на 90-те години на миналия век се породиха идеята за ролята на околната ДНК секвенция за възникването на мутации [Cooper and Krawczak, 1990; Krawczak and Cooper, 1991]. Ние бяхме провокирани от публикациите относно механизмите на мутагенеза в човешкия геном и приложихме някои от тези идеи за интерпретация на механизмите на възникване на точкови мутации в *DMD* гена [Todorova and Danieli, 1997; Todorova et al., 1999]. Получиха се интересни разработки, в хода на които установихме, че честотата на CpG мутациите в *DMD* гена е по-ниска от докладваната за други гени [Todorova and Danieli, 1997]. Този резултат беше доста изненадващ, като се има предвид, че точковите мутации в *DMD* гена са основно C>T транзиции, водещи до стоп-кодон. Освен това, всички нуклеотидни замени, които засягаха CpG динуклеотиди бяха от типа C>T транзиции и не бяха установени G>A транзиции. Почти всички анализирани точкови мутации в *DMD* гена можеха да бъдат обяснени с повече от един механизъм на мутагенеза, като например наличие на повторени, симетрични последователности или арест секвенция за полимеразата в близост до мутацията. Вероятността за възникване на мутация в дадена позиция на гена се увеличава

при положение, че независими механизми на мутагенеза могат да я провокират точно в тази позиция [Todorova and Danieli, 1997].

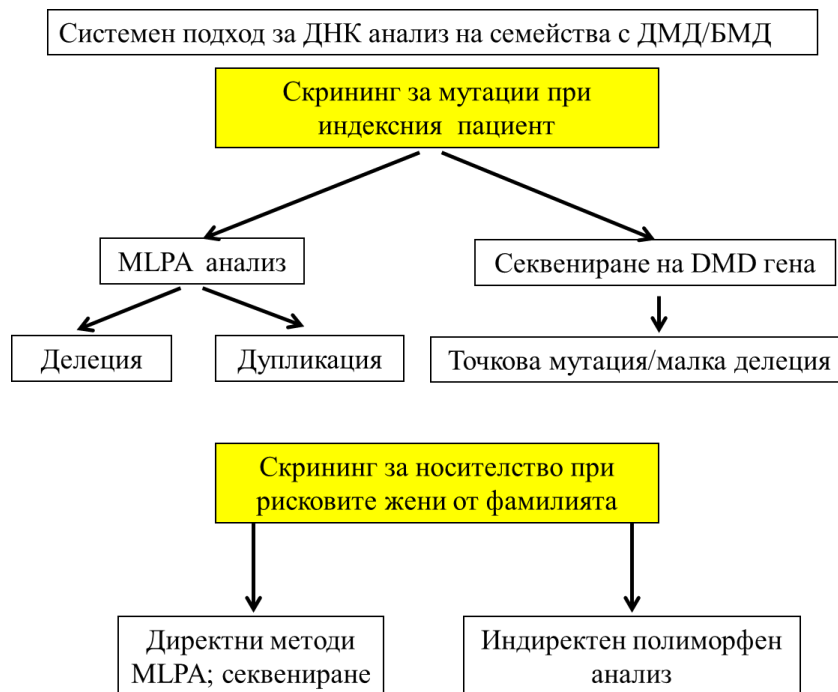
В допълнение, беше установено, че еднонуклеотидни замени възникват по-често (55.3%) в специфични региони, богати на G/A мотиви, докато еднонуклеотидни делеции засягат по-често C/T богати генни сегменти [Todorova et al., 1999]. Бяха изследвани различни конфигурации с участието на директни и обърнати повтори, огледални повтори и образуването на тройно-спирални ДНК фрагменти с оглед да се обясни възникването на мутация в конкретна позиция на гена [Todorova and Danieli, 1997; Todorova et al., 1999].

### **3.1.5. Обобщение на получените резултати и заключителни бележки**

За последните 22 години (от 1993 до 2015 г) беше изяснена молекулната причина за изява на мускулна дистрофия тип Дюшен/Бекер при 75% (196/260) български пациенти, насочени за генетични изследвания с такава диагноза. При сигурна клинична диагноза и провеждане на пълен спектър от изследвания на *DMD* гена при всеки конкретен пациент: скрининг за делеции, скрининг за дупликации и секвениране за точкови мутации диагностичната успеваемост е близка до 100%. Тази успеваемост стана възможна едва през последните 5-6 години. С приложението на MLPA анализ за делеции и дупликации успяваме да изясним и да помогнем на ~67% от семействата с липсващ индексен пациент. На Фигура 33 е представен системен подход за анализ на семейства с ДМД/БМД фенотип.

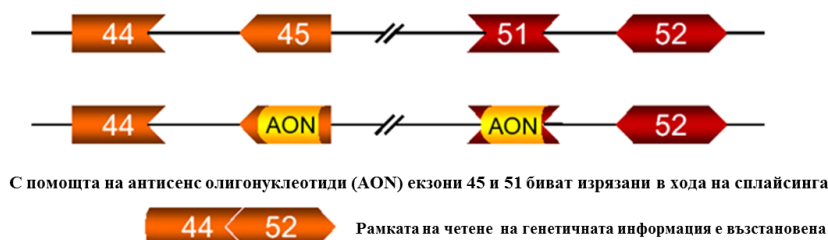
Усилията на учените през последните години бяха посветени на откриването и разработването на ефикасна генна терапия на това тежко, нелечимо, инвалидизиращо заболяване. За съжаление, *DMD* генът и неговият продукт са доста сложни, големи като размери и комплексни като структура и не се поддават на класическите методи за пренос на гени с помощта на вирусни вектори. Оказва се обаче, че някои ДМД пациенти имат малки количества дистрофин позитивни фибри (revertant fibers), които произхождат от възстановяване на рамката на четене на гена, посредством допълнително прескачане на екзони (exon skipping). Това допълнително изрязване на екзони с терапевтична цел беше използвано в научните разработки на специалистите от Leiden University [van Deutekom et al., 2001]. Те успяха да индуцират изрязването на допълнителни екзони с поправяща цел, с помощта на малки синтетични антисенс олигонуклеотиди. Тези малки молекули предизвикват изрязване на допълнителни екзони в хода на сплайсинга и по този начин

възстановяват рамката на четене на дистрофиновия транскрипт (Фигура 34). Поправящият ефект свежда тежката форма ДМД до лека форма БМД. Този вид поправяща терапия е най-същественото постижение на науката в последните години. Успоредно с възможностите за поправка на делеции, бяха инвестирани доста усилия за разработване на вариант за поправка на nonsense точкови мутации на ниво транслация [Hamed, 2006] (Фигура 35). За да бъде приложима генната терапия във всеки един от вариантите, задължително условие е точното познаване на генния дефект, довел до изява на заболяването. Постигането на това условие е именно двигателната сила за развитие на технологиите в геномната ера. По този начин все по-голям процент болни биват генетично охарактеризирани и подготвени за приложение на адекватна генна терапия в бъдеще.

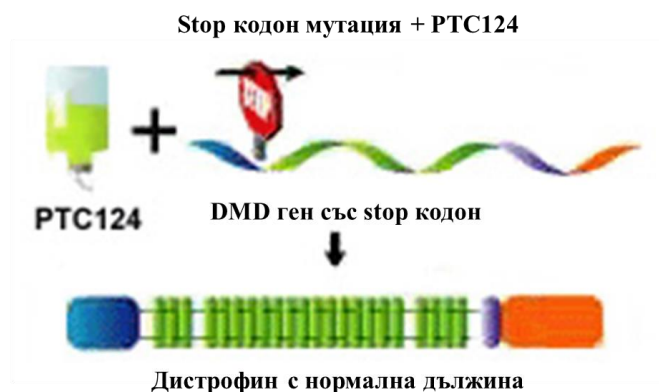


**Фигура 33.** Системен подход за анализ на семейства с ДМД/БМД фенотип.

### Прескачане на два екзона с цел възстановяване рамката на четене



**Фигура 34.** Exon skipping с цел възстановяване рамката на четене на генетичната информация [<http://humgen.nl>].



**Фигура 35.** PTC124 за поправка на стоп-кодон мутации [<http://quest.mda.org>].

Понастоящем, в ерата на геномните технологии и секвенирането от нова генерация (Next Generation Sequencing, NGS), целият *DMD* ген заедно с още поне 30 мускулно специфични гена (diagnostic neuromuscular panel, Illumina) могат да бъдат анализирани в рамките на 10 работни дни. Избрах мускулната дистрофия Duchenne/Becker (ДМД/БМД) като модел за проследяване технологичната революция в молекулярно-генетичната диагностика, защото *DMD* генът е уникален по своите размери и комплексност на мутации и представляваше сериозно предизвикателство в технологично отношение през всичките тези години, за да бъде анализиран изцяло. Днес все още това е един труден за анализиране ген като се налага да се използват различни технологии (MLPA и секвениране) за неговото пълно изследване, а за изясняване на носителски статус в засегнатите семейства все още се прилага комбинация от директен и индиректен подход.

### **3.2. МУСКУЛНА ДИСТРОФИЯ ПОЯС-КРАЙНИК ТИП 2А, ПКМД2А (LIMB-GIRDLE MUSCULAR DYSTROPHY TYPE 2A, LGMD2A)**

Друго невромускулно заболяване, което изкам да разгледам като модел на еволюиране на нашите познания в областта на неврогенетиката и генетиката като цяло е мускулната дистрофия пояс-крайник тип 2А или калпаинопатия (Limb-girdle muscular dystrophy type 2A, LGMD2A, calpainopathy, OMIM#253600). LGMD2A е наследствено автозомно-рецесивно заболяване, при което дефектният белтък е мускулно-специфичен ензим, наречен калпаин 3. Калпаинопатията се счита за най-честата от всички LGMD форми [Passos-Bueno et al., 1999; Richard et al., 1999; Zatz et al., 2000; Bushby and Beckmann, 2003]. Епидемиологичните данни сочат, че LGMD2A съставлява от 10% до 50% от автозомно рецесивните пояс-крайник форми и близо 90% от мускулните дистрофии при повечето изолирани инбредни популации [Fardeau et al., 1996a; Dincer et al., 1997; Urtasun et al., 1998; Fanin et al., 2003; Saenz et al., 2005].

#### **3.2.1. Клинично описание и лабораторни изследвания**

Заболяването се характеризира с широка вариабилност по отношение на тежестта на клиничната изява. Срещат се както тежки форми с дебют през първата декада от живота и бърза прогресия, така и леки форми с късно начало и по-бавна прогресия [Bushby 1997; Bushby 1999].

**Първите симптоми** се изразяват най-често в ходене на пръсти, затруднения при тичане и изкачване на стълби, при изправяне от клекнало и легнало положение, чести падания [Fardeau et al., 1996a, b]. Заболяването има прогресиращ характер и често води до инвалидизация. Обикновено, пациентите престават да се движат самостоятелно между 20 и 50-годишна възраст, но са описани и случаи, при които на 60 годишна възраст пациентът все още може да се движи самостоятелно. В повечето случаи ранното начало на болестта е свързано с по-бърза прогресия и по-ранна инвалидизация, но има и случаи с късно начало, протичащи с бърза прогресия и инвалидизация до третата декада [Richard et al., 1999; Zatz et al., 2003; Fanin et al., 2004].

Прогнозата при LGMD2A е неблагоприятна, продължителността на живота варира в широки граници, но в болшинството от случаите леталният изход настъпва на средна

възраст. Някои автори докладват по-бърза прогресия при мъже, отколкото при жени [de Paula et al., 2002; Piluso et al., 2005]. Забелязва се голяма интер- и интрафамилна вариабилност във фенотипната изява [Fardeau et al., 1996a, b; Richard et al., 1999; Zatz et al., 2000; Chae et al., 2001; de Paula et al., 2002; Zatz et al., 2003; Fanin et al., 2004].

Мускулната слабост се изразява в симетрична и селективна атрофия на проксималните мускули на крайниците, раменния и тазовия пояс. Хипертрофия на подбедрицата се наблюдава често при някои пациенти [Passos-Bueno et al., 1999], докато при други е рядко явление [Dincer et al., 2000]. В някои подробни клинични проучвания се докладват като най-засегнати от болестта бедрените адуктори и *gluteus maximus* [Fardeau et al., 1996a]. Изявява се умерена хиперлордоза, особено когато пациентите престанат да се движат самостоятелно. На този етап се появяват и контрактури на лакътните, бедрените и ахилесовите флексори. Усложненията се появяват първоначално в тазовия пояс и по-рядко в раменния. Умственото развитие е нормално и не се наблюдават лицеви изменения. Има индикации за дихателни нарушения, но не и за сърдечни [Fardeau et al., 1996a].

Като **биохимичен показател** за дистрофичен процес се използва активността на ензима креатинфосфокиназа (КК) в серум. При LGMD2A стойностите на КК в серум са умерено повишени до силно повишени особено в активна фаза на болестта [Bushby, 1995; Bushby, 1999]. Докладвани са и случаи, при които серумните нива на КК са в норма [Starling et al., 2003]. При това заболяване, за разлика от дистрофинопатиите, нормалните стойности на КК при наличие на миогенна увреда не са достатъчни, за да се изключи калпаинопатия като вероятна диагноза.

**Електромиографското изследване** показва миопатни промени, като отклоненията са налични още в пресимптоматичния стадий.

**Хистологичният анализ** на мускулна биопсия при калпаинопатия показва първичен дистрофичен процес, без специфични структурни промени. Наблюдават се некротични и регенериращи мускулни влакна и увеличение на ендомиозиалния колаген. С напредване на дистрофичния процес се наблюдават значителни изменения в диаметъра на мускулната фибрила, както и поява на центрирани ядра.

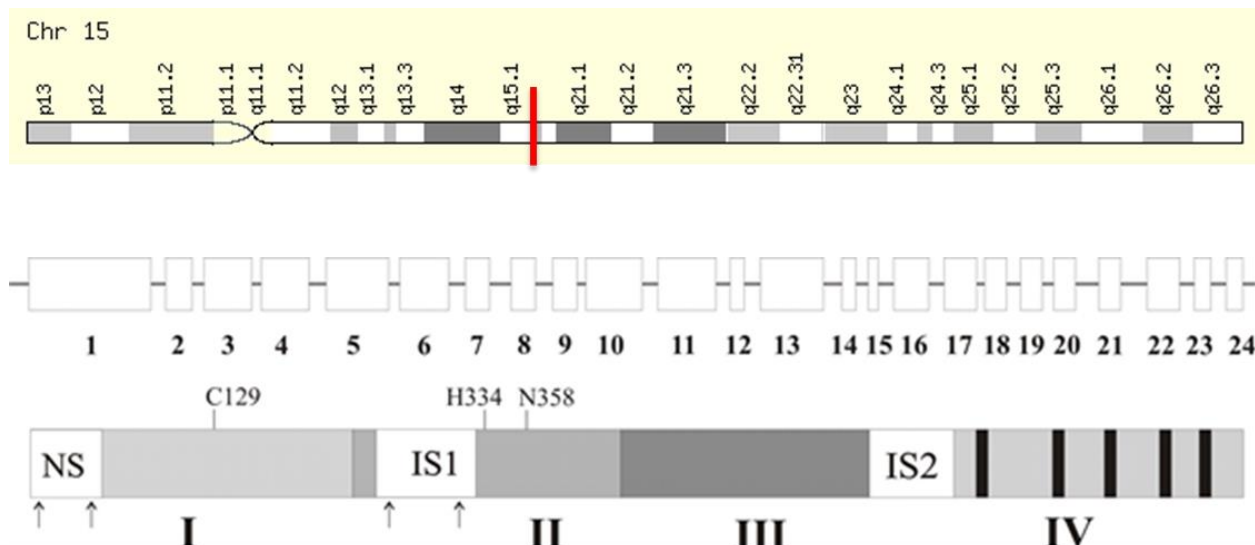
**Имунохистохимичният анализ** на мускулна биопсия показва негативен или патологично променен сигнал за калпаин 3, но в някои случаи е възможно да няма дефицит на калпаин 3 [Beckmann and Fardeau, 1998; Fanin et al., 2003, 2004]. При някои пациенти с

missens мутации може да се открие нормален калпаин 3, което предполага, че някои молекулни дефекти могат да засегнат функцията на белтъка без да засягат неговата синтеза в мускулната клетка [de Paula et al., 2002]. Не се наблюдава корелация между количеството на калпаин 3 и тежестта на изявения фенотип. Например, при пациенти с много ниски нива на експресия на калпаин 3 или липса на експресия на калпаин 3 клиниката варира от лека до тежка [Anderson et al., 1998; Vainzof et al., 2000]. Почти всички пациенти, обаче, с нормални калпаин-3 нива имат късно начало на заболяването.

Поради относителната нестабилност на калпаин 3 в мускулите, **ИМУНОБЛОТИНГЪТ** на белтъка не е достатъчно специфичен и чувствителен тест, което може да доведе до затруднения в интерпретацията на резултатите, особено когато профилът е близък до нормата [Anderson et al., 1998].

### **3.2.2. Молекулни основи**

Калпаинопатията се дължи на мутации в **гена CAPN3**, отговорен за синтеза на ензима калпаин 3. Този ген се намира на 15-та хромозома 15q15.1-15.3 [Beckmann et al., 1991], покрива 52.8 kb геномна ДНК и е изграден от 24 екзона (Фигура 36). Интронните последователности между екзоните варират по големина, като почти половината от генната секвенция се заема от интрон 1 (24.3 kb). Генът се експресира главно в скелетната мускулатура. Получава се транскрипт с големина 3.5 kb, който се транслира в белтъчен продукт 94 kDa.



**Фигура 36.** Локализация на гена *CAPN3* на 15-та хромозома 15q15.1-15.3. Схема на гена *CAPN3* и белтъка калпаин 3 [http://www.genecards.org]. С бели правоъгълници номерирани от 1 до 24 са представени екзоните на гена; с римски цифри (I-IV) са показани четирите домена на белтъка; NS, IS1, IS2 са трите уникални мускулно-специфични последователности; с черни правоъгълници са представени петте калций-свързващи места в домен IV; със стрелки са отбелязани автолитичните места на срязване; трите аминокиселинни остатъка формиращи активния център на белтъка (C129, H334 и N358) също са представени на фигурата.

LGMD2A е първият пример на мускулна дистрофия, която се дължи на дефектен ензим, а не структурен белтък. Калпаините представляват голяма група калций-зависими неутрални протеази. Те участват в протеолитичните преобразувания на белтъци, ангажирани в процесите на цитоскелетна реорганизация, сигнална трансдукция, регулация на клетъчния цикъл, клетъчна диференциация, апоптоза и некроза, ембрионално развитие и др. [Wang, 2000; Reverter et al., 2001; Huang and Wang, 2001].

**Калпаин 3** (*CAPN3*; p94; OMIM\*114240) е единственият описан мускулно-специфичен член на калпаиновото семейство [Sorimachi et al., 1993; 1998]. До момента функциите, физиологичните субстрати на калпаин 3 и неговата регулация не са напълно изяснени и поради това е трудно на молекулярно ниво да се установи как дефицитът на този протеолитичен ензим води до дистрофичен процес и изява на болестен фенотип.

Калпаин 3 е изграден от 821 аминокиселинни остатъка [Sorimachi et al., 1998]. Тези аминокиселинни остатъка са организирани в 4 домена (виж Фигура 36). За разлика от

останалите калпаини, калпаин 3 съдържа 3 уникални последователности, означени като NS, IS1 и IS2 [Sorimachi et al., 1998].

Домен I заема аминокрая на белтъка и е изграден от 234 аминокиселинни остатъка [Jia et al., 2001]. В него се съдържа последователността NS, която е богата на пролин и покрива първите 61 аминокиселинни остатъка от домена [Richard et al., 1995]. В NS са разположени автолитични места на срязване на белтъка [Diaz et al., 2004].

Домен II е изграден от 193 аминокиселинни остатъка и изпълнява протеолитични функции [Jia et al., 2001]. Активният център на ензима се формира от Cys129, разположен в домен I и His334, Asn358, локализирани в домен II. В този домен се намира уникалната последователност IS1, която покрива екзон 6 на *CAPN3* гена и е изградена от 62 аминокиселинни остатъка [Richard et al., 1995]. В IS1 са разположени автолитични места на срязване на белтъка [Diaz et al., 2004].

Домени I и II съдържат по едно място за свързване с калциеви йони, чрез които се осъществява правилното пространствено ориентиране на Cys129-His334-Asn358, за да сформират активния център на калпаина [Moldoveanu et al., 2002; 2004].

Домен III е изграден от 194 аминокиселинни остатъка [Jia et al., 2001]. Краят на домен III и началото на домен IV се заемат от уникалната последователност IS2, която съдържа 75 аминокиселинни остатъка и е богата на лизин [Richard et al., 1995]. IS2 съдържа последователността PVKKKKTKP, която е много подобна на ядрен транслокационен сигнал, както и място за свързване с титин [Sorimachi et al., 1990; 1995].

Домен IV е изграден от последните 197 аминокиселинни остатъка [Jia et al., 2001]. Той е калций-зависим домен и съдържа 5 места за свързване с  $Ca^{2+}$ .

Функциите на домени I и III са неясни. Предполага се, че трите уникални региона са отговорни за мускулно-специфичната функция на калпаин 3 [Sorimachi et al., 1996; Ono et al., 1998a, b].

В скелетната мускулатура са описани различни изоформи на калпаин 3, които се образуват в резултат на алтернативен сплайсинг и при тях липсват част или цялата IS1 и/или IS2 последователности. Изоформата с алтернативно изрязан екзон 6 губи автолитичната, но не и ензимната си активност, докато изоформата с алтернативно изрязан екзон 16 губи ензимната си активност и се свързва по-здраво с титин [Herasse et al., 1999].

Уникалните последователности NS, IS1 и IS2 вероятно имат независими функции и различното им комбиниране при алтернативния сплайсинг придава специфични характеристики на отделните изоформи [Ono et al., 2004].

Създадени са множество молекулни модели на калпаин 3, които доказват, че фенотипът на LGMD2A е резултат от загубата или намалена протеолитична активност на ензима [Ono et al., 1998b; Jia et al., 2001]. При някои от изследваните мутантни молекулни модели автолитичната функция и/или титин-свързващите възможности не са засегнати, което показва, че загубата на тези свойства на калпаин 3 не са водещи за изявата на болестния фенотип. Някои проучвания са в подкрепа на хипотезата, че LGMD2A е резултат от загуба на субстрат – протеолизната функция на калпаин 3, а не от неговата хиперактивация или дефект в структурата му [Richard et al., 2000; Tagawa et al., 2000]. Тези изследвания доказват нов молекулен механизъм за възникване на мускулна дистрофия и изява на болестен фенотип, а именно загубата на протеолитичната функция на калпаин 3.

**Мутации:** До момента в *CAPN3* гена са описани огромен брой алелни варианти (паталогични, непаталогични и неклассифицирани варианти) [Piluso et al., 2005; www.dmd.nl]. Повечето паталогични мутации представляват еднуклеотидни замени ~66% [www.dmd.nl], а останалите дефекти са от различен характер (малки делеции, инсерции, indels, водещи до изместване на рамката на четене и преждевременно генериране на стоп-кодон, както и мутации, нарушаващи сплайсинга [Richard et al., 1999; www.dmd.nl]. Описани са единични случаи на дефекти, засягащи по-обширна част от гена (големи делеции) [Richard et al., 1999; Joncourt et al., 2003].

Мутациите в калпаин 3 гена са разпространени по цялата му дължина, което затруднява бързата диагностика на калпаинопатията на молекулярно-генетично ниво. Някои проучвания посочват определени екзони като горещи мутационни точки за дадена популация. Например в 6 екзона (екзони 1, 2, 4, 5, 11 и 22) са съсредоточени 80% от мутациите при бразилски пациенти [de Paula et al., 2002], а в 7 екзона (екзони 1, 4, 5, 8, 10, 11 и 21) са съсредоточени 87% от мутациите при италиански пациенти [Fanin et al., 2004]. Най-рядко засегнатите екзони при пациенти от различни страни са 9, 18, 23 и 24, а в екзон 12 до сега не са откривани мутации [www.dmd.nl].

Болшинството от докладваните мутации са частни, макар че има и широко разпространени мутации, срещащи се при пациенти от различни страни, като например

мутацията с.550delA [Dincer et al., 1997; Richard et al., 1999; Pogoda et al., 2000; Fanin et al., 2004]. Други мутации са чести при отделни инбредни популации, поради т.нар. ефект на родоначалника [Urtasun et al., 1998; Richard et al., 1999].

В сравнително голям процент от случаите с калпаинопатия – 13% [Richard et al., 1999] и 22% [Saenz et al., 2005], анализът на цялата кодираща секвенция на гена, интрон/екзонните граници, промотора и поли-А участъка, води до откриване само на един генен дефект, а втората мутация остава неизвестна.

### **3.2.3. Генотип-фенотипни корелации**

Калпаинопатията се оказва, че е една от най-трудните за диагностициране форми LGMD2. Това се дължи на голямата вариабилност във фенотипната изява, наличието на голям брой молекулни дефекти, разпръснати по цялата дължина на гена и липсата на често срещан или преобладаващ дефект, както и на недостатъчната чувствителност и специфичност на методите за анализ на белтъка калпаин 3. Липсва ясна генотип-фенотипна корелация.

Поради сходната клинична симптоматика и параклинични показатели калпаинопатията може да се обърка с други невромускулни заболявания, като мускулна дистрофия тип Бекер, изявено носителство при мускулна дистрофия тип Дюшен, спинална мускулна атрофия, хроничен полимиозит, различни скапуло-перонеални синдроми, метаболитни миопатии и др. [van der Kooi et al., 1996a; Bushby, 1997; Bushby, 1999; Starling et al., 2003].

### **3.2.4. Собствени резултати**

Първата диагноза LGMD2A при български пациент на молекулно ниво поставих през 2002 г. в колаборация с групата на prof. Clemens Mueller-Reible, University of Wuerzburg, Germany. Тогава имах за задача за разработя и оптимизирам за рутинно изпълнение молекулярно-генетичната диагностика на *CAPN3* гена при немски пациенти, които бяха изследвани на имунохистохимично ниво и показваха патологични отклонения в нивата на белтъка калпаин 3 [Todorova et al., 2005]. Молекулярно-генетичният анализ на

калпаин 3 гена вървеше бързо и лесно чрез секвениране на *CAPN3* гена на автоматичен секвенатор. Почти 100% от имунохистохимично заподозряните пациенти бяха доказани на молекулно ниво. По това време, разполагах с ДНК проби от български пациенти с неясна клинична диагноза, най-общо казано „мускулна дистрофия неопределен тип“. Анализирах *CAPN3* гена при тази група пациенти и какво беше моето учудване, когато една значителна част от тях се оказаха с калпаинопатия. Така беше поставено началото на молекулярно-генетичната диагностика на LGMD2A у нас.

В последствие благодарение на колаборативните усилия на генетици и невролози като Проф. И. Търнев и Доц. В. Гергелчева, Катедра по Неврология, Александровска болница, София стана възможно да се прецизират характерните клинични симптоми на LGMD2A, позовавайки се на генетично потвърдените случаи. Бяха проведени редица колегиуми и семинари пред невролози от страната за популяризиране и разпознаване на този тип мускулна дистрофия.

За набиране на група пациенти с прецизно поставена клинична диагноза калпаинопатия (до колкото това е възможно на базата на клиничната находка) беше проведена усилена теренна работа на екипа от невролози. Освен това бяха подбрани и семейства от генетичния регистър на Лаборатория по Молекулярна Патология (понастоящем Национална Генетична Лаборатория, СБАЛАГ „Майчин Дом“). Тези семейства клинично и по тип на унаследяване отговаряха на критериите за калпаинопатия и проведените до момента генетични изследвания не бяха довели до изясняване на генетичната причина за заболяването. Особено внимание беше обърнато на пациентите с първоначална диагноза мускулна дистрофия тип Дюшен/Бекер и спинална мускулна атрофия, но с неясен генетичен дефект, поради факта че тези мускулни заболявания клинично наподобяват мускулна дистрофия пояс-крайник тип 2A.

Бяха изследвани 151 неродствени семейства с предполагаема клинична диагноза пояс крайник. Клиничната диагноза беше потвърдена на молекулно ниво при 24 пациента (22 неродствени български семейства). На базата на генетично верифицираните случаи (~15%) беше обобщена клиничната симптоматика на българските пациенти с калпаинопатия [Георгиева, 2006 докторска дисертация; Todorova et al., 2007]. Началото на заболяването в нашата група пациенти варира от 1 до 28 годишна възраст (средна възраст 14.5 години). Първите симптоми почти във всички случаи са свързани с проблеми и затруднения при изкачване на стълби, тичане и изправяне от клекнало положение. Бързата уморемост и чести падания са едни от най-често описваните първи симптоми.

Креатинфосфокиназата показва драстично увеличени стойности при всички пациенти, особено в началните етапи от развитие на заболяването. Този показател, обаче не може да се използва като надежден диагностичен критерий, тъй като такива отклонения в ензимните стойности се наблюдават при повечето мускулни дистрофии. Сред останалите клинични показатели най-специфична находка за конкретната диагноза изглеждат ясно изразената проксимална мускулна слабост и слабост в горните крайници и раменния пояс.

### Точкови мутации в *CAPN3* гена

Точкови мутации (главно missense и една nonsense) заедно с делеции на няколко екзона и малки делеции на един или няколко нуклеотида в *CAPN3* гена представляват най-честата молекулярна причина за изява на калпаинопатия. Резултатите са представени в Таблица 7.

**Таблица 7.** Мутации в калпаин 3 гена при български пациенти с LGMD2A.

№	Първоначална диагноза	Алел 1		Алел 2	
		Нуклеотидна позиция	Аминокиселинен ефект	Нуклеотидна позиция	Аминокиселинен ефект
1.	ПМД	c.550delA	p.Thr184Argfs*36	c.550delA	p.Thr184Argfs*36
2.	LGMD	c.550delA	p.Thr184Argfs*36	c.550delA	p.Thr184Argfs*36
3.	LGMD2A	c.550delA	p.Thr184Argfs*36	c.550delA	p.Thr184Argfs*36
4.	LGMD	c.550delA	p.Thr184Argfs*36	c.550delA	p.Thr184Argfs*36
5.	БМД	c.550delA	p.Thr184Argfs*36	c.550delA	p.Thr184Argfs*36
6.	БМД	c.550delA	p.Thr184Argfs*36	c.550delA	p.Thr184Argfs*36
7 А.	LGMD2A	c.550delA	p.Thr184Argfs*36	c.550delA	p.Thr184Argfs*36
7 Б.	LGMD2A	c.550delA	p.Thr184Argfs*36	c.550delA	p.Thr184Argfs*36
8.	LGMD2A	c.550delA	p.Thr184Argfs*36	c.550delA	p.Thr184Argfs*36
9.	БМД	c.550delA	p.Thr184Argfs*36	Del exons 2-8 c.310-?_c.1115+?del	p.Glu104_Arg372delfs*11
10.	СМА III	c.550delA	p.Thr184Argfs*36	Del exons 2-8 c.310-?_c.1115+?del	p.Glu104_Arg372delfs*11
11.	СМА III	c.550delA	p.Thr184Argfs*36	Неизвестен	---
12.	ДМД	c.550delA	p.Thr184Argfs*36	Неизвестен	---
13.	LGMD2A	c.550delA	p.Thr184Argfs*36	c.967G>T	p.Glu323*
14.	LGMD	c.550delA	p.Thr184Argfs*36	c.967G>T	p.Glu323*
15.	БМД	c.146G>A	p.Arg49His	c.967G>T	p.Glu323*
16 А.	LGMD	c.1811-1812delTC	p.Phe604Cysfs*27	c.1811-1812delTC	p.Phe604Cysfs*27
16 Б.	LGMD	c.1811-1812delTC	p.Phe604Cysfs*27	c.1811-1812delTC	p.Phe604Cysfs*27
17.	LGMD	c.2257G>A	p.Asp753Asn	Неизвестен	---
18.	LGMD (васкулит)	c.998G>A	p.Gly333Asp	Неизвестен	---
19.	LGMD2A	c.505C>G	p.Arg169Gly	Неизвестен	---
20.	LGMD2A	c.352A>G	p.Arg118Gly	c.1981_1984delATAG	p.Ile661Glnfs*20
21.	LGMD2A	c.598_612del	p.Phe200_Leu204del	Неизвестен	---
22.	LGMD2A	c.1342C>T	p.Arg448Cys	c.1342C>T	p.Arg448Cys

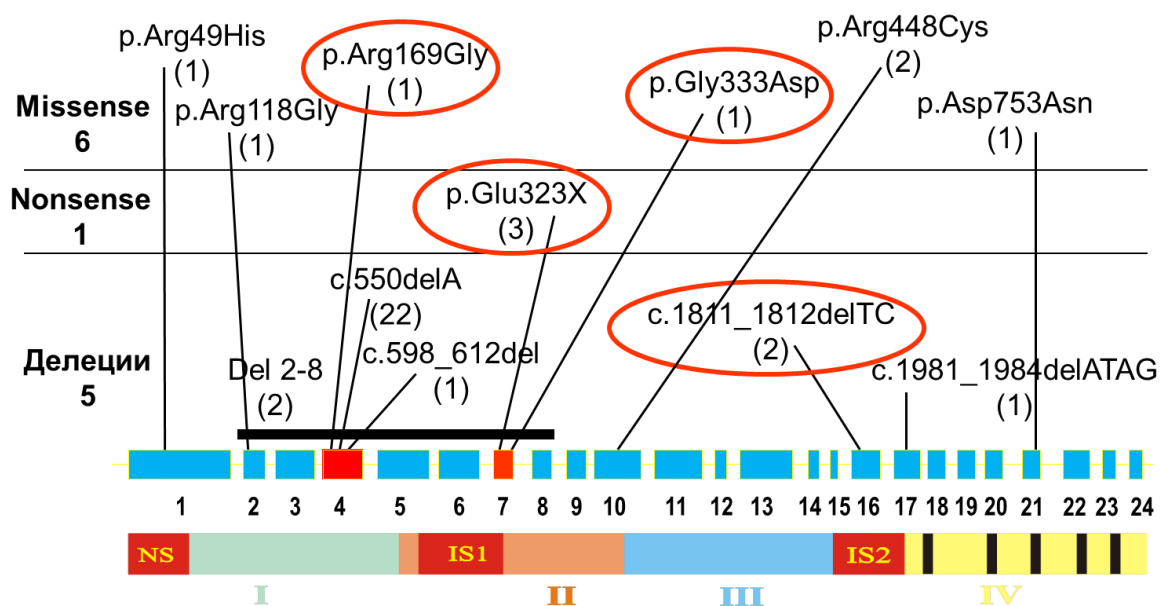
7 А и Б – две болни сестри, 16 А и Б – болни брат и сестра (от близкородствен брак)

ПМД – прогресивна мускулна дистрофия; БМД – Бекер мускулна дистрофия; ДМД – Дюшен мускулна дистрофия

LGMD – Limb-girdle muscular dystrophy; СМА III – Спинална мускулна атрофия тип III

Мутациите, маркирани в червено са открити първоначално при български пациенти; някои от тях в следствие са докладвани и от други автори.

В нашата извадка бяха открити 4 мутации, които не бяха съобщавани до тогава от други автори (виж Таблица 7); в следствие някои от тях бяха намерени и при пациенти от други популации. Локализацията на мутациите по дължината на гена (екзоните, в които попадат) и границите на белтъчните домени са представени на Фигура 37.

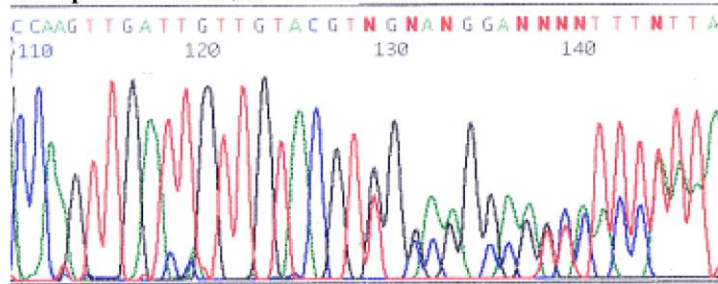


**Фигура 37.** Мутации в *CAPN3* гена при български LGMD2A пациенти. Екзони 4 и 7 са маркирани в червено, там попадат 76% от откритите мутации при български пациенти (26/34). Заградените мутации са открити за пръв път при български пациенти. Броят пациенти, които носят една и съща мутация е представен в скоби.

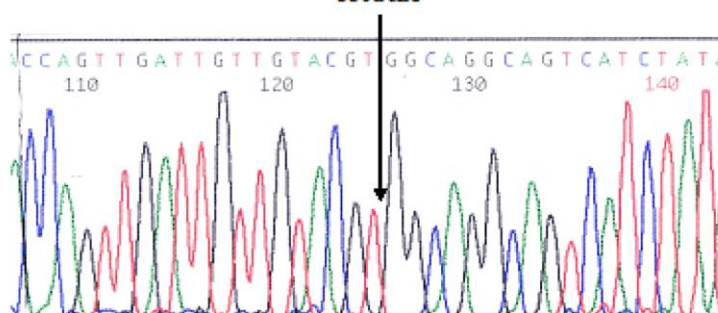
Мутацията c.550delA (Фигура 38) беше открита при 14 неродствени пациента, като 8 от тях са хомозиготни по тази мутация, а останалите 6 са двойни хетерозиготи. Това означава, че този дефект (в хомо- или хетерозиготно състояние) причинява заболяването при 64% (14/22) от българските пациенти с генетично доказана диагноза LGMD2A и представлява най-честия дефект причиняващ калпаинопатия в България.

Тези резултати потвърдиха предположението ни за общ произход на мутацията в Източна Европа [Dincer et al., 1997, Pogoda et al., 2000; Georgieva/Todorova et al., 2005]. Тази мутация в Западна Европа и по-специално в Германия, беше рядка находка и почти не се срещаше в хомозиготно състояние [Todorova et al., 2005].

### Хетерозиготен пациент - frameshift



55delA

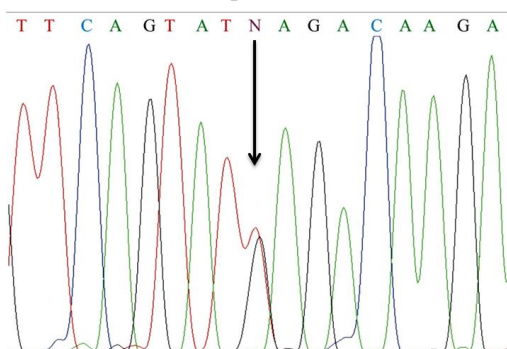


Хомозиготен пациент – с.55delA

**Фигура 38.** Мутацията с.55delA в хетеро- и хомозиготно състояние.

Втората по честота мутация в нашата група се оказва стоп-кодон мутацията p.Glu323\* в екзон 7 на *CAPN3* гена (Фигура 39), която беше открита при 3 неродствени пациента (3/22≈14%) в хетерозиготно състояние. Това е единствената nonsense мутация в *CAPN3* гена, открита при български пациенти. Тази мутация можеше да се окаже уникална генетична характеристика за българската популация, тъй като до тогава тя не беше съобщавана от други автори, но в последствие се оказва, че се среща и при други популации [Fanin et al., 2004; Piluso et al., 2005].

с.967G>T, p.Glu323\*



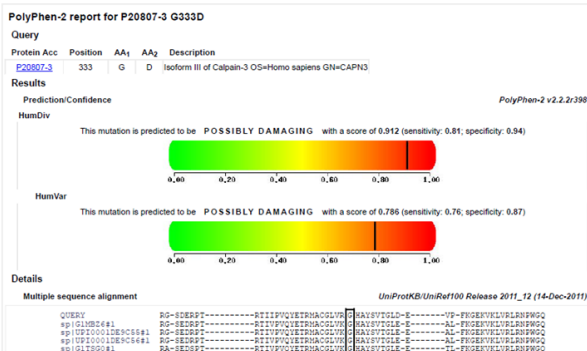
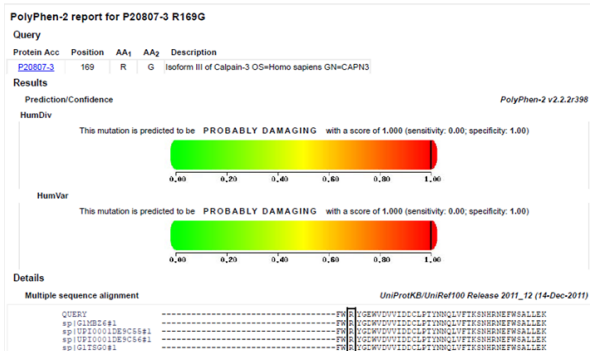
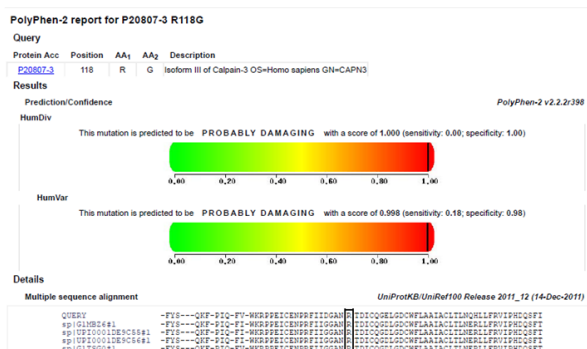
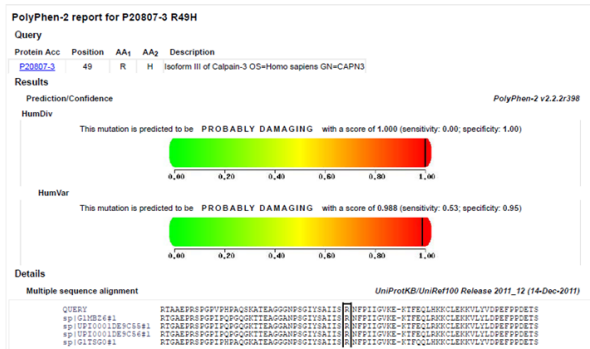
**Фигура 39.** Мутацията с.967G>T в хетерозиготно състояние.

В нашата извадка от LGMD2A пациенти най-чест патогенен дефект 68% (26/38) се оказаха малки делеции на един или няколко нуклеотида (виж Таблица 7 и Фигура 37). От

откритите дефекти 30 (79%) водеха до изместване на рамката на четене на генетичната информация (frameshift) и/или стоп-кодон, свързани с преждевременно прекратяване на белтъчната синтеза. Патогенният ефект на делециите и nonsense мутациите не се нуждаеше от допълнителни доказателства и проверки.

В допълнение, открихме 6 типа missense мутации, заменящи една аминокиселина с друга. Една от тях p.Asp753Asn беше публикувана в световната база данни като патогенна [www.dmd.nl] и не е интерпретирана допълнително за доказване патогенния ѝ ефект при нашия пациент. Останалите пет съгласно изискванията по онова време бяха проверени върху 100 нормални български хромозоми и на тази база бяха приети като свързани със заболяването и съответно патогенни. С възникването на математическите предиктори за оценка патогенния ефект на мутациите върху белтъчната структура и/или функция, вече разполагахме с друго средство за интерпретация на missense мутациите. Тези предиктори се превърнаха в неразделна част от нашата ежедневна работа по ДНК анализа на всеки конкретен пациент. Откритите от нас missense мутациите в *CAPN3* гена бяха анализирани със специфичен софтуер PolyPhen-2 v2.2.2г. Някои от резултатите са представени на Фигура 40. Шестте missense мутации засягат еволюционно висококонсервативни аминокиселини, което има важен принос за оценка на техния патогенен ефект. Вероятният патогенен ефект на четирите аминокиселинни замени беше оценен със скор за патогенност съответно: 1.000-0.988; 1.000-0.998; 1.000-1.000; 0.912-0.786; 1.000-1.000 и 1.000-1.000 (виж Фигура 40).

Едната от аминокиселинните замени p.Arg49His в екзон 1 засяга NS генната секвенция, което най-вероятно води до драстични нарушения в белтъчната функция. Освен това, този дефект се открива при пациент, който носи стоп-кодон мутация на другия алел. Пълното секвениране на гена при този пациент не показва други генни промени, освен двете горепосочени замени, което допълнително потвърждава патогенния ефект на аминокиселинната замяна в екзон 1.



**Фигура 40.** Оценка патогенния ефект на мутациите чрез математически предиктор PolyPhen-2.

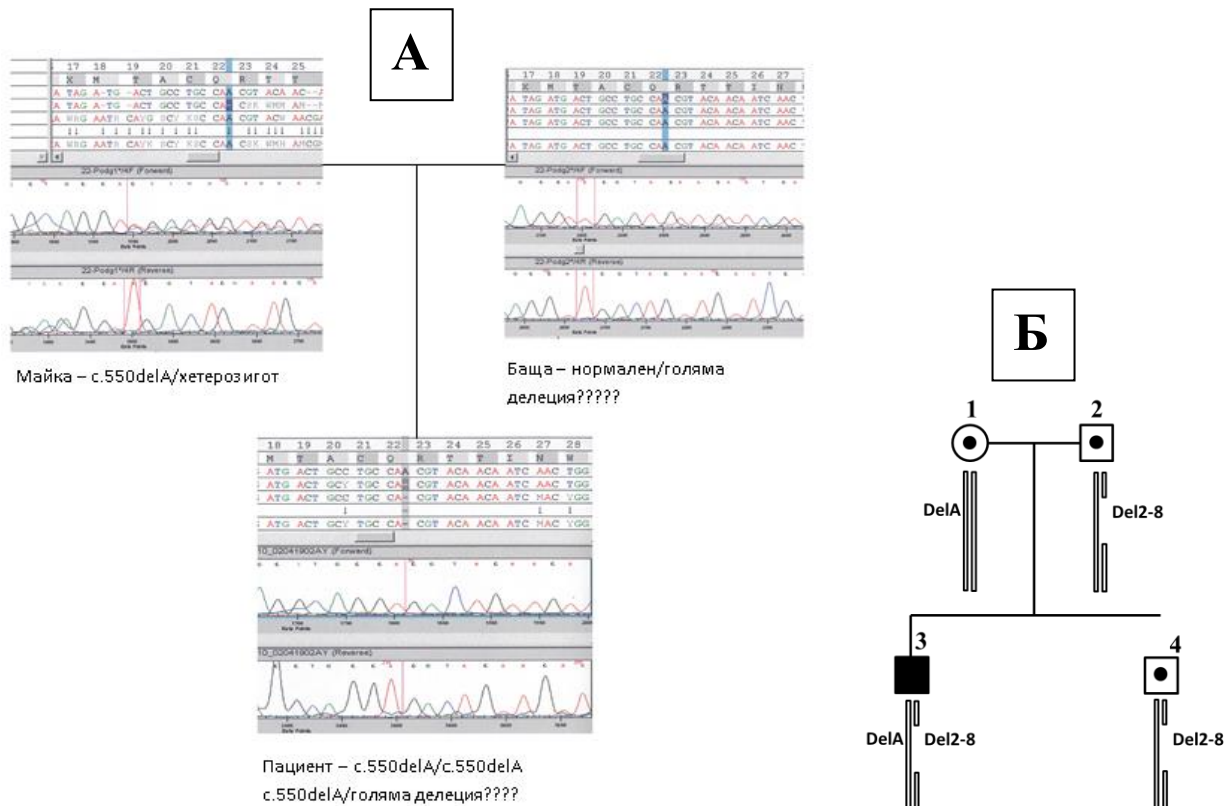
Особен интерес от научна гледна точка представляваха двете мутации в екзон 1 р.Arg49His и в екзон 16 с.1811-12delTC, които засягат две инсерирани секвенции NS и IS2, респективно (виж Фигура 37). Тези последователности играят важна роля за мускулно специфичния калпаин 3. И двата участъка са включени в събития на алтернативен сплайсинг [Herasse et al., 1999] и беше предположено, че тези мутации нарушават тъканно специфични функции.

На базата на проведения скрининг за точкови мутации в *CAPN3* гена посредством PCR и секвениране, шест пациента от изследваната група останаха само с един открит генен дефект, вторият беше неизвестен. Възможно обяснение беше наличието на големи делеции, които на този етап не можеха да бъдат идентифицирани, както и съществуването на мутации в интронни секвенции или в други вътрегенни или извънгенни регулаторни региони.

### Големи делеции в *CAPN3* гена

До тук молекулярно-генетичната диагностика на *CAPN3* гена изглеждаше лесна и безпроблемна. Тези ни очаквания обаче не се оправдаха. При две от изследваните

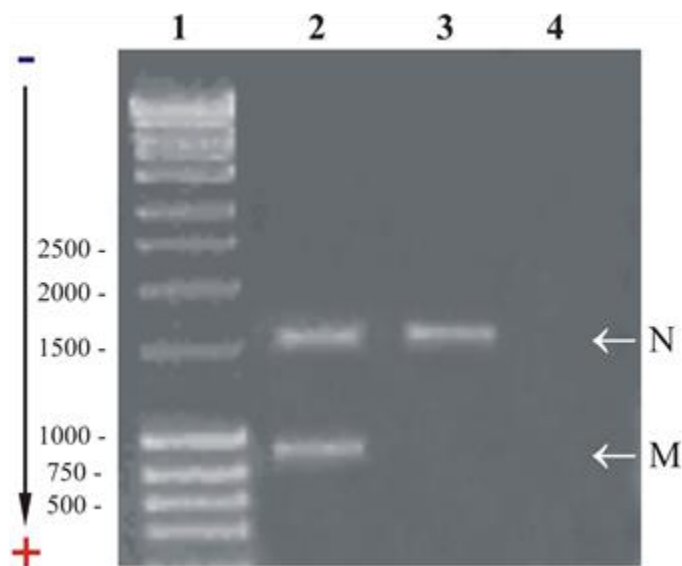
семејства секвенционният анализ покажа хомозиготно състояние на делецията с.550delA в екзон 4 на *CAPN3* гена (Фигура 41А).



**Фигура 41.** Анализ на мутацията с.550delA в рамките на едно семејство. (А). Секвенционни профили и предположение за наличие на голяма делеция в *CAPN3* гена; (Б). Генотипове на изследваните лица.

На пръв поглед всичко изгледаше наред, до момента в който изследвахме родителите за носителство. Секвенционният анализ покажа, че само майките носат мутацията с.550delA в хетерозиготно състояние, докато бащите не носеха такава делеция на ДНК ниво (хомозиготни по нормален генотип) (Фигура 41А). И в двата случая бащинството беше потврдено. Най-логично изгледаше објаснението за наличие на втора голяма делеция, покривава целия екзон 4, в резултат на което мутацията с.550delA изгледа хомозиготна при пациентот, но тя е в действителност в хемизиготно състояние (Фигура 41Б). По тоа време, единствената технологија, која даваше можност да се провери таа хипотеза беше изследването на ниво транскрипт (копиДНК). Тоа наложи изолирање на РНК при тези 2 семејства, обратна транскрипција и PCR на копиДНК със специфично дизајнирани праймери во регионот на екзон 1 и екзон 10. Во тој експеримент „успехот на начинаешиот“ беше на наша страна и се получи недвосмислен резултат: наличие на един

атипичен (мутантен) транскрипт около 850 bp и един нормален транскрипт ~1600 bp (Фигура 42). Мутантният транскрипт беше екстахиран от гела и секвениран. Установихме делеция на екзони 2-8 от калпаин 3 гена (Фигура 43).



**Фигура 42.** Транскрипционен анализ на *CAPN3* гена.

N-нормален транскрипт ~1600 bp;

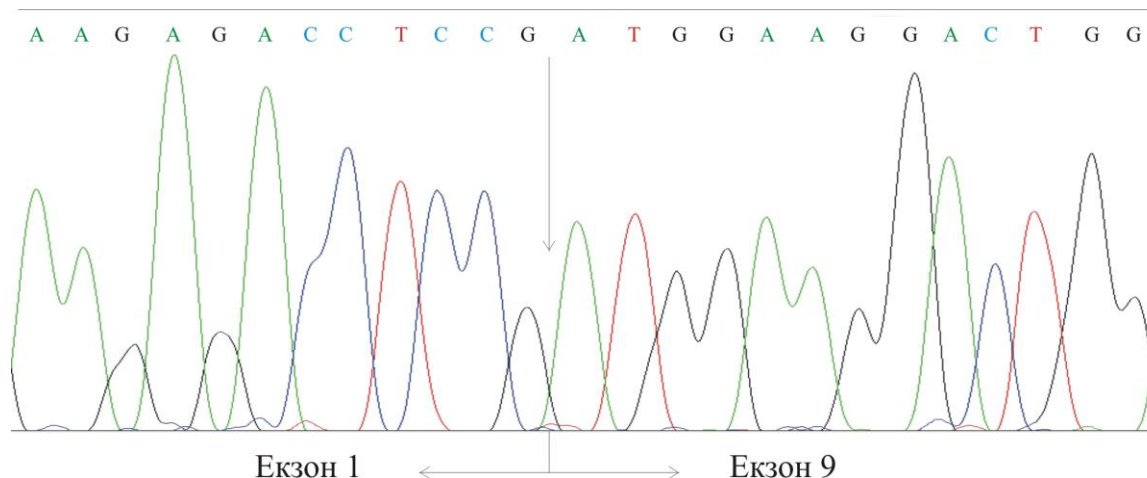
M-мутантен транскрипт ~850 bp.

1 – Молекулен маркер

2 – пациент

3 – нормална контрола

4 – негативна контрола

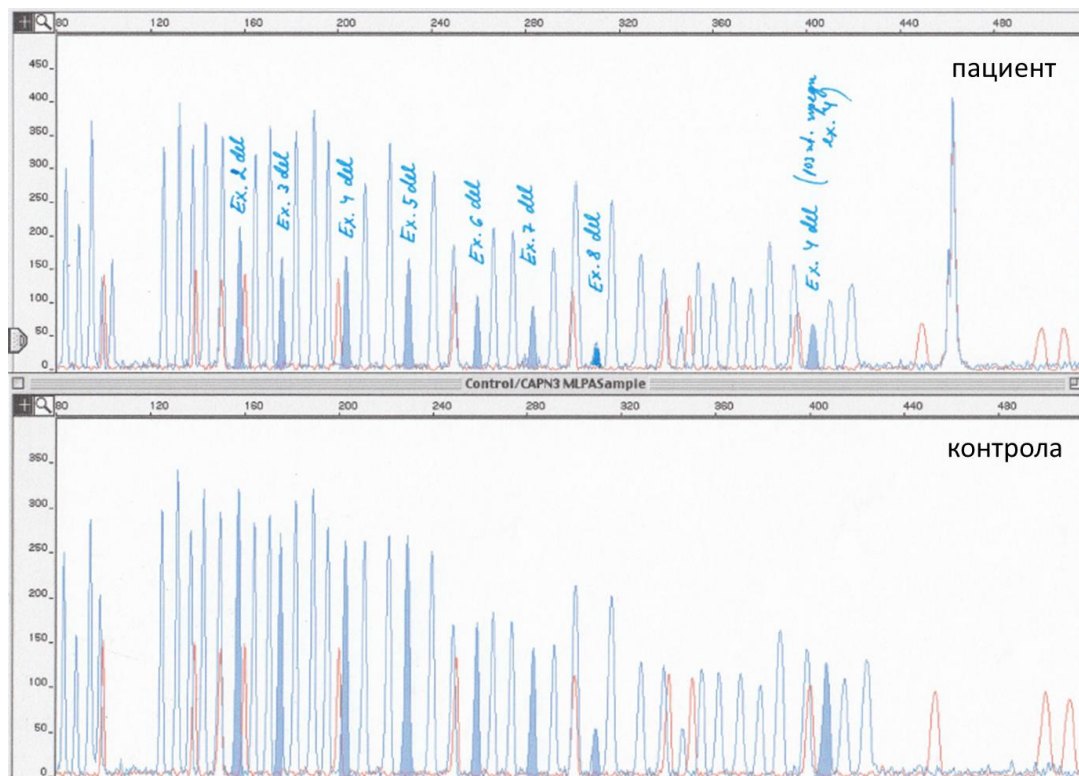


**Фигура 43.** Секвенционен анализ на получения абнормален транскрипт. Краят на екзон 1 се сплайсва с началото на екзон 9, което съответства на делеция на екзони 2-8 (c.310-?\_c.1115+?del, p.Glu104\_Arg372delfsh\*11).

Откритата голяма делеция на екзони 2-8 (c.310-?\_c.1115+?del; p.Glu104\_Arg372delfs\*11) е една и съща и при двете изследвани семейства. Този генен дефект нарушава рамката на четене на генетичната информация (frameshift) и води до преждевременно прекратяване на белтъчната синтеза 11 кодона след началото на екзон 9.

По същото време такава делеция беше докладвана на European Human Genetics Conference, May 2003, Birmingham, England при швейцарски пациент, който за огромно щастие на изследователите е бил хомозиготен по този дефект и това прави лесно откриването му на ДНК ниво [Joncourt et al., 2003]. Преди нашето откритие, в литературата беше съобщена само една голяма делеция на екзони 5-7 [Richard et al., 1999].

На базата на описаните резултати предположихме, че най-вероятно големи делеции в *CAPN3* гена не са рядкост, но остават неоткрити на ДНК ниво, поради рутинното приложение на секвенционен анализ за диагностика на калпаинопатия. Възможно беше да се окаже, че има чести еднотипни делеции, като тази открита от нас (делеция на екзони 2-8) при неродствени семейства и докладвана в друго проучване. За да се изяснят тези случаи бяха необходими по-задълбочени изследвания на ниво РНК транскрипт, тъй като това беше единствената технологична възможност тогава. На тази база предприехме редица експерименти на РНК ниво при други семейства, които имаха един известен дефект в *CAPN3* гена на базата на секвенционен анализ. Тук късметът ни изневери и се оказа че този анализ е неприложим рутинно за диагностични цели, поради наличието на множество алтернативно сплайсвани форми с тъканно специфични функции [Herasse et al., 1999]. Полученият амплификационен профил беше твърде комплициран, за да може да се интерпретира еднозначно и надежно за диагностични цели. Поради това, скринингът за големи делеции в *CAPN3* гена беше преустановен за около 1-2 години, когато през 2004-2005 година MLPA анализът навлезе масово в диагностиката. Нашите пациенти с делеции бяха потвърдени чрез MLPA (Фигура 44) и в момента скринингът за големи делеции в *CAPN3* гена се изпълнява рутинно чрез MLPA профилиране. От 6-те пациента с един неизвестен все още молекулен дефект, само 2-ма бяха налични по това време за провеждане на MLPA анализ, но големи делеции не бяха открити.



**Фигура 44.** MLPA профил на делеция на екзони 2-8 от *CAPN3* гена. Пиковите на делетираните екзони при пациента в сравнение със същите при нормална контрола са маркирани в синьо.

Описаният случай ни научи, че това което виждаме като генотип в хомозиготно състояние може в действителност да е хемизиготен профил. Нужни са изследвания в рамките на фамилията, за да се изясни всеки конкретен генотип и на тази база да се избегне неправилна интерпретация на генетичните резултати и неправилно консултиране на семейството.

### **Диференциална диагностика при клинично неясни случаи**

Нашата хипотеза, че калпаинопатията ще се окаже честа за България беше потвърдена. В годините след въвеждане на молекулярно-генетичната диагностика на *CAPN3* гена се оказа, че тези пациенти не са рядкост у нас. Освен това, с помощта на молекулярно-генетичен скрининг за двете най-чести мутации в *CAPN3* гена за българските пациенти (c.550delA и p.Glu323\*) се оказа, че някои пациенти с предварителна диагноза ДМД/БМД или спинална мускулна атрофия (СМА), които не са били генетично потвърдени, са в действителност погрешно клинично диагностицирани. Резултатите показаха, че от 59 пациенти с предполагаема диагноза ДМД/БМД 5 (8.5%) са били погрешно диагностицирани [Georgieva/Todorova et al., 2005]. При пациентите с

предполагаема диагноза СМА от 49 изследвани 2 (4.1%) са били с грешна първоначална диагноза (Таблица 8) [Georgieva/Todorova et al., 2005].

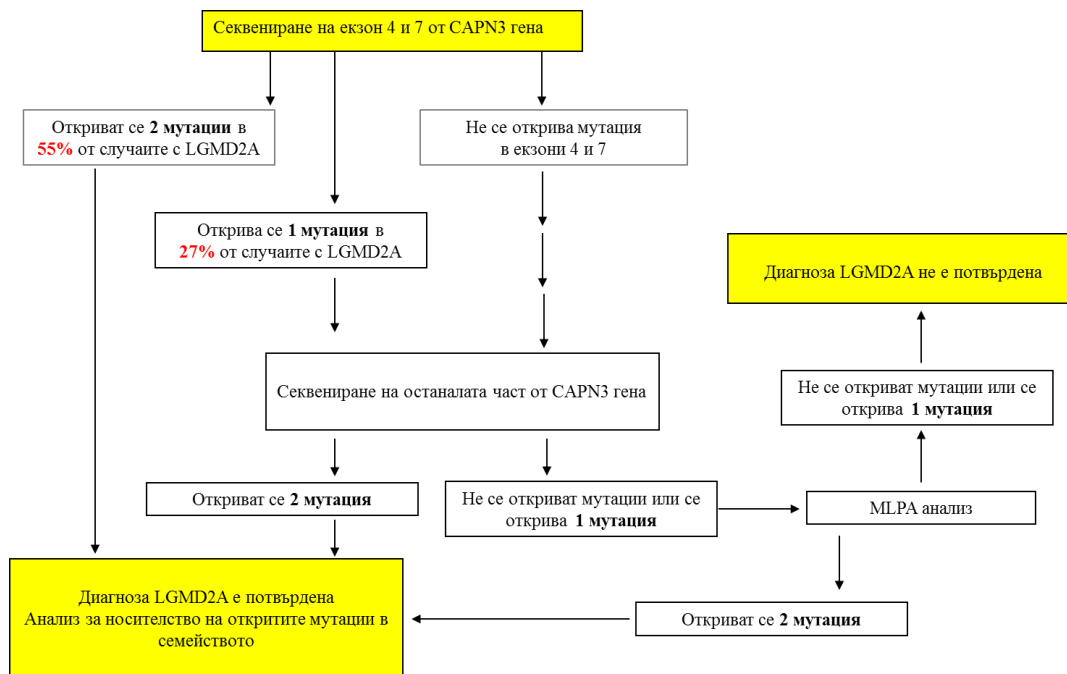
**Таблица 8.** Ревизиране на диагнозата при пациенти с ДМД/БМД и СМА след провеждане на молекулярно-генетични изследвания.

Диагноза	c.550delA		p.Glu323Stop	Честота
	хомозигот	хетерозигот	хетерозигот	
ДМД/БМД				
59	2	2	1	(5/59) 8.5%
СМА				
49	1	1	----	(2/49) 4.1%

ДНК анализът в тези семейства, доверявайки се на първоначалната клинична диагноза би довел до грешни резултати и погрешно медико-генетично консултиране. При последваща пренатална диагностика този пропуск можеше да се окаже с фатални последици за семейството. Затова, при негативни резултати от генетично изследване могат да се проведат допълнителни изследвания в гени, свързани със сходна клинична симптоматика и при положителен резултат, първоначалната клинична диагноза се налага да бъде ревизирана. Успешното провеждане на ДНК анализа зависи в голяма степен от подробното клинично описание на всеки конкретен случай и се базира на правилно поставена клинична диагноза. Това условие е особено важно днес в ерата на NGS, където успешното интерпретиране на данните от секвенционния анализ зависи до голяма степен от коректното и подробно описание на клиничните находки.

### **3.2.5. Обобщение на получените резултати и заключителни бележки**

За последните 13 години (от 2002 до 2015 г) бяха изяснени молекулните причини за изява на мускулна дистрофия пояс-крайник тип 2А (калпаинопатия) при 22 неродствени български пациента. Откритите мутации при българските пациенти са разпръснати по дължината на гена, но въпреки сравнително малката извадка се оформиха две горещи точки: екзон 4 и екзон 7, в които попадат 79% от генните дефекти. На тази база е разработен системен подход за анализ на семейства с калпаинопатия (Фигура 45).



**Фигура 45.** Системен подход за анализ на семейства с LGMD2A.

Благодарение на съвместните усилия на невролози и генетици днес диагнозата калпаинопатия се разпознава и прецизно диагностицира от редица специалисти в България.

### **3.3. ЛАМИНОПАТИИ: АВТОЗОМНО ДОМИНАНТНА ФОРМА НА МУСКУЛНА ДИСТРОФИЯ EMERY-DREIFUSS, ЕДМД (EMERY-DREYFUSS MUSCULAR DYSTROPHY, EDMD) И МУСКУЛНА ДИСТРОФИЯ ПОЯС-КРАЙНИК ТИП 1Б, ПКМД1Б (LIMB-GIRDLE MUSCULAR DYSTROPHY 1B, LGMD1B)**

Ламинопатиите са голяма група заболявания, характеризиращи се с изключително хетерогенна клинична симптоматика и асоциирани с мутации в един и същи ген, *LMNA*, кодиращ белтъка ламин А/С (виж по-надолу текста). Първоначално мутации в този ген са били открити при наследствени невромускулни заболявания, които са обект на настоящия труд.

### **3.3.1. Клинично описание и лабораторни изследвания**

Автозомно доминантната форма на мускулна дистрофия Emery-Dreifuss (ЕДМД; EDMD-AD; OMIM#181350) е наследствена прогресивна миопатия, която се характеризира **клинично** със прогресираща мускулна слабост засягаща главно хумеро-перонеалната област и ставни контрактури [Emery, 1989]. Първите симптоми се проявяват в широк възрастов диапазон, от ранна детска възраст до средата на третата декада. Описват се проблеми при тичане, ходене на по-големи разстояния и изкачване на стълби. Контрактурите засягат главно лакътната става и ахилесовото сухожилие, наблюдават се ограничения в движенията на врата и гръбнака, породени от скъсяване на мускулите. Прогресията е по-бавна в началото на заболяването, като се забелязва по-бърза еволюция с напредване на възрастта.

Анализ на **мускулна биопсия** показва неврогенни и миопатни промени в комбинация с възпалителен процес.

**Електромиографско изследване** показва миопатни промени.

Често наблюдавана клинична находка е **кардиомиопатия**, проявяваща се основно като аритмия и проводни нарушения асоциирани със сърдечен блок [Yates, 1991; 1997; Zacharias et al., 1999]. При сърдечно засегнатите пациенти често се налага поставянето на pacemaker. При някои пациенти с тежка дисритмия се препоръчва имплантиране на дефибрилатор. При тези пациенти съществува повишен риск от сърдечен арест проявяващ се в средна възраст, което е честа причина за внезапна смърт.

**Серумните нива на креатинкиназата** са доста неспецифичен параклиничен показател. При някои пациенти нивата на ензима са нормални, при други леко завишени, а при трети значително над нормата.

На базата на описаните по-горе клинични симптоми се поставя диагноза мускулна дистрофия пояс-крайник или Emery-Dreifuss muscular dystrophy, но с автозомно доминантно унаследяване [Miller et al., 1985; Bonne et al., 2000].

Описана е и много рядка форма на ЕДМД, която се унаследява рецесивно (EDMD-AR; OMIM#604929 [Raffaele di Barletta et al., 2000]. Тази форма не е обект на настоящия труд.

Друга форма ламинопатия с мускулно и сърдечно засягане е автозомно доминантната мускулна дистрофия пояс крайник тип 1Б (ПКМД; LGMD1B; OMIM#159001) [Muchir et al., 2000]. Заболяването е наследствено и се характеризира **клинично** със слабо прогресираща миопатия, ангажираща предимно проксималните мускули на краката. При тази форма ламинопатия не се наблюдава ранна поява на контрактури. Сърдечното засягане се извява основно като атрио-вентрикуларни проводни нарушения [van der Kooi et al., 1996b].

В заключение могат да се обособят два широки фенотипа: лека форма на заболяването с късно начало, бавна прогресия и слабо проявена мускулна слабост и контрактури и тежка форма с ранно начало и бърза прогресия [Vonpe et al., 2000].

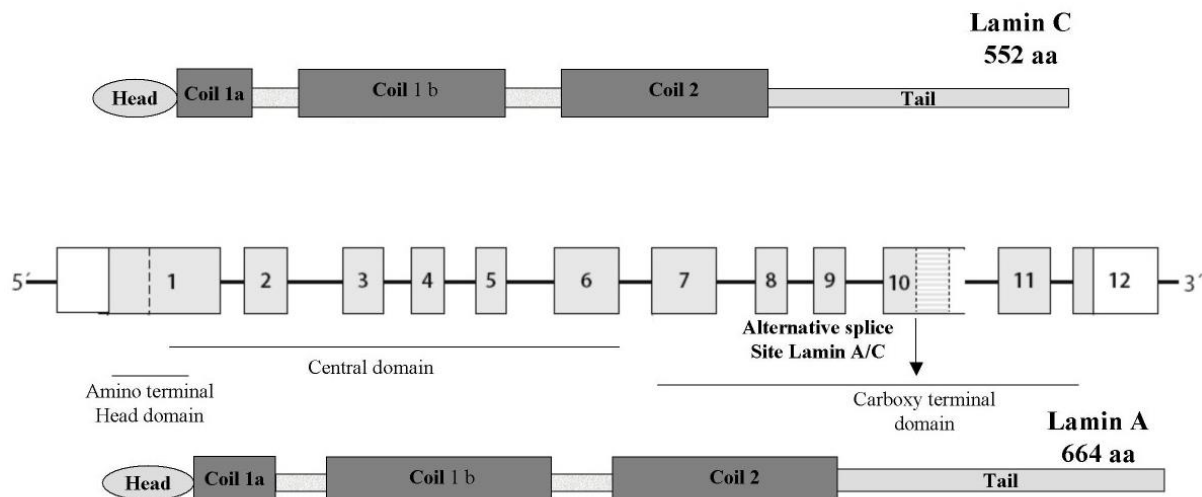
Други алелни форми ламинопатии, които не се отнасят към групата на невромускулните заболявания са: сърдечни заболявания, периферни невропатии, липодистрофии, прогероидни синдроми, мандибулоакрална дисплазия, рестриктивна дермопатия и др. [www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM], които не са обект на настоящия труд.

Следователно ламинопатиите се извяват в широк спектър от тъканно специфични симптоми. Някои фенотипни характеристики са общи за част от заболяванията в тази група, но също така се наблюдава и изключителна фенотипна вариабилност в рамките на една форма и дори в рамките на едно семейство.

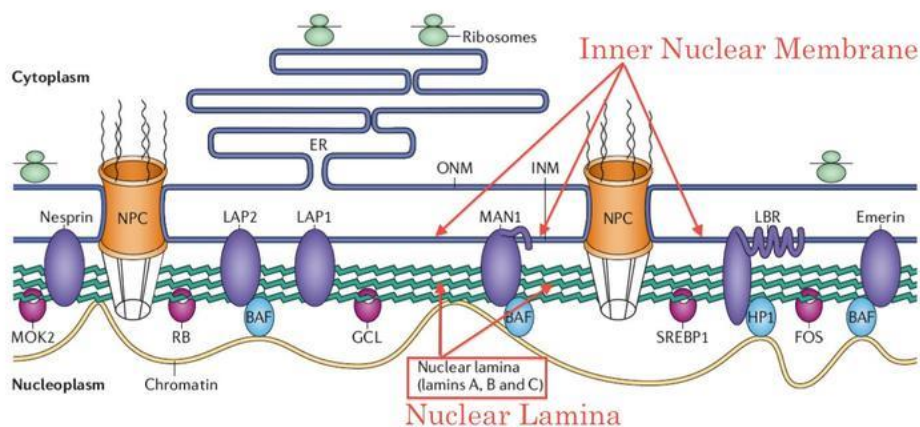
### **3.3.2. Молекулни основи**

Ламинопатиите са алелни форми, причинени от мутации в един и същи **ген *LMNA*** (OMIM\*150330) [Lin and Worman, 1993]. Кодиращият регион на *LMNA* гена покрива приблизително 24 kb и съдържа 12 екзона [Lin and Worman, 1993]. Генът *LMNA* е картиран на дългото рамо на 1-ва хромозома, 1q21.2-q21.3 [Wydner et al., 1996] с помощта на флуоресцентна *in situ* хибридизация, а по късно Gross през 2013г. [www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM/LMNA] прави по-прецизно картиране на гена в региона 1q22 на базата на съпоставяне на *LMNA* генната секвенция от GenBank AY847595 с геномната секвенция GRCh37 (Фигура 46).





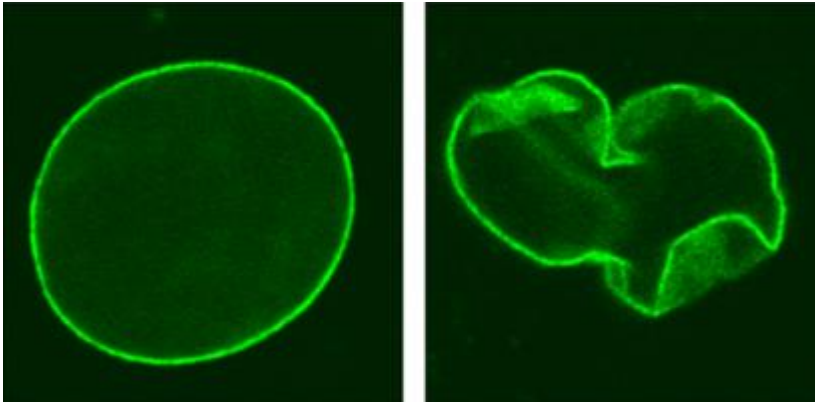
**Фигура 47.** Генериране на ламин А и С чрез алтернативен сплайсинг и доменна организация на двата белтъка [www.cardiovascularultrasound.com].



**Фигура 48.** Локализация на ламин А/С във вътрешната ядрена мембрана [prescottgenomics.wikispaces.com].

Заедно с ламините от тип В (кодирани от други гени) ламин А формира филаменти в ядрената ламина [Vonne et al., 1999] (виж Фигура 48). Този процес започва с образуването на димерна структура в зоната на  $\alpha$ -спиралните род домени. Ламин А взаимодейства и с хроматина, и с други интегрални протеини от вътрешната ядрена мембрана посредством специфични участъци от rod домена и глобуларната опашка в карбоксилния край [Fisher et al., 1986; Glass et al., 1993; Taniura et al., 1995; Hutchison et al., 2001]. Вероятно

нарушаването на тези специфични взаимодействия чрез мутации в *LMNA* гена е свързано с тъканната и фенотипна вариабилност на ламинопатиите (Фигура 49).



**Фигура 49.** Равномерно оцветена клетка при нормален ламин (ляво) и неправилна форма и оцветяване при наличие на мутация в *LMNA* гена (дясно) [prescottgenomics.wikispaces.com]

**Мутациите** в *LMNA* гена, които са известни до момента представляват основно нуклеотидни замени. Най-голям процент се пада на missense мутациите, следвани по честота от мутации, нарушаващи сплайсинга [www.dmd.nl/LMNA]. Nonsense мутации, както и делеции на един или няколко нуклеотида и малки инсерции са сравнително рядко откривани в *LMNA* гена [www.dmd.nl/LMNA]. Мутациите, причиняващи мускулни дистрофии и дилатативна кардиомиопатия са разпръснати по дължината на целия ген, докато при някои от другите заболявания като например липодистрофия се наблюдава известно концентриране на мутациите в определен генен регион. В допълнение, една и съща мутация може да бъде отговорна за различни или комплексни фенотипни прояви, както и една и съща мутация може да е свързана с драстични вариации в клиничната изява на едно заболяване [Tazir et al., 2004; Todorova et al., 2006].

### **3.3.3. Генотип-фенотипни корелации**

Поради интересните особености на *LMNA* гена и познанията ни върху факта, че мутации в този ген водят до широк спектър тъканно специфични фенотипни прояви, от години се работи задълбочено за изясняване ефекта на дадена мутация върху белтъчната структура, локализация и/или функция. Така беше установено, че някои от мутациите в

*LMNA* гена не нарушават съществено клетъчната локализация на ламин А/С, докато други мутации точно обратното, драматично нарушават нормалната белтъчна локализация [Östlund et al., 2001]. В резултат на това, увреденият белтък се акумулира в големи интрануклеарни депозити [Östlund et al., 2001]. Установено е, че някои missense мутации в *LMNA* гена модифицират правилното сглобяване на ламин А/С и нарушават белтък-белтъчни взаимодействия [Raharjo et al., 2001]. В някои проучвания е установено, че дефицит на ламин А/С нарушава ядрената механика и повлиява РНК транскрипцията, което се предполага че има отношение към тъканно специфичния ефект на мутациите в *LMNA* гена [Caranni et al., 2003; Lammerding et al., 2004]. В проучвания върху ламин А/С дефицитни мишки е установено, че дилатативна кардиомиопатия се провокира от нарушение във взаимодействията на ламина с мускулно-специфичната десминова мрежа и загуба на правилната цитоскелетна форма [Nikolova et al., 2004].

Въпреки многобройните генотип-фенотипни проучвания, нашите познания относно тъканно-специфичния ефект на *LMNA* мутациите са все още непълни, поради факта че не познаваме все още добре нормалната функция(и) на дивия тип ламин А/С. Освен участието на този белтък в специфични взаимодействия с други белтъци и хроматин, се предполага че нативният ламин А/С играе важна роля за правилната иРНК транскрипция. Това предположение се базира на наблюдаваната неправилна локализация на транскрипционно ангажираната РНК полимераза II в мускулни клетки от пациенти с *LMNA* мутации [Reichart et al., 2004].

Генетичните изследвания показват, че при пациенти с ранно начало в детска възраст се откриват missense мутации, докато при пациенти с късно начало се откриват преимуществено мутации, водещи до генериране на стоп кодон [Benedetti et al., 2007]. Изказано е предположението, че при невромускулните *LMNA*-свързани заболявания съществуват два различни патогенни механизма: фенотипът с късно начало може да се дължи на загуба на *LMNA* функция в резултат на хаплоинсуфициенция, докато доминантно-негативно или токсично усилване на *LMNA* функция може да се асоциира с по-тежкия фенотип с ранно начало [Benedetti et al., 2007].

**Мозаицизъм:** Описано е семейство с две засегнати деца, страдащи от мускулна дистрофия с ранно начало, като клиничната картина отговаря на ЕДМД [Makri et al., 2009]. Родителите са близкородствени и първоначално е предполаган автозомно рецесивен тип на унаследяване, но молекулярно-генетичният анализ показва хетерозиготна мутация в *LMNA*

гена при двете деца, която не се открива при двамата незасегнати родители. Логично обяснение на този случай е герминативен мозаицизъм или повторна *de novo* поява на една и съща мутация в семейството [Makri et al., 2009].

#### **3.3.4. Собствени резултати**

През 2002 г. верифицирах на молекулно ниво първия български пациент с диагноза ЕДМД. Това беше направено отново в колаборация с групата на prof. Clemens Mueller-Reible, University of Wuerzburg, Germany. Тогава имах за задача за разработя и оптимизирам за рутинно изпълнение молекулярно-генетичната диагностика на *LMNA* гена при немски пациенти. Оказа се много трудна задача, тъй като първоначално събраните пациенти в ДНК банката на немската лаборатория с такава клинична диагноза бяха изключени на молекулно ниво. При тези пациенти не беше провеждан предварителен имунохистохимичен анализ на ламин А/С и диагнозата беше поставена само на базата на клинични изследвания. От технологична гледна точка имахме проблем с анализа на екзон 2 на *LMNA* гена, който не се поддаваше на амплификация с първоначално дизайнираните от нас праймери и се наложи да направим нов праймерен дизайн. Молекулярно-генетичният анализ на *LMNA* гена включваше секвениране на гена на автоматичен секвенатор. След месеци работа успяхме да открием първата мутация в *LMNA* гена при немски пациент и след ревизиране на клиничната диагноза при серия немски пациенти, успяхме да верифицираме на молекулно ниво и други пациенти. Тогава разполагах с ДНК проби от български пациенти с неясни невромускулни заболявания и когато скринирах и нашите пациенти с клинична диагноза съответстваща на ЕДМД, един от тях беше верифициран на молекулно ниво. Така беше поставено началото на молекулярно-генетичната диагностика на ламинопатии в България. В последствие бяха верифицирани на молекулно ниво и други български пациенти, някои от които принадлежат към големи фамилии със засегнати пациенти в редица поколения назад, които години са чакали изясняване на диагнозата. Част от тези резултати бяха публикувани в глава от книга “Progress in Medical Genetics”, редактор Marlene A. Horry, Nova Science Publishers, Inc., New York [Todorova et al., 2006].

През изминалите 13 години (2002-2015) изследвах 17 неродствени пациента от немски произход и 7 неродствени български семейства с предполагаема клинична диагноза невромускулна ламинопатия. Мутации в *LMNA* гена бяха открити при 7 от немските

пациенти, 41% и при 5 от българските семейства, 71% (Таблица 9). Двете негативни за мутации в *LMNA* гена български семейства бяха насочени за *LMNA* скрининг по повод клинична диагноза идиопатична дилатативна кардиомиопатия. Следва описание на клиничната картина на генетично верифицираните случаи в нашата извадка. Възрастта на поява на първите симптоми при нашите пациенти варираше в широки граници: от 1 до 35 години (средна възраст 17.6 г). Съобщаваните първи симптоми бяха проблеми при тичане, ходене и изкачване на стълби. При четири от случаите аритмия, сърдечни проблеми и кардиомиопатия бяха наблюдавани от самото начало на манифестиране на заболяването, като в два от случаите сърдечното засягане беше водеща симптоматика. Стойностите на креатинкиназата бяха нормални при пациенти в по-ранна възраст (около 14-16 години). При някои пациенти креатинкиназата беше завишена. Прогресията на заболяването беше бавна през първите 30 години от живота и по-бърза след това. При двама български пациенти засягането беше особено тежко с начало в ранна детска възраст на 1 и 3 години, характеризиращо се с типичната клинична картина на конгенитална мускулна дистрофия и бърза прогресия. Едното от тези деца на 4 годишна възраст не можеше да се движи самостоятелно. Някои пациенти се движеха самостоятелно след 50 годишна възраст, а други се нуждаеха от помощ при ходене и изкачване на стълби от по-ранна възраст. Мускулната слабост при повечето пациенти засягаше проксималните мускули на долни и горни крайници, като варираше от лека до тежка форма. Мускулна атрофия, хипертрофия на прасците и криловидни лопатки бяха наблюдавани при единични пациенти. Гръбначни деформации като хиперлордоза и торакална кифоза бяха рядко срещани. Лакътни контрактури, както и контрактури на глезена, стъпалата и врата бяха докладвани при всички пациенти с едно изключение, като при този пациент беше подчертано, че контрактури никога не бяха наблюдавани от преглеждащите го клиницисти. По отношение на сърдечното засягане, всички наши пациенти, с изключение на двете деца, страдаха от ритъмни нарушения. Проводни нарушения бяха установени по-рядко само при 2-ма от нашите пациенти. AV блок беше диагностициран при единични пациенти. При 5 пациента беше имплантиран поне един *pacemaker*. В два от случаите беше имплантиран дефибрилатор. В редица случаи се налагаше постоянна антикоагулантна терапия с *warfarin*. Пет от немските семейства и 3 от българските бяха фамилни, 2 немски и 2 български - спорадични. След като бяха диагностицирани на молекулно ниво първите случаи на EDMD/LGMD1B или невромускулни ламинопатии и беше описана подробно клиничната

симптоматика при тези пациенти, и в Германия и в България клиничното разпознаване на тези форми ламинопатии стана доста по-успешно.

### Точкови мутации в *LMNA* гена

Резултатите от скрининга за мутации в *LMNA* гена са представени в Таблица 9.

**Таблица 9.** Мутации в *LMNA* гена при немски (1-7) и български (8-12) пациенти.

№	Екзон	Нуклеотидна замяна	Аминокиселинна промяна	Тип мутация	Белтъчен домен	Клинична диагноза
1	1	c.313G>T	p.Glu105*	nonsense	Rod domain (coil 1a, 1b)	LGMD1B
2	2	c.513G>A	p.Lys171Lys**	splice-site	Rod domain (coil 1b)	LGMD1B
3	6	c.1067T>G	p.Leu356Arg	missense	Rod domain (coil 2)	EDMD
4	6	c.1144G>C	p.Gly382Arg	missense	Rod domain (coil 2)	EDMD
5	9	c.1583C>A	p.Thr528Lys	missense	Globular tail	EDMD
6	9	c.1583C>A	p.Thr528Lys	missense	Globular tail	EDMD
7	9	c.1608+4A>G	----	splice-site	Globular tail	EDMD
8	3	c.583A>G	p.Asn195Asp	missense	Rod domain (coil 1b)	EDMD
9	10	c.1621C>T	p.Arg541Cys	missense	Globular tail	EDMD
10	6	c.1130G>A	p.Arg377His	missense	Rod domain (coil 2)	EDMD
11	6	c.1072G>A	p.Glu358Lys	missense	Rod domain (coil 2)	Конгенитална мускулна дистрофия
12	4	c.745C>T	p.Arg249Trp	missense	Rod domain (coil 1b)	Конгенитална мускулна дистрофия

Немските и български пациенти в таблицата са разделени със сиво поле.

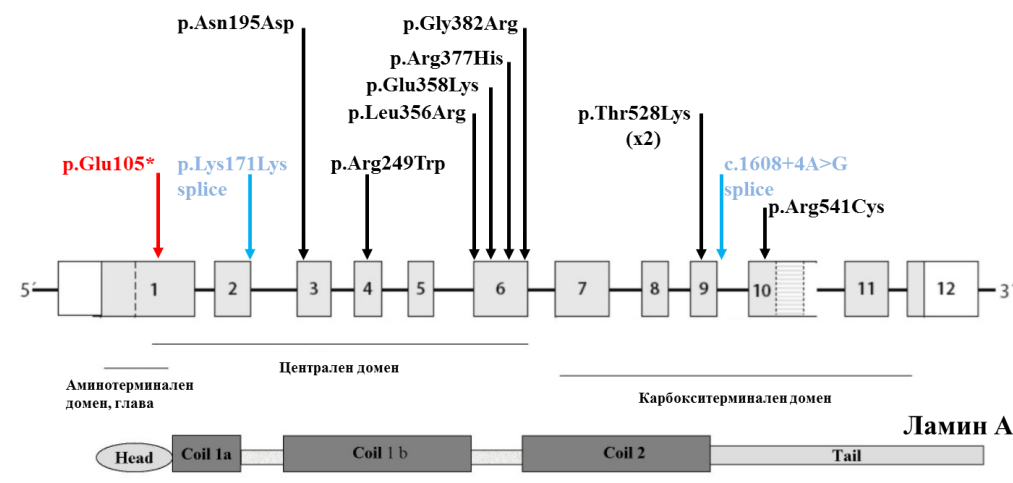
\*-стоп кодон

\*\*Синонимната замяна c.513G>A, p.Lys171Lys, активира алтернативен сплайс участък (cryptic splice-site) в интрон 2, което води до инсерирането на 45 нуклеотида и 15 нови аминокиселини [Todorova et al., 2003b].

Повече от 80% от откритите първоначално мутации бяха уникални, открити за пръв път от нас, тъй като по онова време молекулярно-генетичната диагностика на ламинопатии едва започваше в световен мащаб и имаше по-малко от 100 патологични находки в *LMNA* гена в световната база данни. С изключение на мутацията p.Thr528Lys, която беше открита при

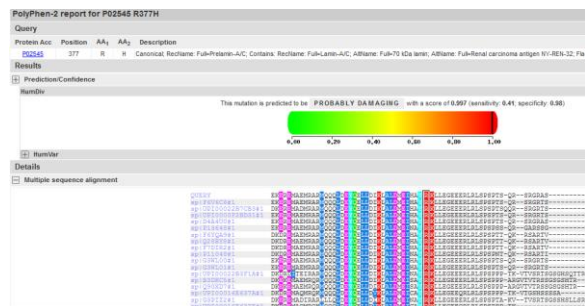
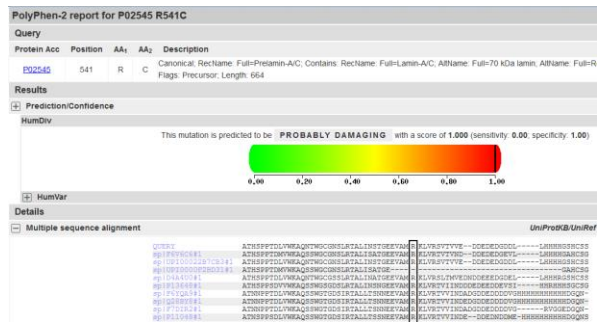
двама неродствени пациента от немски произход (виж Таблица 9) и беше вече публикувана в други проучвания [Bonne et al., 2000; Brown et al., 2001], всички останали мутации бяха различни за различните пациенти.

Мутациите, които открихме в *LMNA* гена бяха главно missense (75%), мутации нарушаващи сплайсинга (17%) и nonsense (8%). В нашата извадка от немски и български пациенти не установихме друг тип мутации като малки делеции или инсерции. Повечето missense мутации засягат централния  $\alpha$ -спирален rod домен на протеина с hotspot в екзон 6. Няколко мутации попадат в С-терминалния глобуларен участък (Фигура 50).



**Фигура 50.** Локализация на откритите мутации в нашата извадка по дължината на *LMNA* гена. Екзоните на гена са номерирани в правоъгълници, а белтъчните домени са надписани и илюстрирани под съответните екзони. Missense мутациите са представени в черно с черни стрелки, посочващи позицията на мутацията в конкретния екзон; мутациите нарушаващи сплайсинга са представени в синьо, а стоп-кодон мутацията - в червено.

Всички missense мутации заменят аминокиселини, които са еволюционно високо консервативни и най-вероятно играят ключова роля за правилната структура, локализация и/или функция на ламин А/С. Според математическия предиктор PolyPhen -2 индексите на патогенност за тези замени са: 0.997 за мутацията p.Arg377His и 1.000 за всички останали (Фигура 51).



**Фигура 51.** Оценка патогенния ефект на мутациите p.Arg541Cys и p.Arg377His чрез математически предиктор PolyPhen-2.

Две от новите missense мутации, които попадат в  $\alpha$ -спиралния rod домен заменят алифатни аминокиселини (Gly382 и Leu356) с аминокиселината Arg, която носи базична странична верига. При замяната p.Asn195Asp се включва аминокиселина с допълнителна карбоксилна група, което променя заряда на аминокиселинния остатък в тази позиция. Такъв тип драстични модификации в  $\alpha$ -спиралния rod домен най-вероятно нарушават сглобяването на ламин филаментите, което се базира на взаимодействия между rod домените [Fisher et al., 1986; Stuurman et al., 1998]. Замяната на консервативни аминокиселини би могло да се отразява на ламин взаимодействията с хроматина и други белтъци от вътрешността на ядрената мембрана, които се базират на взаимодействия, позиционирани в rod домена [Glass et al., 1993] или в C-крайната глобуларна опашка [Hoger et al., 1991; Taniura et al., 1995]. В други проучвания беше установено, че мутации в кодони 195, 358 и 386, идентични или много близки до нашите, нарушават драстично локализацията на ламин A в много клетки и водят до акумулиране на белтъка в интрануклеарни депозити [Ostlund et al., 2001]. Други автори демонстрираха, че мутации в  $\alpha$ -спиралния rod домен, засягащи кодони 85 и 195 се отразяват върху сглобяването на ламин A/C филаментите, докато мутации в C-терминалния глобуларен регион (кодони 482 и 530) нямат отношение към насочването, сглобяването и локализацията на ламин A [Raharjo et al., 2001]. Откритите от нас missense мутации засягат някои от тези добре проучени кодони или кодони много близко разположени до тях, поради което можем да предположим, че тези мутации упражняват подобен ефект върху правилното сглобяване и локализация на ламин A/C белтъчната молекула.

Nonsense мутации са докладвани сравнително рядко в *LMNA* гена, много по-рядко от аминокиселинните замени. В нашата извадка от немски и български пациенти ние открихме

само една такава мутация p.Glu105\* в екзон 1, при голямо немско родословие, която е асоциирана с тежка форма мускулна дистрофия пояс-крайник със сърдечно засягане.

Особен интерес представляват двете мутации, нарушаващи сплайсинга (splice-site). Мутацията c.1608+4A>G засяга четвъртия нуклеотид в донор сплайсинг участък на интрон 9. Имаше друга публикувана мутация в позиция +5 на същия този донор сплайс участък (c.1608+5G>C), която беше докозана на транскрипционно и транслационно ниво като патогенна, тъй като запазва интрон 9 в структурата на белтъка [Muchir et al., 2000]. По аналогия с вече публикуваните резултати приехме, че и нашата мутация в този донор сплайс участък нарушава сплайсинга и беше приета като патогенна. По онова време не бяха налични математическите предиктори за оценка влиянието на нуклеотидните замени в интронните последователности върху сплайсинга. За да се оцени количествено вероятността за сплайсинг в новогенерирания от замяната донор сплайс участък, беше възможно да се изчисли подобие между нормалния и мутантния донор сплайс участък. Това подобие беше изчислено като консенсусна стойност, “consensus values” (CVs), съгласно [Shapiro and Senapathy, 1987]. За целта се изчислява влиянието на всички нуклеотиди в позиции 5’>-2, -1, +1, +2, +3, +4, +5, +6>3’ на консенсусната сплайсинг последователност AGgtaagt, която е получена на базата на обширно геномно проучване при примати [Shapiro and Senapathy, 1987]. Консенсусните нуклеотидни честоти в 8-те позиции са представени в Таблица 10 [Shapiro and Senapathy, 1987; Krawczak et al., 1992]. Консенсусните стойности се изчисляват съгласно формулата:

*сумата от скорове на изследвания сплайс-участък - най-малката възможна сума от скорове / най-голямата възможна сума от скорове - най-малката възможна сума от скорове = CV*

Съгласно описаните по-горе калкулации за консенсусните стойности на нормалния донор сплайс участък AAgtaagt в интрон 9 се получава:  $CVN=(5.27-0.46)/(5.95-0.46)=0.876$ , а за мутантния AAgtaggt  $CVM=(4.68-0.46)/(5.95-0.46)=0.769$ . Калкулираните CV стойности позволяват да се оцени ефикасността на сплайсинга при всяка промяна, която настъпва в консенсусната последователност, в сравнение с нормалната последователност. Според получените резултати, мутантната сплайсинг последователност в района c.1608+4A>G има по-ниска ефективност от нормалната, което най-вероятно се отразява на нормалното процесирание на иРНК транскрипта и обуславя патогенния ефект на тази нуклеотидна замяна.

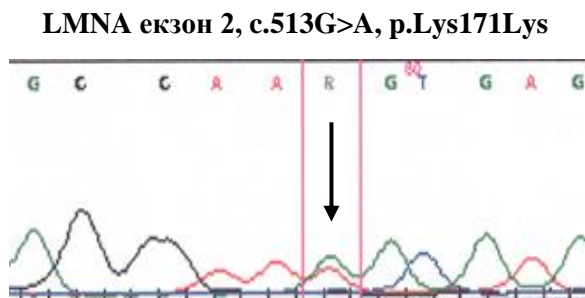
**Таблица 10.** Консенсусни нуклеотидни честоти (скорове) в позиции 5'>-2, -1, +1, +2, +3, +4, +5, +6>3' на донор сплайс участъка [Shapiro and Senapathy, 1987; Krawczak et al., 1992].

Позиция	A	C	G	T
-2	0.58	0.12	0.15	0.15
-1	0.10	0.04	0.78	0.08
+1	0.00	0.00	1.00	0.00
+2	0.00	0.00	0.00	1.00
+3	0.57	0.02	0.39	0.02
+4	0.71	0.08	0.12	0.09
+5	0.05	0.06	0.84	0.05
+6	0.16	0.15	0.22	0.47

Най-голяма възможна сума от скорове:  $0.58+0.78+1.00+1.00+0.57+0.71+0.84+0.47=5.95$

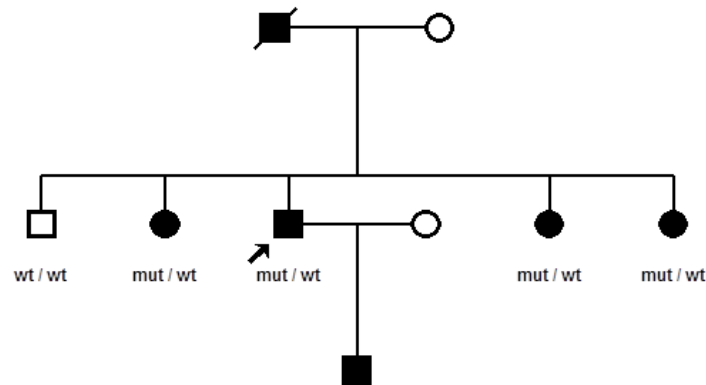
Най-малката възможна сума от скорове:  $0.12+0.04+0.00+0.00+0.02+0.08+0.05+0.15=0.46$

Втората сплайс мутация, която доказахме в *LMNA* гена беше голямо откритие за времето си и отново преобърна тогавашните ни представи за това кои нуклеотидни замени са патогенни и кои се толерират в генома. До тогава синонимните замени, които откривахме в хода на диагностиката на генетичните заболявания бяха пренебрегвани и на тях не се обръщаше особено внимание. Без каквито и да е по-нататъшни изследвания ги приемахме като непатогенни. Такава беше и нашата първоначална реакция, когато открихме синонимната замяна p.Lys171Lys в екзон 2 на *LMNA* гена (Фигура 52).



**Фигура 52.** Секвенционен профил на сплайс-сайт мутацията в екзон 2 на *LMNA* гена.

След като приключихме скрининга на целия *LMNA* ген при този пациент, други замени не бяха открити. Клиниката, обаче отговаряше до голяма степен на LGMD1B с типично доминантно унаследяване в няколко засегнати поколения (Фигура 53).



**Фигура 53.** Родословно дърво на семейството със сплайс-сайт мутация p.Lys171Lys. Индексният пациент е посочен със стрелка; wt – див тип; mut – мутантен алел.

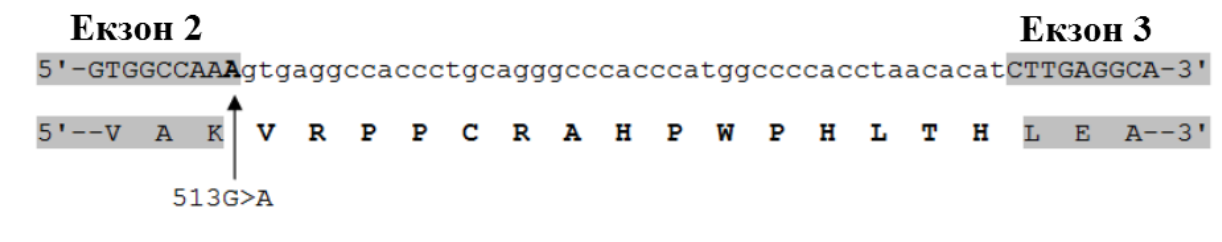
Един от водещите клиницисти по онова време в областта на невромускулните заболявания Hans Lochmueller, Мюнхен, беше категоричен в диагнозата. Тогава се замислих над факта, че нуклеотидната замяна с.513G>А засяга последния нуклеотид от екзон 2, точно 5' от донор сплайс участъка и си зададох въпроса каква е вероятността тази нуклеотидна замяна да се отразява върху нормалното процесирание? Ако това е така, то на пръв поглед синонимната аминокиселинна замяна би могла да се превърне в мутация, нарушаваща сплайсинга. Обсъдих тази идея с тогавашния ми ръководител проф. Mueller-Reible, Wuerzburg и според него това беше много малко вероятно. Тъй като, обаче клиницистите настояваха да се работи още по това немско семейство до изясняване на диагнозата, решихме да си направим труда и да проверим до колкото е възможно тази находка. Първо успяхме да съберем ДНК проби от други засегнати и здрави родственици на индексния пациент (виж родословното дърво на Фигура 53) и се оказа, че нуклеотидната замяна с.513G>А сегрегира със заболяването в семейството. Изненадата от тези първи резултати беше голяма и ни мотивира да продължим да изследваме тази находка на

транскрипционно ниво. Вече споменах, че клиницистите бяха много мотивирани да се изясни диагнозата в това семейство, така че не беше трудно да се вземе нова проба венозна кръв от индексния пациент, от която да изолираме РНК. Дизайнирах нови праймери в екзонните последователности на екзон 2 и екзон 3 от *LMNA* гена [Todorova et al., 2003b]. Изолираната тотална РНК от пациента и тотална РНК от нормална контрола бяха подложени на обратна транскрипция и кДНК синтез, последвани от амплификация с новодизайнираните праймери (RT-PCR, reverse transcription PCR). Получените транскрипти бяха разделени чрез агарозна гел електрофореза (Фигура 54).

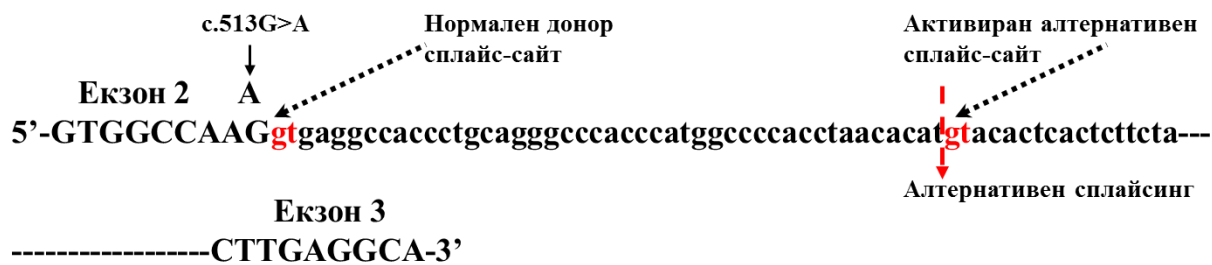


**Фигура 54.** Агарозна гел електрофореза на получените транскрипти (RT-PCR) при пациента спрямо нормална контрола. М – молекулен маркер.

Експериментът показва наличието на два транскрипта при пациента спрямо контролата; единият съвпада с този при контролата, а другият по-тежък с около 50 базови двойки (виж Фигура 54). Нивото на експресия на патологичния транскрипт беше около 25% от тази на нормалния. Двата транскрипта бяха клонирани с помощта на TOPO TA клониращ кит (Invitrogen), за да може всеки един от тях да бъде в последствие секвениран самостоятелно. Получените резултати от секвенционния анализ показаха, че патологичният транскрипт съдържа инсерция от 45 нуклеотида (с.513ins45), което води до инсериране на 15 нови аминокиселини (p.Lys171ins15) в белтъчната молекула (Фигура 55). Всичко това се дължи на подтискане на нормалния донор сплайс участък поради мутантния нуклеотид в позиция 5' на консервативния участък и активирането на алтернативен сплайс участък след 45 нуклеотида от интрон 2 (Фигура 56).



**Фигура 55.** Секвенция на патологичния транскрипт. Участъците от екзони 2 и 3 са представени с главни букви; инсерираните нуклеотиди от интрона са представени с малки букви; позицията на нуклеотидната замяна с.513G>A е посочена със стрелка и мутантният нуклеотид е маркиран болд; новоинсерираните аминокиселини са представени с еднобуквения символ под съответния кодон.



**Фигура 56.** Механизъм на блокиране на нормалния донор сплайс-сайт в интрон 2 на *LMNA* гена и активиране на алтернативен сплайс-сайт 45 нуклеотида след нормалния в посока 3' на интрона (първият gt динуклеотид, който се появява по дължината на интрона след нормалния сплайс-сайт се разпознава като сплайс-сайт и функционира като такъв в хода на процесирването на транскрипта).

Изчислените CVs (виж по-нагоре текста) спрямо калкулациите на Shapiro and Senapathy [1987] и Krawczak et al. [1992] са както следва: за нормалната секвенция AGgtgagg  $CVN=(5.52-0.46)/(5.95-0.46)=0.922$ ; за мутантната секвенция AAGtgagg  $CVM=(4.84-0.46)/(5.95-0.46)=0.798$ ; за активирания алтернативен сплайс участък ATgtacac  $CVA=(3.51-0.46)/(5.95-0.46)=0.556$ . Получените CV стойности показват, че нуклеотидната замяна в позиция -1 на консенсусната сплайсинг секвенция намалява ефективността на нормалната секвенция и в допълнение води до активиране на криптивен сплайс участък, който се разпознава като такъв и води до появата на патологичен транскрипт в приблизително  $\frac{1}{4}$  от случаите.

На базата на получените резултати, на пръв поглед синонимната аминокиселинна замяна p.Lys171Lys, беше доказана като патогенна нуклеотидна замяна нарушаваща сплайсинга и водеща до нарушаване на белтъчната структура. Резултатите бяха публикувани в Journal of Medical Genetics [Todorova et al., 2003b] и оттогава синонимните замени, които откриване в нашата ежедневна диагностична практика се интерпретират с повишено внимание.

### **Генотип-фенотипни корелации**

Клиничната симптоматика при всички наши пациенти включваше невромускулни проблеми в комбинация със сърдечен дискомфорт или сърдечно заболяване. При някои пациенти мускулните проблеми бяха водеща клинична характеристика, докато при други сърдечната проводна система беше преимуществено засегната. При един от случаите сърдечната аритмия предшестваще мускулната слабост, както беше докладвано и от други автори [Charniot et al., 2003]. Това е именно пациентът със стоп-кодон мутация p.Glu105\*, която води до бърза прогресия и тежък фенотип с преимуществено сърдечно засягане.

Според нашите резултати възрастта на поява на първите симптоми не може да се смята за надежден клиничен критерий при поставяне на диагноза EDMD/LGMD1B, тъй като варира в много широки граници. В нашата група имаше случаи с изключително ранно начало на 1 и 3 годишна възраст (2 български случая), такива с начало в тинейджърска възраст (6 пациента) и такива с късно начало 28-35 години (4 пациента).

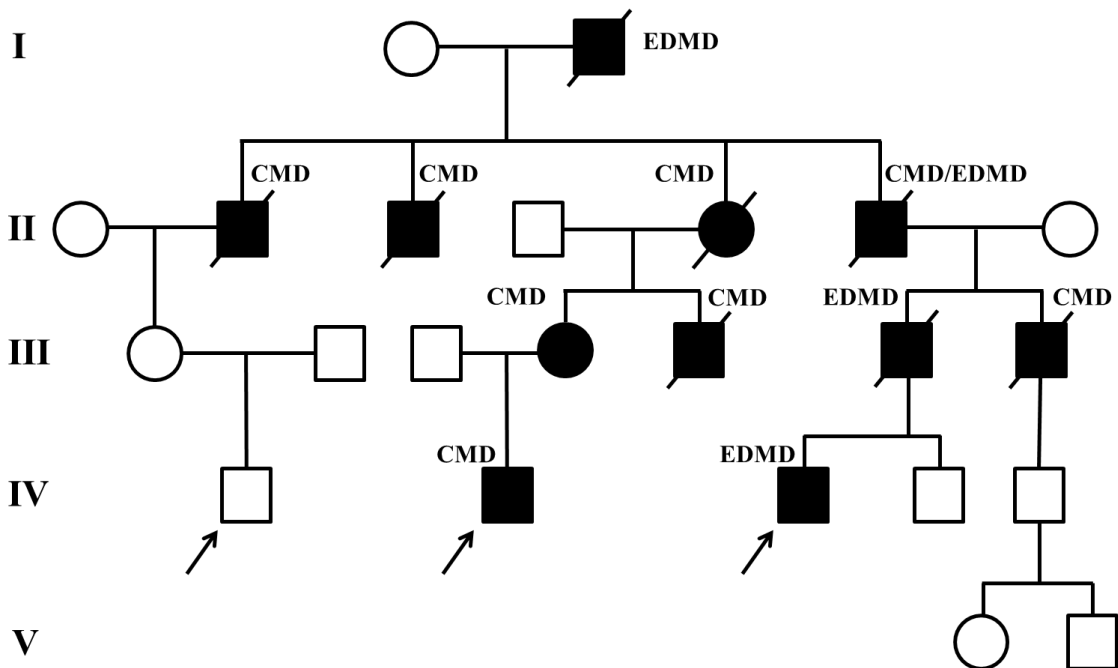
Нивата на креатинфосфокиназата също не можеха да се използват като надежден диагностичен белег, тъй като варираха в много широки граници от нормални стойности, през гранични и леко завишени до многократно завишени стойности.

Наличието на контрактури също не е постоянна клинична характеристика на невромускулните ламинопатии.

От друга страна, сърдечното засягане изглежда доста типично протичащо при нашите пациенти, проявяващо се с аритмия и проводни нарушения, 1-ва степет AV блок. Пет от случаите в хода на прогресията на сърдечната проблематика се нуждаеха от имплантиране на pacemaker и/или дефибрилатор.

В нашата група не беше наблюдавана ясна корелация между тежестта на фенотипната изява и типа и/или локализация на мутацията. При двама неродствени пациента от немски произход открихме една и съща мутация p.Thr528Lys, като клиничната симптоматика беше доста различна. Единият от тези пациенти е жена с тежко засягане, ранно начало и бърза прогресия, докато другият е мъж с по-лек клинична симптоматика и по-късно начало след 25 годишна възраст. Освен това, четирите мутации в екзон 6 (p.Leu356Arg, p.Glu358Lys, p.Arg377His и p.Gly382Arg) водят до съществени разлики във възрастта на поява на първите симптоми респективно: начало на 12 годишна възраст, на 1 г. възраст (конгенитална мускулна дистрофия) и късно начало през третата декада от живота в останалите два случая. Мутациите нарушаващи сплайсинга в интрони 2 и 9 водят съответно до ранно и късно начало на 14 и 28 години.

В допълнение, беше наблюдавана широкоспектърна вариабилност в клиничната симптоматика в рамките на едно семейство. Тази вариабилност беше особено силно изразена при две български семейства. Индексният пациент в семейството с мутация p.Asn195Asp беше сравнително тежко засегнат с начало на заболяването на 16 годишна възраст. Неговата дъщеря, носителка на мутацията, на 17 годишна възраст вече проявяваше тежка мускулна слабост, докато братът на индексния пациент, също носител на мутацията, на 30 годишна възраст не проявяваше никакви симптоми на заболяването. Второто българско семейство с мутация в екзон 6 p.Arg377His представляваше голямо родословие с 4 поколения засегнати индивиди, поне 10 болни (Фигура 57). При снемане на родословната информация направи впечатление, че заболяването във фамилията започва като ЕДМД с водещо невромускулно засягане, след което се предава в един от клоновете като ЕДМД с кардиомиопатия, а в останалите три засегнати клона като чисто сърдечно засягане, дилатативна кардиомиопатия. Същата клинична изява се предава по-надолу при родствениците на всеки един от засегнатите клонове, като в клона със смесено сърдечно и невромускулно засягане в трето поколение при двама братя се установява отново разделяне на симптоматиката на чисто сърдечна и чисто невромускулна (Фигура 57). В това родословие една и съща мутация води до сравнително късно начало след 35 годишна възраст при всички засегнати индивиди, но се проявява с различна клинична симптоматика: само сърдечно засягане или сърдечно с невромускулно засягане в рамките на една фамилия.



**Фигура 57.** Родословно дърво на българско семейство с ЕДМД/дилатативна кардиомиопатия. Поколенията са посочени в ляво с римски цифри. Индексните пациенти са посочени със стрелки. Наблюдава се вътрефамилна клинична вариабилност от чиста форма на дилатативна кардиомиопатия (CMD, cardiomyopathy dilated), през смесен тип невромускулно/сърдечно засягане (CMD/EDMD) до чисто невромускулно засягане (EDMD, Emery-Dreifuss muscular dystrophy).

Наблюдаваните значителни вътрефамилни и междуфамилни разлики във фенотипната изява на заболяването навеждаха на мисълта за наличието на модифициращи гени [Vonne et al., 2000] или наличието на полиморфизми в *LMNA* гена и регулаторните последователности, които биха могли да повлияят фенотипната експресия на дадена мутация. Тринадесет години по-късно, наблюдаваните фенотипни различия все още чакат своето логично обяснение.

Двете български деца с конгенитална форма мускулна дистрофия също представляват интерес от гледна точка на генотип – фенотипните интерпретации. И двете мутации са нововъзникнали при индексните пациенти. Едната попада в екзон 4 (rod domain coil 1) p.Arg249Trp, а другата в горещия екзон 6 за missense мутации (rod domain coil 2) p.Glu358Lys. И при двете деца се наблюдава изключително тежка клинична симптоматика с начало в ранна детска възраст, тежко невромускулно засягане и невъзможност за самостоятелно ходене. Мутации в същите тези региони и позиции много близки до засегнатите при тези две деца, са свързани с доста по-лек ход на заболяването с късно

начало и бавна прогресия, както в нашата извадка, така и публикувани в световната литература. Понастоящем, тези две мутации са докладвани и при други пациенти с конгенитална мускулна дистрофия или миопатия с ранно начало, много бърза прогресия и тежко сърдечно засягане водещо до ранна смърт около средата на третата декада [www.dmd.nl/LMNA]. Не е възможно да се предположи защо този тип missense мутации причиняват толкова тежка клиника с ранно начало при положение, че невромускулните ламинопатии са като цяло заболявания с късно начало.

Фактът, че част от пациентите с предполагаема клинична диагноза ламинопатия остават с неясен молекулен дефект след пълното скриниране на *LMNA* гена, води до предположението, че мутации могат да съществуват в интронните или регулаторни последователности на гена или синонимни замени и други полиморфни варианти да са неправилно интерпретирани като непатогенни, както можеше да се случи в представения по-горе казус [Todorova et al., 2003b]. Възможно е също така мутации в друг все още неизвестен ген(и) да водят до сходен, припокриващ се фенотип.

Тук не разглеждам фенотипната вариабилност при другите форми ламинопатии: сърдечни заболявания, периферни невропатии, липодистрофии, прогероидни синдроми, мандибулоакрална дисплазия, рестриктивна дермопатия и др. [www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM], които не са обект на настоящия труд, тъй като не сме изследвали такива пациенти. Ако обаче погледнем тези групи заболявания с коренно различна симптоматика, но дължащи се на мутации в един и същи ген, се забелязват доста интересни и необясними находки. Докладвани са случаи на една и съща мутация, водеща до коренно различна симптоматика [www.dmd.nl/LMNA]. Мутациите, причиняващи липодистрофия първоначално изглеждаха разположени в кластер, екзони 7, 8, 9 и 11 от С-терминалния глобуларен домен [Speckman et al., 2000], но в следствие бяха открити и случаи, причинени от мутации в *coil 1a*, където попадат основно мутации с невромускулна и сърдечна симптоматика. Интересно е да се отбележи, че мутации причиняващи прогерия и мандибулоакрална дисплазия имат почти същата локализация като тези причиняващи липодистрофия, в С-терминалния глобуларен домен. От друга страна, мутациите причиняващи кардиомиопатия и невромускулно засягане са разпръснати по дължината на целия ген. Открита беше и друга синонимна замяна в този ген, която активира алтернативен сплайс участък *p.Gly608Gly*, но тя се асоциира с прогерия [Eriksson et al., 2003].

## Модели на мутагенеза в дадена позиция по дължината на *LMNA* гена

От биологическа гледна точка missense мутациите са най-информативните молекулни находки като обект за изследване механизмите на мутагенеза в човешкия геном. Изобилието от такъв тип мутации в *LMNA* гена го прави перфектен модел за такъв тип проучвания, много по-добър от *DMD* гена, където основно се срещат nonsense замени. Nonsense мутациите представляват ограничен тип нуклеотидни замени, които водят до трите стоп кодона, а това от своя страна води до отклонение в интерпретацията на резултатите. Този проблем се елиминира при missense мутациите, които представляват неограничен тип нуклеотидни замени.

Докладваната честота на транзиции и трансверзии в човешкия геном показва, че транзициите са много по-чести от трансверзиите [Cooper and Krawczak, 1990]. Възможно обяснение е изобилието от C>T транзиции, които водят до стоп кодон мутации, асоциирани със заболявания при повечето гени. Освен това голям процент транзиции се генерират посредством деаминиране в метилирани CpG острови (methylation-mediated deamination) [Cooper and Krawczak, 1990]. Моето предположение беше, че транзициите са по-често срещани от трансверзиите поради това, че замяна с еднотипни химически структури (пурин с пурин или пиримидин с пиримидин) се открива и елиминира по-трудно от поправящите системи, докато инкорпорирането на различна по структура химическа база остава по-рядко незабелязано и фиксирано в генома [Todorova and Danieli, 1997].

За *LMNA* гена обаче, това правило за по-висок процент транзиции от трансверзии не е в сила. По мои данни от 2006 г. честотата на транзициите е ~47%, а на трансверзиите ~53% [Todorova et al., 2006]. Това е така именно поради малкия брой nonsense и преобладаващите missense мутации в този ген. Като се има предвид високият процент транзиции в този ген, засягащи CpG острови (~67%), трансверзиите в *LMNA* гена са още по-внушителна група. Въпреки всичко това, има случаи в които един и същи нуклеотид може да бъде заменен с химически идентичен на него (транзиция) и с химически различен (трансверзия). Куриозен пример е кодон 528 от *LMNA* гена, при който централният С нуклеотид е откриван заменен от всеки един от останалите три нуклеотида в различни мутационни събития [www.dmd.nl/LMNA].

Ако се разгледа мутабилността на динуклеотидно ниво се получава следният ред: CG>GC>GG>AC=CA>TC=CC=GA=AT=AA>GT [Todorova et al., 2006]. Както се очакваше

CG динуклеотидът беше най-често засегнат [Cooper and Krawczak, 1990]. Интересно е да се отбележи, че някои динуклеотидни комбинации като AG, TG, TT, CT и TA, които представляват 31% от възможните комбинации, не бяха открити в мутационни събития [Todorova et al., 2006].

Във висок процент от случаите (~44%) новоинкорпорираният нуклеотид е идентичен на 5' или 3' фланкиращ нуклеотид(и). Тези случаи могат да се обяснят с модела за неправилно сдвояване по време на ДНК репликацията [Kunkel and Alexander, 1986].

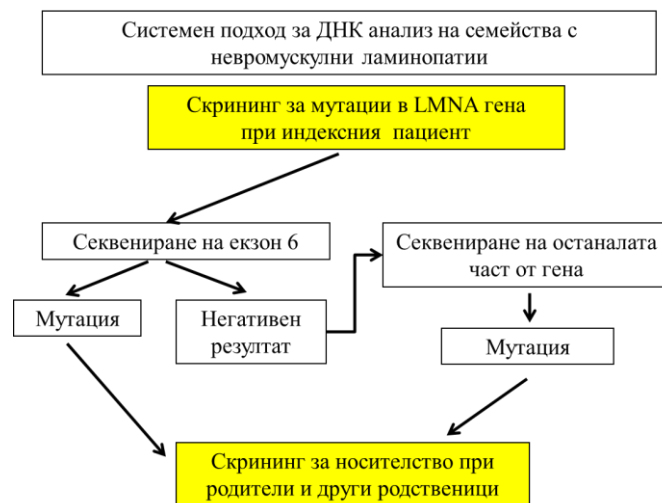
Очевидно няма единен механизъм на мутагенеза, който да бъде приложим при всички мутационни събития. По-скоро повечето случаи биха могли да се обяснят с няколко различни модели на мутагенеза. Когато се разглежда мутабилността в конкретна гена позиция, водеща роля изглежда че има околната секвенция и нейната архитектура. Присъствието на повторени мотиви, които най-вероятно участват във формирането на вторични структури, играе ролята на движеща сила в мутагенезата. Анализът на мутациите в *LMNA* гена също показва, че в околната секвенция на всяко едно мутационно събитие се откриват директни повтори, палиндромии и симетрични елементи [Todorova et al., 2006].

Интересна находка в нашите проучвания по онова време беше получена при анализирането на мутантните триплети с по един допълнителен нуклеотид в позиция 5' и 3' от триплета (общо 5 нуклеотида). Оформиха се две секвенционни групи, които преимуществено мутират: (1) CG – богата група, която включва аргининовите кодони CGC и CGG и (2) (C/G)A(A/T)CA група [Todorova et al., 2006]. Важно е да се отбележи, че 53% от missense мутациите, които анализирахме по онова време заменяха аминокиселината аргинин. От 6-те кодона в човешкия геном, които определят аминокиселината аргинин само CGC и CGG (в един случай CGT) участват в мутационни събития в *LMNA* гена, като всички случаи влизат в състава на CG – богата пентануклеотидна последователност [Todorova et al., 2006]. Възможно е тези нуклеотидни сегменти да участват във формирането на специфични вторични структури, които имат отношение към мутагенезата.

### **3.3.5. Обобщение на получените резултати и заключителни бележки**

За изминалите 13 години (2002-2015) бяха верифицирани на молекулно ниво 41% от немските пациенти и 71% от българските пациенти, насочени с предполагаема клинична

диагноза EDMD/LGMD1B или конгенитална мускулна дистрофия. Откритите от нас мутации в *LMNA* гена, както и публикуваните в литературата при невромускулни ламинопатии са разпръснати по цялата дължина на *LMNA* гена. Рядко се случва при неродствени пациенти да се открива една и съща мутация, повечето мутации са уникални за отделните пациенти. За нашата сравнително малка извадка от 12 генетично верифицирани пациента с мутации в *LMNA* гена, екзон 6 се оформя като мутационна гореща точка: 2 мутации при български пациенти и 2 при немски пациенти попадат в този екзон, като това представляват 33% от мутациите в нашата група. Поради този факт, системният подход за молекулярно генетична диагностика на ламинопатии включва секвениране на екзон 6 като първа стъпка, последвано от цялостно секвениране на *LMNA* гена при всеки конкретен пациент (Фигура 58). За момента не се налага използването на други диагностични методики, тъй като всички известни мутации в този ген се откриват със секвенционен анализ.



**Фигура 58.** Системен подход за ДНК анализ на семейства с невромускулни ламинопатии.

Повечето мутации, които открихме в *LMNA* гена бяха нови за времето си, непубликувани преди нас, което обогати световната база данни. Не беше установена ясна връзка между откритите мутации и фенотипната изява на заболяването. Бяха наблюдавани съществени вариации в клиничното протичане на заболяването при различните пациенти, както и в рамките на едно семейство.

Нашите резултати от изследване механизмите на мутагенеза в *LMNA* гена имат принос в изясняване ролята на околната секвенция и ДНК архитектура за възникване на мутации в конкретна позиция от човешкия геном.

Най-важният урок в ежедневната ни диагностична практика остава интерпретирането на резултатите от генетичните изследвания. Всеки конкретен резултат, колкото и убедително да изглежда на пръв поглед като патогенен или непатогенен трябва да се интерпретира с повишено внимание.

#### **4. НЕВРОЛОГИЧНИ И НЕВРОДЕГЕНЕРАТИВНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ С ИНТЕЛЕКТУАЛЕН ДЕФИЦИТ**

Клиничните и молекулни основи на неврологични синдроми с интелектуален дефицит при български пациенти са описани от Todorov, Todorova et al., [2010a; b; Тодоров, 2011, докторска дисертация]. В тази група попадат синдром на чуплива X хромозома при момчета и Rett синдром при момичета.

##### **4.1. СИНДРОМ НА ЧУПЛИВА X ХРОМОЗОМА (FRAGILE X SYNDROME, FXS)**

От дълго време се смята, че генни дефекти, свързани с X хромозомата са отговорни за умствено изоставане, имайки предвид по-високата честота на изоставане в умственото развитие при момчета, отколкото при момичета [Penrose, 1938; Lehrke, 1972]. Задълбочени клинични и генетични проучвания показаха, че X-свързаното умствено изоставане е изключително хетерогенна група заболявания. В редица случаи, въпреки множеството изследвания и лабораторни тестове, етиологията на заболяването остава неизяснена, което оставя семейството без прецизно генетично консултиране и информиран репродуктивен избор с помощта например на пренатална диагностика.

Синдромът на „чуплива“ X-хромозома, синдром на Martin-Bell (Fragile X syndrome, FXS, Martin-Bell syndrome, OMIM#300624) е втората най-честа причина за умствена изостаналост след синдром на Даун [Rousseau, et al., 1995]. Средната честота на заболяването е 1:3600 мъже [Turner et al., 1996]., а при жени-изявени носителки 1:4000-6000 [Crawford et al., 2002].

#### **4.1.1. Клинично описание и лабораторни изследвания**

Заболяването се характеризира с тежка до средна степен умствено изоставане (IQ 20-49%), сериозни говорни нарушения, когнитивни проблеми и дефицит на внимание. Наблюдават се следните поведенчески отклонения: атипично аутистично поведение, с редуващи се безпокойство и безпричинно еуфорично поведение, хиперактивност и агресивност [Mattei et al., 1981].

Дисморфичните изменения обикновено се появяват в детството. Моторно-двигателното развитие често е забавено или нарушено [Mattei et al., 1981]. Съобщава се за по-късно контролиране на главата, самостоятелно сядане, прохождение (след 1г и 6м възраст). Мускулна хипотония и хипертрофия на прасците са наблюдавани при някои пациенти.

Описани са случаи на несъразмерно дълги ръце и стъпала, плоскостъпие, често коригирано чрез ортопедични операции, макроорхидизъм, който става видим след настъпване на пубертета [Lubs, 1969].

По отношение на формата на главата при редица пациенти се наблюдава макроцефалия, в някои случаи в комбинация с долихоцефалия. Лицевият дисморфизъм е широко застъпен в тази група пациенти. Наблюдават се асиметрични лицеви характеристики, удължено лице, широко чело, хипоплазия на средната част на лицето, голяма уста с плътни устни, високо небце, голяма ъгловата челюст, прогнатизъм, неправилни зъби и ниско поставени големи диспластични ушни миди.

При някои пациенти с FXS се наблюдават патологични изменения на **съединителната тъкан**, като хипермобилност на ставите на пръстите и нестабилност на други стави [Opitz et al., 1984; Hagerman et al., 1984a]. В сравнително малък процент от случаите се наблюдава сколиоза [Davids et al., 1990].

**Засягането на сърцето** е рядко; при някои пациенти са докладвани пролапс на митралната клапа [Pueritz et al., 1982] и слаба дилатация на асцендираща аорта [Hagerman and Synhorst, 1984b].

**Периорбитална хиперпигментация и хиперпигментация на скротума** са наблюдавани по време на пубертета [Fryns, 1993 лични наблюдения, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>].

#### **Церебеларни нарушения**

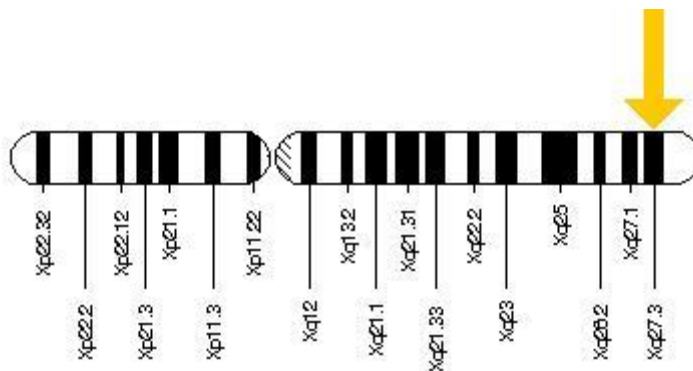
Около 20% от момчетата с FXS имат гърчови епизоди. Reiss и сътр. [1991a] докладват увеличен обем на хипокампуса при пациенти с FXS в сравнение с нормални

контроли. В друго проучване Reiss и сътр. [1991b] установяват, че момчета с FXS имат значително намален размер на задния церебеларен вермис и увеличен размер на четвъртия вентрикул в сравнение с контролни групи, съответстващи по възраст. В редки случаи се наблюдава тежък дефицит в подвижността на очния клепач, което се свързва с проблеми в церебеларния моторен контрол [Koeckkoek et al., 2005].

**Жените, изявиени носителки**, обикновено са по-леко засегнати в сравнение с мъжете, тъй като само една от двете X-хромозоми е засегната. Обикновено стойностите на IQ са около 84. Наблюдават се трудности в обучението, говора и проблеми със съсредоточаването. Могат да са на лице и някои от характеристиките на типичния фациес, например големи ушни миди.

#### 4.1.2. Молекулни основи

Синдромът на чуплива X хромозома се дължи на мутации в *FMR1* (Fragile X Mental Retardation-1 gene, OMIM\*309550) гена, локализиран на X хромозомата, Xq27.3 (Фигура 59).



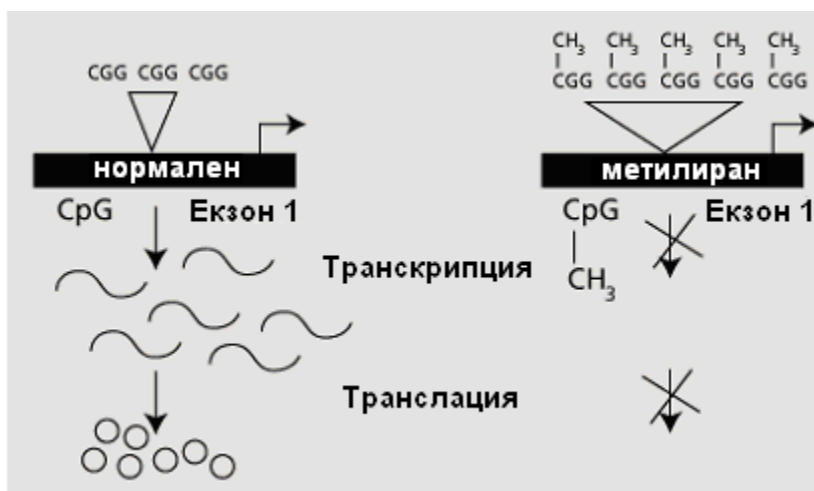
**Фигура 59.** Локализация на гена *FMR1* на X-хромозомата в региона Xq27.3 [<http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/FMR1.jpeg>]

Картирането на гена става след установяване на скаченост между фактор IX локуса (F9; OMIM\*300746), локализиран в Xq27 региона [Camerino et al., 1983], както и доказването, че глюкозо-6-фосфат дехидрогеназния локус (G6PD, OMIM\*305900) е дистално разположен спрямо лакуса на „чуплива“ X в региона Xq27.3 [Szabo et al., 1984]. В последствие Richards и сътр. [1991] използват микросателитни маркери за позициониране на локуса на „чуплива“ X хромозома 3.7 cM дистално от DXS297 и 1.2 cM проксимално от DXS296. Същите автори откриват два полиморфни микросателитни AC повтора FRAXAC1

и FRAХАС2, физически локализиран в рамките на 10 кб от двете страни на (ССG)n повторения регион, отговорен за синдрома на „чуплива“ X хромозома.

Генът *FMR1* има 17 екзона и покрива 39131 бази от човешкия геном [http://genome.ucsc.edu].

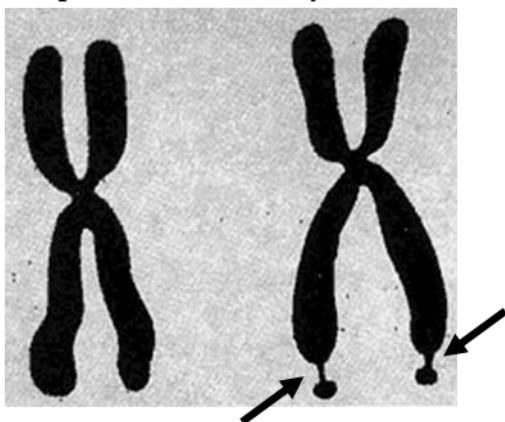
**Мутации:** Най-честият генетичен дефект е експанзия на полиморфен СGG повтор в 5' нетранслируемия регион на гена [Pieretti et al., 1991; Verkerk et al., 1991]. Тази мутация е причина за заболяването при повече от 95% от случаите. Полиморфният СGG регион е нестабилен и може да експандира във всяко следващо поколение. Метилирането на цитозина в тринуклеотида СGG и в CpG островите намиращи се в 5'-нетранслируемия район на гена води до хиперметилиране в промоторната област на гена и до неговото заглушаване (инактивиране) – подтиска се транскрипцията на гена и транслацията в белтък [Devys et al., 1993] (Фигура 60).



**Фигура 60.** Модел на инактивиране на *FMR1* гена чрез подтискане транскрипцията и транслацията на белтъчния продукт.

Името на синдрома “чуплива” X идва от факта, че хиперметилирането и експанзията в съответния генен локус причиняват реконструкции в дългото рамо на X-хромозомата, което става “чупливо” и това събитие може да се наблюдава микроскопски при стандартен цитогенетичен анализ (Фигура 61).

Нормална X      Чуплива X



**Фигура 61.** Схема на чуплива X хромозома в сравнение с нормална X хромозома <http://zorknot.com/tag/fragile-x/>.

Нормално при здрави индивиди броят на CGG-повторите варира от 6 до 55. При повечето засегнати болни, CGG-повторът експандира над 200 копия и експанзията се означава като пълна мутация. Индивиди с т.нар премутация (броят на CGG-повторите варира от 55 до 200) са клинично здрави, но премутацията става нестабилна и може да експандира при предаването ѝ в следващото поколение. Когато броят на повторите е 46-60 копия, се говори за междинна сива зона [Sherman, 2002; Nolin et al., 2003].

Такъв тип мутации, дължащи се на експандиране на три- или тетрануклеотидни повтори се наричат „динамични мутации”. Тези мутации не се дължат на единично генетично събитие, а по-скоро възникват в резултат на няколко последователни стъпки. Първата стъпка води до появата на нестабилен алел, който в следващи стъпки нараства като брой копия или рядко намалява (контрахира) [Arocena et al., 2000]. Добре известно е, че около 40% от засегнатите момчета представляват мозайки от метилирана пълна мутация и неметирана премутация [Nolin et al., 1994]. Много по-редки са известните случаи на мозаицизъм по отношение на пълна мутация и делеция; както и пълна мутация и нормален алел [Nolin et al., 1994; van der Ouweland et al., 1994; Mingroni-Netto et al., 1996; Grasso et al., 1999; Schmucker and Seidel, 1999; Arocena et al., 2000]. Известен е и случай на реверсия на майчина премутация до нормален по размер алел в нейния незасегнат син [Tabolacci et al., 2007]. Възможно е честотата на тези реверсии на „динамични мутации” до нормален по размер алел да е значително по-висока от наблюдаваната, просто тези случаи остават неизвестни, тъй като не стигат до генетично диагностициране.

Установено е, че унаследяването на тринуклеотидния повтор е по-нестабилно по мъжка линия, отколкото по женска по отношение на междинните копия. Обратно на това наблюдение, премутационните алели по бащина линия са по-стабилни, отколкото по

майчина [Sullivan et al., 2002]. Тази разлика, която зависи от размера на повтора, предполага селекция срещу сперматозоиди, носещи голям размер CGG повтор [Sullivan et al., 2002]. Жени, носителки на пълна мутация, ако предадат този алел на синовете си, то те ще носят пълна мутация. Жени, носителки на премутантен алел, ако предадат този алел на синовете си, то те ще бъдат мозайки от пълна мутация/премутация или пълна мутация/нормален алел [Schmucker and Seidel, 1999].

Доказани са единични случаи на **делеции и точкови мутации** в *FMRI* гена, които клинично се припокриват с FXS случаите, дължащи се на CGG експанзия [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=309550].

Генът *FMRI* кодира синтезата на важен **РНК-свързващ белтък наречен FMRP** (Fragile X Mental Retardation Protein). Нормално този белтък се синтезира в много тъкани и най-вече в мозъка и тестисите. Все още функцията на този белтък не е напълно изяснена, но вероятно има връзка с развиването на синаптичните връзки между невроните в мозъка и осъществяването на клетъчните контакти. Счита се, че функцията на FMRP е да свързва и улеснява транслацията на набор от есенциални невронални РНК молекули. Той действа като совалка, като изнася иРНК молекули от ядрото към цитоплазмата, където се извършва белтъчната синтеза [Jin and Warren, 2000]. Болестният фенотип възниква при спиране производството на белтъка FMRP, в следствие на което тези есенциални РНКи не се транслират в белтъци.

#### **4.1.3. Собствени резултати**

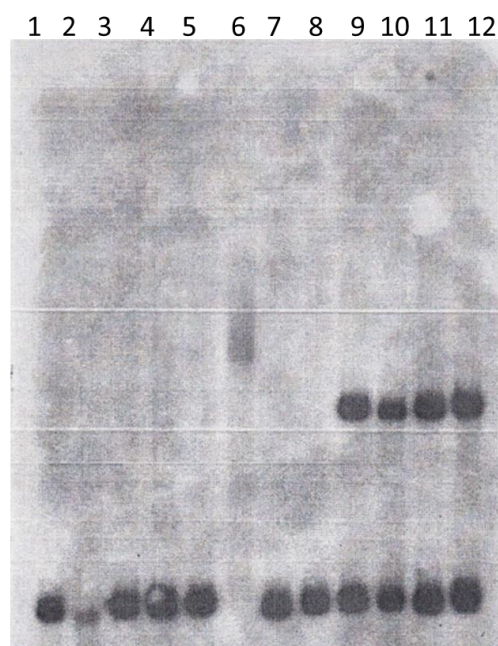
Опити за генетична диагностика на синдром на чуплива X хромозома в България са налични още през 90-те години, когато цитогенетиката е в своя разцвет като метод за диагностика. Поради методичните ограничения на стандартната цитогенетика само много големи експанзии на CGG повтора могат да бъдат детектирани. Поради това и броят на верифицираните случаи FXS на молекулно ниво е бил изключително нисък. С тази техника не е възможно откриването на премутации, както и доказването на мозаечен генотип. Поради това този подход вече не се счита за надежден при диагностика на FXS. Само при двама от пациентите, които бяха обект на скриниране за експанзии в *FMRI* гена имаше данни за патологичен кариотип 46, fra(X)(q27.3)Y[18]/46, XY[22] [Доц. Л. Ангелова, МБАЛ „Св. Марина“ гр. Варна, 1994, дисертационен труд].

Първите опити за диагностика на FXS чрез анализ на експанзията в *FMRI* гена започнах в колаборация с екипа на проф. Jurgen Horst, University of Muenster, Germany.

Първите български пациенти бяха изследвани в Германия през 2003-2004 година посредством Southern blot и последваща хибридизация с радиоактивно маркирана с  $P^{32}$  сонда, златен стандарт в диагностиката на експанзии по онова време. В хода на този анализ се използваха две рестриктази, разпознаващи метилирана (EagI) и неметилирана (EcoRI) ДНК [Rousseau et al., 1991]. Предимство на Southern blot анализа беше много прецизното визуализиране на пълния набор CGG повторени фрагменти от нормална големина на повтора, през малки и големи премутации до пълни мутации. Чрез тази техника за анализ можеха да се интерпретират метилирани и неметилирани фрагменти. Методът позволяваше детекция на мозаечен генотип.

Тази техника обаче, страдаше от съществени недостатъци: изпълнението на хибридизация по Southern беше трудоемка и дълга във времето процедура, която изискваше работа с изотоп. Техниката беше невъзможна за приложение в България, тъй като ние вече не разполагахме с възможност за изотопна работа. Освен това, този метод не даваше възможност за точно определяне на броя CGG повтори, определянето беше приблизително в широк диапазон. Успехът на този вид анализ изискваше голямо количество геномна ДНК, което го правеше трудно приложим за пренатална диагностика.

След описаните по-горе методични трудности, нашето разочарование беше огромно, когато сред изследваната група от 16 български пациента не открихме нито една експанзия (Фигура 62).



**Фигура 62.** Радиоактивен Southern блот и последваща хибридизация с CGG сонда. Проби 1-8 мъже; проби 9-12 жени; проба 6 – FXS пациент с пълна мутация.

Поради техническите трудности при изпълнение и приложение на Southern blot анализа за диагностични цели, усилията на изследователите бяха насочени към разработване на PCR техники за амплификация и визуализиране на експанзията [Brown et al., 1996; O'Connell et al., 2002; Rosales-Reynoso et al., 2007; Yim et al., 2008]. Визуализацията и интерпретацията на намножения продукт обаче, изискваше разделяне в акриламиден гел и последваща хибридизация със специфична сонда (CGG)<sub>5</sub>. Тази методика изискваше маркиране на сондата с дигоксигенин (DIG-labeling) и последваща DIG детекция с антитяло (DIG DNA Labeling and Detection kit, Roche Diagnostics) (Фигура 63). Тази методика работеше добре в нашата лаборатория, но китовете за DIG-labeling и детекция ускъпяваха много анализа. Затова методиката просъществува кратко време като рутинно изпълняван диагностичен тест за FXS.



**Фигура 63.** Southern блот и последваща хибридизация с (CGG)<sub>5</sub> DIG-белязана сонда. Проба 1 мъж; проба 2 жена.

Правени са опити и за провеждането на специфичен по отношение на метилирането PCR, използвайки като матрица бисулфитно третирана геномна ДНК, за прецизно разграничаване на нормален алел, премутация и пълна мутация [Zhou et al., 2004]. Този метод не се оказва много успешен и не намери широко приложение за диагностични цели у нас.

Големи надежди се възлагаха на изпълнението на PCR в присъствие на бетаин в две реакции: първа реакция амплифицираща нормалните фрагменти (short PCR) и втора

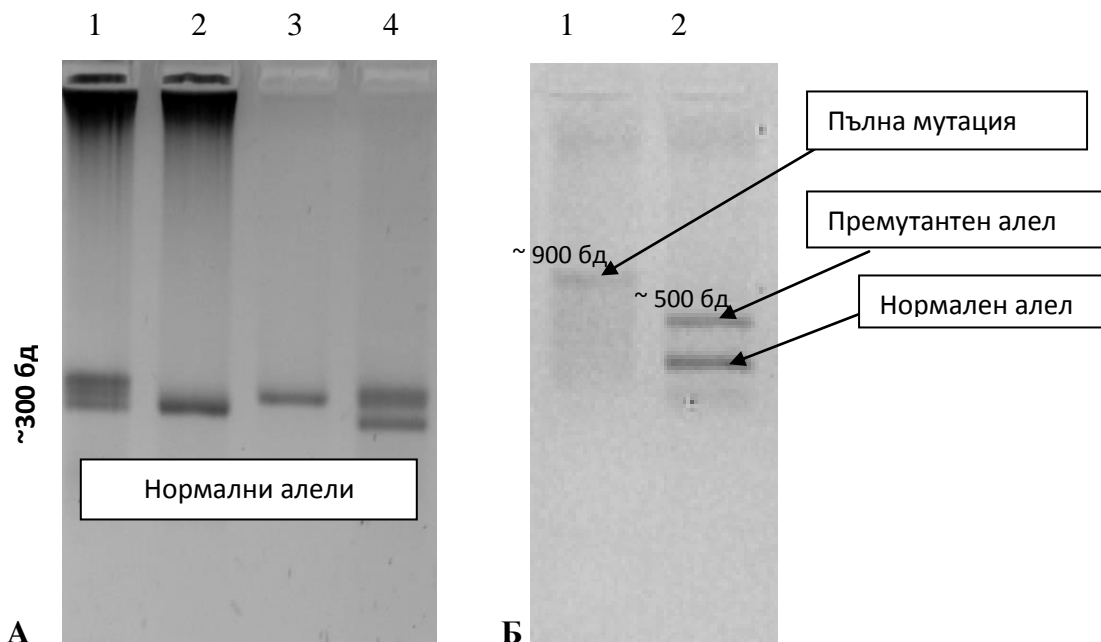
реакция с участието на „химерен“ CGG праймер за размножаване на експанзията (TP-PCR, triple-primed PCR) [Tassone et al., 2008]. Този метод позволява бързо изпълнение на анализа и детекция чрез агарозна електрофореза и оцветяване с етидиев бромид, което го прави удобен за скрининг. TP-PCR-ът обаче не се оказва много удачен за диагностицирането на премутантните алели и пълните мутации, поради което не намери широко приложение в диагностиката както у нас, така и в световен мащаб.

Оказа се възможно да се извърши PCR с флуоресцентно белязани праймери и последваща детекция на амплификационните продукти на автоматичен секвенатор [Khaniani et al., 2008; Yim et al., 2008]. Този метод много бързо се наложи като най-удачен за диагностика, тъй като позволяваше максимално прецизно определяне на броя CGG повтори в зоната на нормата с отклонение  $\pm 1$ . Премутантни алели също можеха успешно да се амплифицират и визуализират с тази техника. За изясняване размера на големи премутантни алел и пълна мутация се налага комбиниране на този PCR с друг вид анализ при всеки конкретен пациент.

За нашите условия флуоресцентната амплификация и детекция на CGG повтора на автоматичен секвенатор се оказва най-удачната техника за молекулярно-генетична диагностика на FXS. Поради CG съставът на интересуваният ни за анализ генен регион, неговото амплифициране чрез стандартен PCR протокол е невъзможно. Затова ние разработихме и оптимизирахме за рутинно диагностично изпълнение PCR протокол с висока концентрация на бетаин (модификация на протокола на Tassone et al., [2008]). Тази новаторска разработка на нашия екип беше публикувана в *Molecular Biotechnology* [Todorov et al., 2010c]. Бетаинът подобрява амплификацията на GC-богати ДНК секвенции, тъй като намалява формирането на вторични структури в този регион. Ако прицелната GC-богата ДНК последователност е много дълга (както в нашия случай), формирането на такива вторични структури (hairpin loops) е много често събитие, което прави матрицата недостъпна за действието на полимеразата в хода на амплификационната реакция. Експериментално беше установено, че добавянето на бетаин във вид на монохидрат (Sigma) не пречи на действието на ДНК полимеразата, както и на специфичността и акуратността на PCR реакцията [Henke et al., 1997]. Освен това с увеличаване концентрацията на бетаин се увеличава и интензивността на получения амплификационен продукт [Henke et al., 1997].

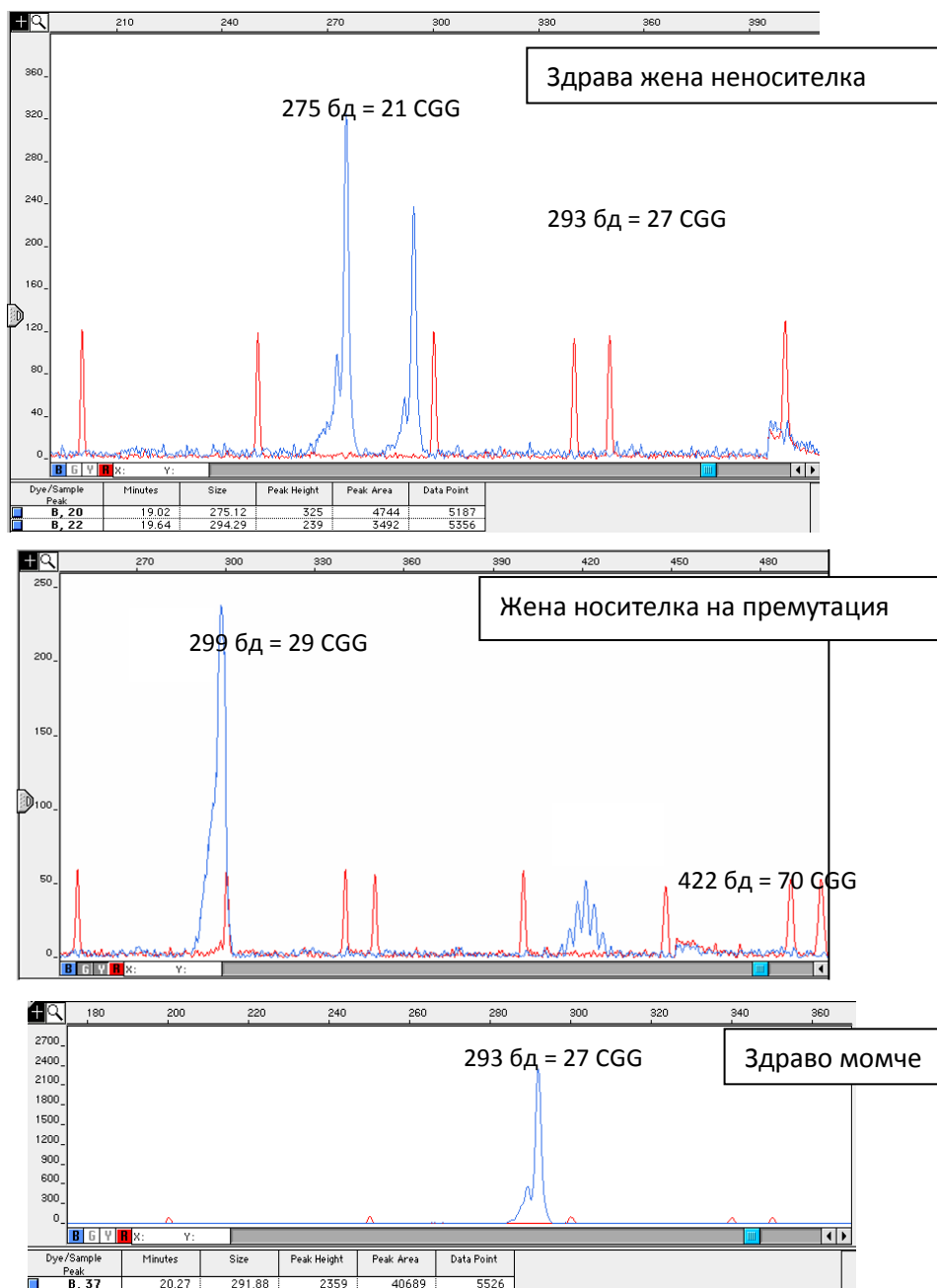
Резултатите от тази амплификация в присъствие на висока концентрация бетаин (2.5M) се визуализират чрез агарозна електрофореза и последваща детекция с етидиев

бромид. На този етап се оценява дали амплификацията е била успешна и грубо може да се прецени размерът на получените амплификационни продукти (Фигура 64).



**Фигура 64.** Електрофоретични профили на PCR продукти на CGG повтора в *FMR1* гена: (А) Здрави жени неносителки - 1; 4; здрави момчета - 2; 3 и (Б) болно момче – 1; жена носителка на премутация - 2. Дължината на фрагментите е определена спрямо молекулен стандарт с известни размери на фрагментите, който не е представен на фигурата.

В следствие за по-точно оразмеряване на получените фрагменти, амплификационните продукти бяха анализирани и чрез капилярна електрофореза на ABI310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) (Фигура 65).



**Фигура 65.** Електрофоретични профили на PCR продукти на CGG повтора в *FMR1* гена, анализирани чрез капилярна електрофореза. Сините пикове представляват фрагментите от амплифицирания CGG повтор, а червените пикове - молекулен стандарт, спрямо който се извършва оразмеряването на фрагментите. Премутантни експандирани алели, които представляват мозайка от фрагменти, различаващи се с по един тринуклеотид, се детектират като поредица от пикове както се вижда от профила на премутантния алел 70 CGG повтора.

Предимство на разработения от нас диагностичен протокол за размножаване CGG повтора в промоторната област на *FMR1* гена е неговата бързина на изпълнение и изключителна надеждност при амплификация на фрагменти до около 150 CGG повтора. Този бърз тест, разработен като скринингов метод позволява получаване на резултат в

рамките на 24 часа. Протоколът не изисква анализ на контролни проби заедно с анализираната проба, тъй като всеки получен амплификационен продукт се оразмерява директно чрез използването на вътрешен стандарт ROX500 (Applied Biosystems) и специфичен софтуер GeneScan v.2.1. или GeneMapper v.4.0. Полученият амплификационен фрагмент в базови двойки (бд) се преизчислява в брой повтори съгласно разработените от нас калкулации (Таблица 11).

**Таблица 11.** Изчисления на CGG повторите спрямо размера на амплификационните продукти в базови двойки (бд).

<b>Размер*[бд]</b>	<b>Брой CGG повтори</b>
287	25
290	26
293	27
296	28
299	29
302	30
...	...
422	70
...	...
482	90
...	...
512	100
...	...
572	120

\*Константният регион е 212 бд.

Разработването на тази методика беше истинско предизвикателство, тъй като намножаването на такива огромни CG-богати региони от човешкия геном не е лесна работа. Получените резултати бяха изключително обнадеждаващи и задоволителни от диагностична гледна точка. Себестойността на този вид анализ е най-ниска в сравнение с гореописаните техники. Друго много съществено предимство е използването на много

малко количество ДНК – 200 ng, за разлика от класическите методи на Southern хибридизация, където са необходими 5-10 µg ДНК. Това предимство прави метода приложим и за целите на пренатална диагностика.

Недостатък на разработения от нас протокол е невъзможността за намножаване/визуализиране на експанзии по-големи от 150 CGG повтора. Това наложи комбинирането на PCR протокола с допълнителен метод за анализ. За щастие, около 87% от случаите (деца с нормален алел, майки хетерозиготи с два нормални алела, носители на малки премутации) се изясняват успешно още с тази първа стъпка на амплификация на CGG повтора. При останалите около 13% се налагаше да се проведат допълнителни изследвания.

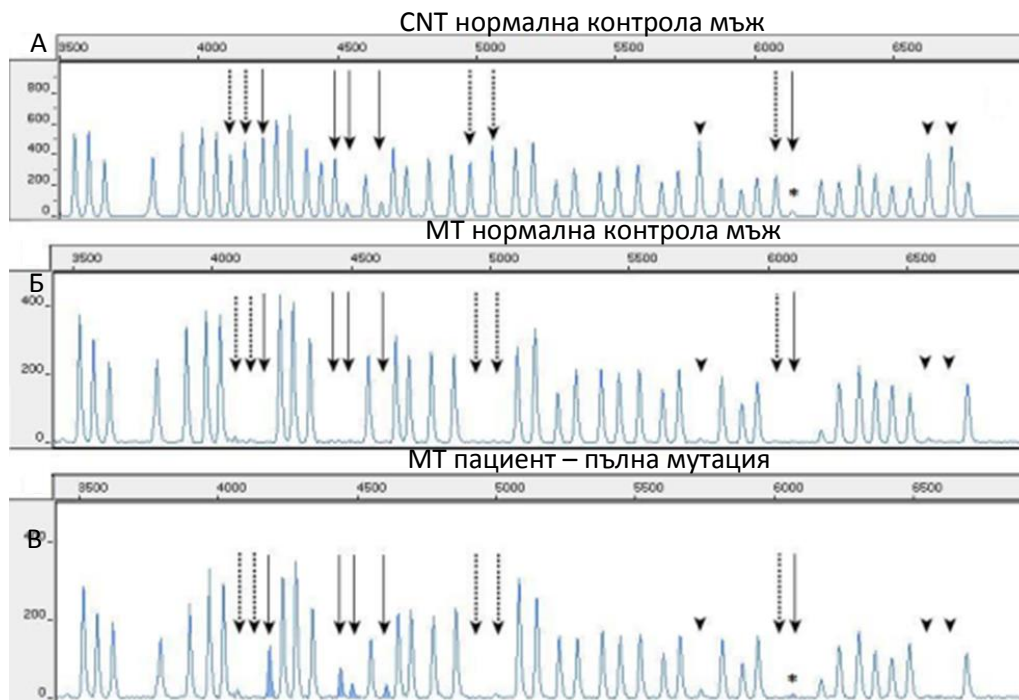
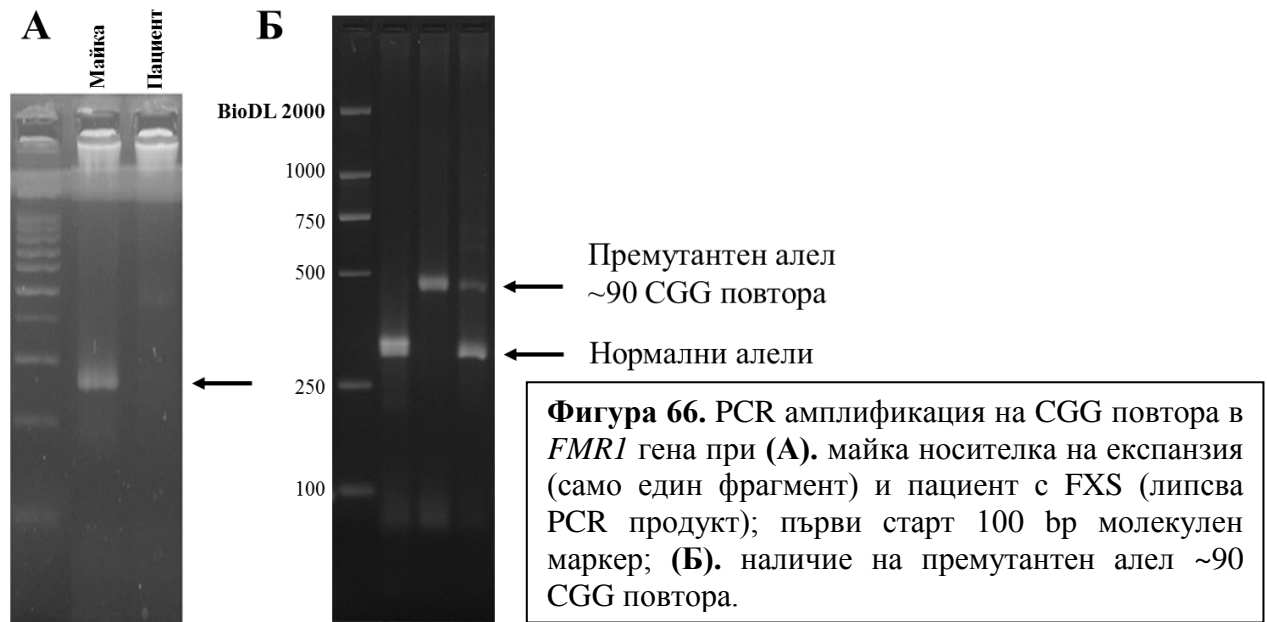
Като следваща стъпка при ДНК диагностиката на синдром на “чуплива” X-хромозома се спряхме на MS-MLPA [Todorov et al., 2009]. Този метод позволява оценка на хиперметиран CGG повтор, което от диагностична гледна точка ни дава информация директно за заглушаването на гена. Рестрикционната ендонуклеаза *NhaI* разпознава и реже неметирана ДНК. При CGG експанзия и пълна мутация, което води до хиперметиране на CGG повтора, ДНК не се реже от ензима *NhaI* и на електроферограмата се появява фрагмент, за разлика от нормални проби, при които липсва фрагмент в тази позиция.

Методът позволява бързо и сравнително евтино да се анализират индиректно много големи CGG експанзии, водещи до хиперметиране, които не могат да се амплифицират с PCR. Това го прави подходящ метод за комбиниране с PCR амплификацията, при изясняване генотипа на всеки конкретен пациент. Голямо предимство на метода е, че с него могат да се изследват и големи делеции/дупликации в *FMR1* гена, които макар и по-рядко също биха могли да са причина за заболяването FXS и които с класическите методи на диагностика се пропускат.

След като бяхме готови в технологично отношение да изследваме CGG експанзията в *FMR1* гена, започна рутинната молекулярно-генетична диагностика на FXS у нас. За изминалите 9 години бяха насочени 127 деца с предполагаема клинична диагноза FXS. Водеща клинична находка при всички момчета от тази група е липсващ или забавен говор. Интелектуалното развитие при всички момчета е забавено, като в тази група се срещат широки вариации в степента на умствено изоставане: от тежка (IQ=20-34) до гранична (IQ=70-80). Тези вариации в степента на интелектуалния дефицит се дължат на наличието на пациенти с чисто аутистично поведение и дискретни или липсващи синдромни изменения, които се подлагат на скрининг за FXS по-скоро с цел изключване на тази диагноза. При по-голяма част от пациентите от изследваната група са налице дисморфични

лицеви характеристики, като характерните за тази диагноза са: големи ниско разположени ротирани назад ушни миди, удължено лице, високо чело, големи раздалечени зъби, високо небце, коси очни цепки, екстравертирани ноздри и др. Поведенческите отклонения не са характерни за всички пациенти от изследваната група. В някои случаи се наблюдава аутистично поведение и избягване на очен контакт. В други случаи децата проявяват хиперактивност и са склонни към агресия. Забавяне във физическото развитие също не е характерно за всички пациенти от изследваната група - наблюдава се при 6 пациента: висока несъразмерна фигура с удължени ръце и крака, хипертрофия на прасците, мускулна хипотония, забавена възможност за самостоятелно седене (около 9 м. – 1 г.), самостоятелно прохождение (1 г. 6 м. – 3 г.). При 4 от изследваните момчета са налице епилептични припадъци или единични гърчови епизоди. Родителите на децата от тази група често свързват появата на патологичната симптоматика с прекарано тежко заболяване като коклюш, пневмония, рецидивиращи отити и др. Често родителите споменават прекарани инфекциозни заболявания, като причина за последващ регрес в развитието на техните деца.

Всички пациенти от изследваната група и техните майки бяха подложени първо на PCR амплификация с описания бетаин обогатен протокол. В допълнение всички пробанди бяха изследвани и с MS-MLPA за оценка на хиперметиране в промоторната област на *FMRI* гена и детекция на делеции/дупликации в този ген. При липса на амплификационен продукт в зоната на нормалните CGG повтори (Фигура 66А), MS-MLPA анализът показва хиперметиране в промоторната област на *FMRI* гена (Фигура 67), което потвърждава диагноза FXS. При майките на тези пациенти с PCR се установява наличие само на един нормален CGG фрагмент (Фигура 66А), като понякога се детектират и премутантни алели (Фигура 66Б).



**Фигура 67.** MS-MLPA профил на *FMR1* гена. Непрекъснатите стрелки посочват специфичните по отношение на метилирането сонди в *FMR1* гена. Прекъснатите стрелки посочват специфичните по отношение на метилирането сонди в *FMR2* (*AFF2*) гена. Триъгълниците посочват контролни за рестрикцията фрагменти. Със \* е маркиран много нисък пик за *FMR1* гена. (А) Тест на брой копия (CNT) при нормален индивид от мъжки пол. (Б) Тест за метилиране при нормална контрола мъж. (В) Тест за метилиране при пациент с пълна мутация.

Детекцията на CGG експанзия във *FMRI* гена вече не беше непосилна задача. От изследваните 127 неродствени пациенти при 14 (11%) беше установена патологична експанзия на CGG повтора в *FMRI* гена и диагнозата беше верифицирана на молекулно ниво. Резултатите са представени в Таблица 12.

В три семейства имаше по две засегнати деца, като и в трите случая бяха установени различни комбинации на експандирали CGG фрагменти (виж Таблица 12). В един от случаите освен пълна мутация беше открита и делеция в посока 5' от CGG повтора в промоторната област, която най-вероятно няма отношение към диагнозата. Мозаечен генотип беше установен в 7 неродствени семейства, което показва, че при 50% от детектираните случаи пълната мутация е в комбинация с премутантни алели (5 случая) и дори с нормални алели (2 случая). Последната комбинация на нормални алели с пълна CGG експанзия в мозаечен генотип не беше съобщавана в литературата до 2007 г, когато ние открихме такава находка при първия български пациент с верифицирана диагноза FXS на генетично ниво. Този случай на мозайка нормален алел/пълна мутация беше описан подробно в BMJ Case Report [Todorov et al., 2009] и е представен по-надолу в текста. Резултатът от PCR анализа в конкретното семейство беше нетипичен: при майката беше установено наличие на един нормален алел  $29\pm 1$  CGG повтора, а при болното момче беше визуализиран също нормален CGG повтор в зоната на нормалните фрагменти, но с три CGG повтора по-тежък ( $32\pm 1$  CGG) от нормалния фрагмент на майката (Фигура 68А). Резултатът беше потвърден чрез PCR/Southern хибридизация (Фигура 68Б).

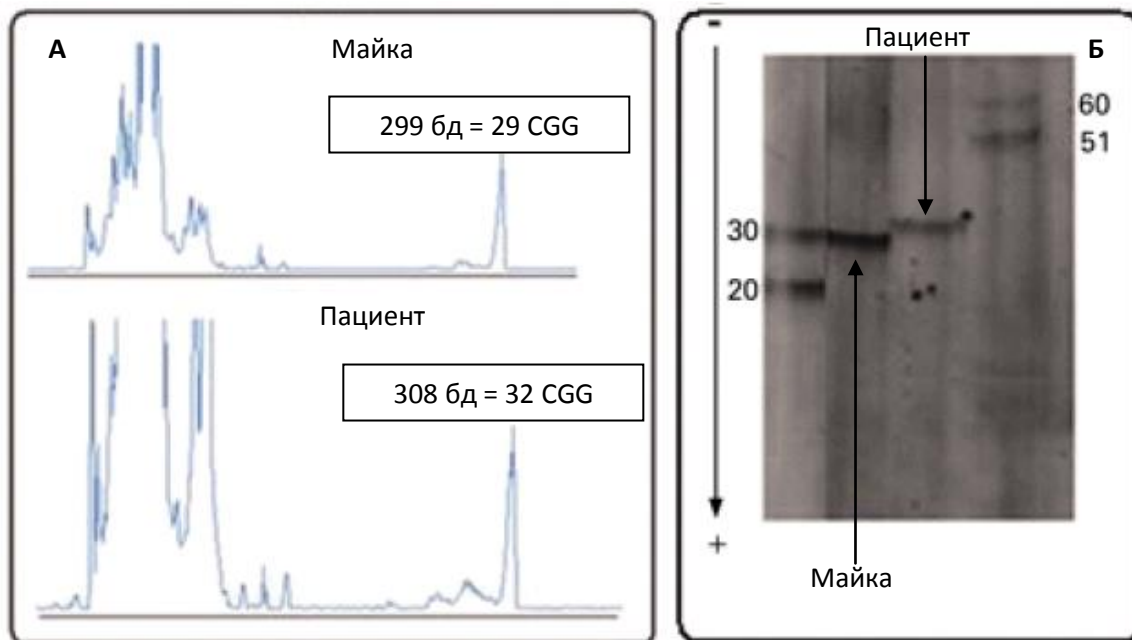
**Таблица 12.** CGG фрагменти в генетичния профил на пациенти с FXS.

Номер	CGG фрагменти в генетичния профил на пациента			Генотип
1	нормален фрагмент		пълна мутация	мозайка
2			пълна мутация	
3			пълна мутация	
4		премутация	пълна мутация	мозайка
5		премутация	пълна мутация	мозайка
6	нормален фрагмент		пълна мутация	мозайка
7			пълна мутация	
8А	нормален фрагмент		пълна мутация	мозайка
8Б		премутация	пълна мутация	мозайка
9А		премутация	пълна мутация	мозайка

9Б			пълна мутация	
10А			пълна мутация	
10Б		премутация	пълна мутация	мозайка
11			пълна мутация	
12			пълна мутация	
13			пълна мутация	делеция 5' от CGG повтора*
14			пълна мутация	

А и Б – засегнати братя

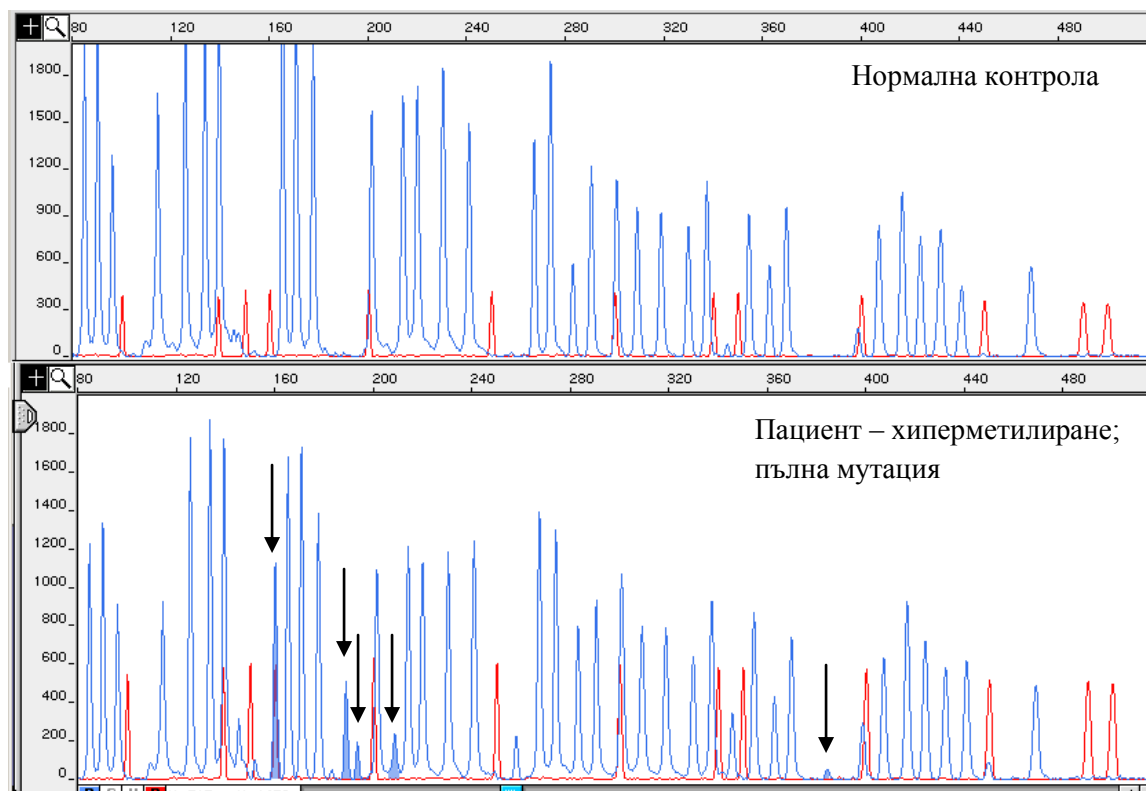
\*делецията обхваща част от промоторния район в посока 5' от CGG повтора (сонди 03727-L03187 и 03725-L13188, MLPA кит ME029, www.mlpa.com)



**Фигура 68 (А).** Капилярна електрофореза на PCR продукт на CGG повтора в *FMR1* гена. **(Б).** PCR/хибридизация по Southern на CGG повтора в *FMR1* гена.

MS-MLPA анализът при пациента показва хиперметиране в промоторната област на *FMR1* гена (Фигура 69). Единственото възможно обяснение беше, че сме се натъкнали на мозаичен генотип от нормален фрагмент и пълна мутация. Резултатът от молекулярно-генетичния анализ напълно съвпаднаше с наблюдаваната лека клинична симптоматика при този пациент, което най-вероятно се дължеше на наличието на нормален CGG алел в клетките на централна нервна система. Пациентът беше с интелектуален дефицит от ранна детска възраст, но без физически отклонения и лицев дисморфизъм. Нямаше забавяне в говора, но речевия състав беше доста ограничен. Имал е проблеми с обучението от ранна

детска възраст, беше съобщено трудно поддържане на очен контакт и дефицит на внимание. Завършил е училище за проблемни деца. По отношение на поведенческите отклонения рядко бяха забелязвани хиперактивност и агресия.



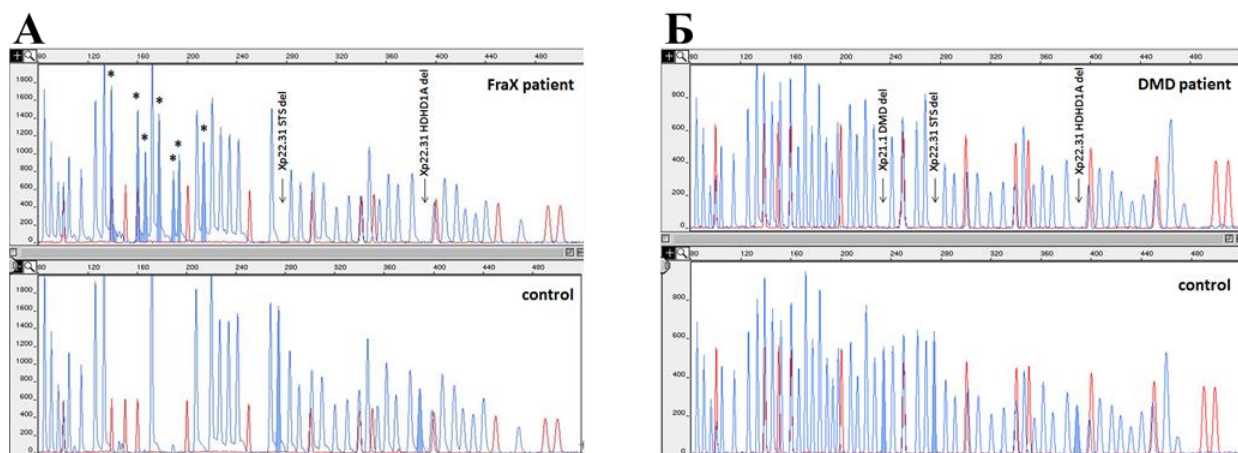
**Фигура 69.** MS-MLPA профил на FXS пациент. След рестрикция с чувствителна към метилиране рестриктаза Hha I при пациента се наблюдава хиперметиране на промоторната област на *FMR1* гена, което съответства на пълна мутация. Хиперметираните фрагменти са посочени със стрелки; при нормална контрола тези фрагменти липсват тъй като са неметиранни и се срязват от чувствителната по отношение на метилиране рестриктаза.

По наше мнение, мозаечният модел на нормален алел с пълна мутация е резултат от унаследяване на майчиния нестабилен премутантен алел, като най-логичният механизъм за възникване на нормалния алел е делеция (регресия) на пълната мутация в рамките на самия CGG повтор, тъй като използваните от нас PCR праймери бяха дизайнирани във фланкиращите региони на повтора [Nolin et al., 1994; Mila et al., 1996; Schmucker & Seidel, 1999; Grasso et al., 1999]. През 2009 г., когато публикувахме този случай, в световната литература имаше само един публикуван случай на регресия на майчина премутация до нормален алел, което води до напълно здраво момче [Tabolacci et al., 2007]. Беше изказано предположението, че тези случаи може да не са толкова редки в природата, но те остават практически неизвестни поради липса на клинична симптоматика.

Този случай ни научи, че молекулярно-генетичната диагностика на синдром на чуплива X хромозома не бива да се извършва без участие на майката в анализа и не бива да се разчита само на нормален резултат от PCR анализа. В конкретния случай на генотип, който представлява мозайка от нормален алел и алел с пълна мутация, ако бяхме изследвали само пациента и се бяхме доверили само на резултата от PCR анализа, наличието на нормален алел можеше да доведе до грешна интерпретация и изключване на диагноза FXS.

Друг случай, от който научихме много за това колко сложна може да се окаже молекулярно-генетичната диагностика в рамките на едно семейство е публикуван в Clin Genet [Todorova et. al., 2013]. Семейството беше насочено за генетична диагностика при две момчета с коренно различна клинична симптоматика. По-големият брат е проходил късно около 2 год. възраст, има задръжки в речевото развитие, интелектуален дефицит, агресивно поведение, макроорхидизъм и дисморфичен фациес с големи ниско разположени ушни миди. Клиничната картина съответстваше на FXS. По-малкият брат в семейството също е проходил късно около 2 год. възраст, но клиничната картина отговаряше на мускулна дистрофия тип Дюшен с прогресираща мускулна слабост, хипертрофия на прасците и изоставане в невропсихологическото развитие. Стойностите на креатинфосфокиназата в серум категорично показваха дистрофинопатия. В допълнение, двамата братя имаха симптоми на тежка ихтиоза, най-вероятно X свързана (X-linked ichthyosis, XLI, OMIM#308100). Най-малкото дете в семейството е здраво момиче. В семейството не се съобщават други случаи на ДМД или интелектуален дефицит, но по отношение на ихтиозата, клинично здрава сестра на майката също има момче с ихтиоза.

Молекулярно-генетичният анализ при засегнатите момчета беше проведен с помощта на специфичните MLPA китове за гените *FMRI* и *DMD*. При по-големия брат беше доказана пълна CGG експанзия и хиперметиране в промотора на *FMRI* гена, което потвърди предполагаемата диагноза FXS (Фигура 70А). При по-малкото момче с мускулно засягане беше установена делеция в *DMD* гена (Фигура 70Б), която по-късно беше доизяснена на молекулно ниво със специфичния за *DMD* гена MLPA кит. Беше установено, че делецията покрива екзони 45-50 (с.6439-?\_7309+?del) от *DMD* гена, което нарушава рамката на четене на генетичната информация и потвърждава клинична диагноза мускулна дистрофия тип Дюшен. В допълнение, при двете момчета беше установена делеция в региона Хр22.31, където попадат гените *STS* и *HDHD1A*, свързани с ихтиоза (Фигура 70А и Б).



**Фигура 70.** MLPA анализ в семейство с две засегнати деца с различна клинична симптоматика. (А). MLPA профил при пациента с FXS; (Б). MLPA профил при пациента с ДМД. И при двамата пациенти се наблюдава делеция на гените *STS* и *HDHD1A*, свързани с ихтиоза.

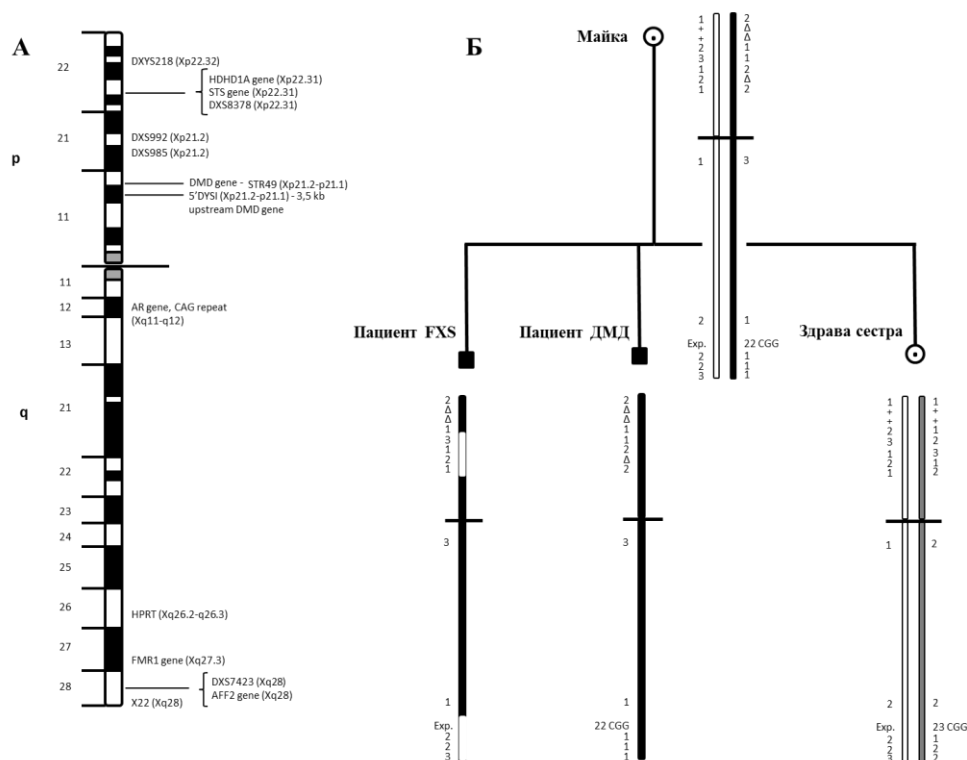
Молекулярно-генетичният анализ при майката показва носителство на трите мутации. При нея бяха установени две независими Xp делеции, едната покриваща гените *STS/HDHD1A* и втора делеция на екзони 45-50 от *DMD* гена, в комбинация с Xq премутация във *FMRI* гена ~130 CGG повтора. Здравата сестра беше носител само на експанзия във *FMRI* гена.

За да се проследи унаследяването на двете майчини X-хромозоми в поколението, проведохме хаплотипен анализ с помощта на следните маркери:

Xp - центромер 5'DysI (3.5 kb upstream *DMD* ген; Xp21.2-p21.1); STR49 (*DMD* ген; Xp21.2-p21.1); DXS985 (Xp21.2); DXS992 (Xp21.2); DXS8378 (Xp22.31) и DXYS218 (Xp22.32) – теломер;

Xq – центромер *AR* ген (андроген рецептор, CAG повтор, Xq11-q12); *HPRT* (Xq26.2-q26.3); DXS7423 (Xq28); *AFF2* ген повтор (Xq28) и X22 (Xq28) – теломер.

Резултатите са представени на Фигура 71А и Б.



**Фигура 71.** Семейство с две засегнати момчета FXS/ихтиоза и ДМД/ихтиоза, унаследени от майка, носителка на трите генетични дефекта. **(А).** Локализация на използваните маркери по дължината на X-хромозомата. **(Б).** Родословно дърво на семейството и реконструираният хаплотипове. Двете майчини X хромозоми са представени в бяло и черно. Рекомбинираната X хромозома при момчето с FXS е представена в черно и бяло. Бащината X хромозома в здравата сестра е маркирана в сиво. Използвани символи: + специфичната сонда за дадения ген е налична; Δ делеция; Exp – CGG експанзия.

Унаследяването на двете майчини X хромозоми се оказва доста сложно, наложи се да направим някои предположения, за да обясним наблюдаваните генотипове. Предположиме, че двете делеции на Xp рамото са предадени на момчето с ДМД фенотип и *FMR1* експанзията е унаследена от клинично здравата дъщеря, без допълнителни реаранжировки (виж Фигура 71Б). Ако това е така, то момчето с FXS и ихтиоза е унаследило тройно рекомбинирала майчина X-хромозома (виж Фигура 71Б). Две рекомбинационни събития обхващат Xp рамото:

- 1) Дистално от *DMD* гена между маркери DXS992 (Xp21.2) и DXS8378 (Xp22.31);
- 2) Проксимално от *DMD* гена.

Третото рекомбинационно събитие при този пациент попада в региона Xq дистално от маркер *HPRT* (Xq26.2-q26.3) и проксимално от Xq27.3 региона, където се намира *FMR1* експанзията. Трудно е да се прецени кои хаплотипове са най-вероятни, по наше мнение

този вариант изглеждаше най-логичен, тъй като всички други интерпретации включват едно или две рекомбинационни събития при всяко едно от трите деца.

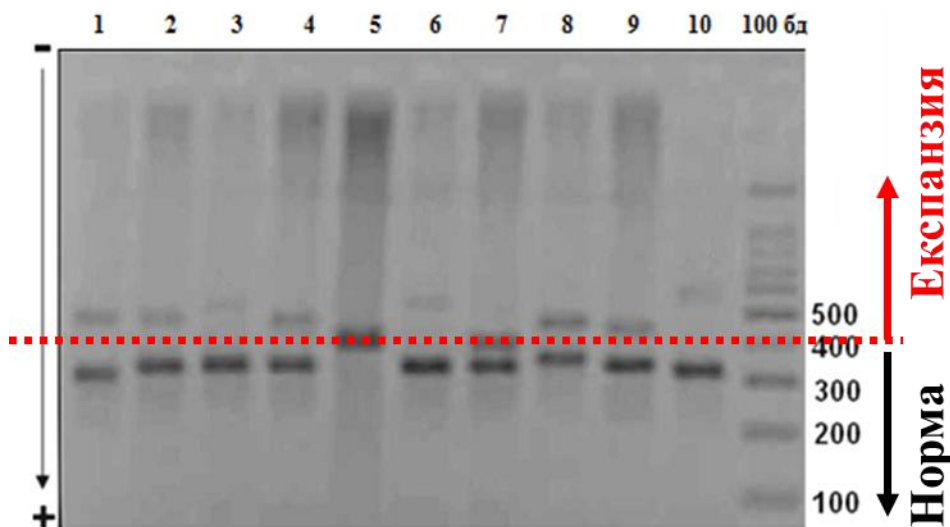
Едно от последствията при рекомбинации на генетично ниво е елиминиране на мутации от генома. Двете рекомбинационни събития в Xp региона, фланкиращи *DMD* гена, могат да се разглеждат като опит за „поправка“ на делетирания алел.

От диагностична гледна точка, този случай не беше особено предизвикателство, тъй като предполагаемите клинични диагнози и при двете деца бяха потвърдени с MLPA анализ на конкретните гени. От научна гледна точка обаче, случаят беше много сложен за интерпретация. Това е първият докладван случай в световната литература на асимптоматична носителка на три различни X свързани заболявания, дължащи се на генетични реаранжировки в дългото и късо рамо на X хромозомата. И двете X хромозоми са засегнати от различен тип мутации и предаването им в следващото поколение включва серия от рекомбинационни събития, някои от които могат да се разглеждат като механизъм за частично възстановяване.

#### **Изясняване на носителски статус при жени от рискови семейства**

PCR протоколът, който разработихме с висока концентрация на бетаин 2.5M е подходящ за скринингови цели при жени за оценка на носителски статус, защото нормалните алели и премутациите се детектират успешно в хода на амплификационния анализ и агарозна електрофореза с визуализация етидиев бромид (Фигура 72). Зоната на премутациите е ясно отдиференцируема от нормалните фрагменти и само жени с предполагаем премутантен алел се анализират допълнително с капилярна електрофореза за точно оразмеряване на експанзията.

В допълнение MS-MLPA анализът е подходящ за скринингови програми при новородени момчета, тъй като открива само пълни мутации, свързани с клинична изява и изпуска премутациите, които в повечето случаи нямат клинична симптоматика на FXS.



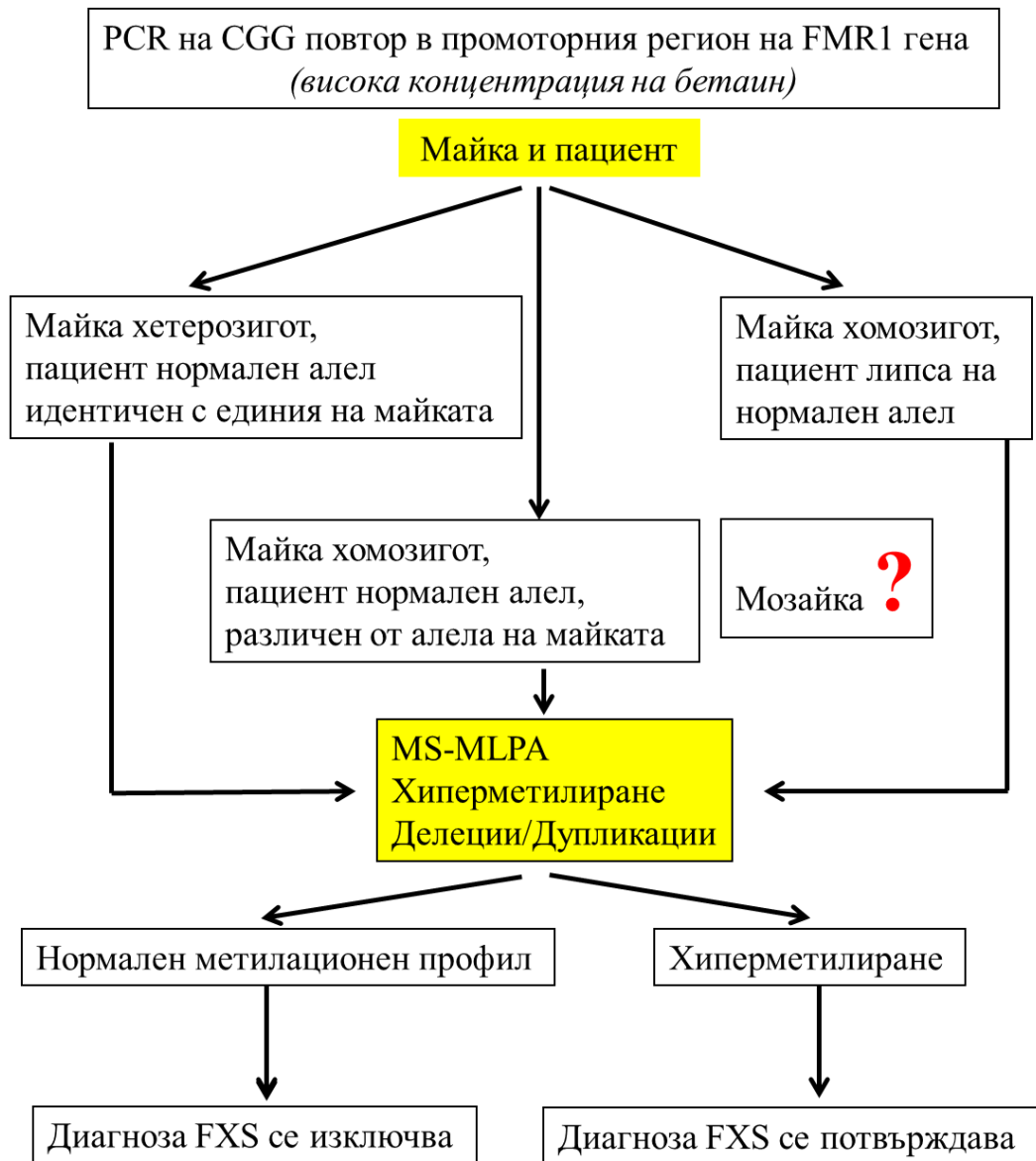
**Фигура 72.** Агарозна електрофореза на амплифициран CGG повтор в *FMR1* гена при жени носителки на премутация. Генотиповете на представените проби, предварително оразмерени с капилярна електрофореза и използвани като контроли в хода на разработката на скрининговия метод са: 1-21/74 CGG; 2-25/75 CGG; 3-29/~90 CGG; 4-29/70 CGG; 5-50/56 CGG; 6-26/~90 CGG; 7-29/50 CGG; 8-35/67 CGG; 9-29/62 CGG; 10-28/~100 CGG.

#### **4.1.4. Обобщение на получените резултати и заключителни бележки**

За период от 9 години (от 2007 до 2015) беше проведен молекулярно-генетичен анализ на *FMR1* гена при 127 неродствени пациента с предполагаема клинична диагноза синдром на чуплива X хромозома. Молекулярно-генетична диагноза FXS беше верифицирана при 14 неродствени пациента (11%). Този нисък процент генетично верифицирани случаи се дължи на смесения характер на изследваната група пациенти, в която попадат голям брой деца с чисто аутистично поведение, насочени по-скоро за изключване, отколкото за потвърждаване на диагноза FXS. При 50% от случаите в нашата извадка беше установен мозаечен генотип на пълна CGG експанзия в комбинация с премутантен или нормален фрагмент.

От технологична гледна точка стана възможно и изясняване на носителския статус при жени от рисковите семейства, както и скрининга за премутации в *FMR1* гена при съмнение за преждевременно изчерпване на яйчниковия резерв (premature ovarian failure, POF, OMIM#311360), в хода на подготовка за *in vitro* процедури.

На базата на нашите резултати беше разработен системен подход за анализ на семейства с FXS (Фигура 73).



**Фигура 73.** Системен подход за анализ на семейства с предполагаема клинична диагноза FXS.

#### 4.2. СИНДРОМ НА RETT, RTT

Rett синдром (**RTT**, **OMIM#312750**) е най-честата причина за X – свързан интелектуален дефицит при момичета [Rett, 1966; Rett, 1977]. Честотата на заболяването е 1:10 000, 1:15 000 [Hagberg and Hadberg, 1997]. Това е прогресиращо заболяване, засягащо неврологичното развитие.

#### **4.2.1. Клинична картина и лабораторни изследвания**

Пациентите с Rett синдром обикновено показват нормално развитие през първите 6-18 месеца, след което следва задръжка в развитието, последвана от бързо влошаване на мозъчните функции. Наблюдава се прогресираща енцефалопатия [Hagberg et al., 1983]. Обикновено първите признаци на заболяването са хипотония и стереотипно движение на ръцете и краката. Забавен растеж на главата (микроцефалия) се забелязва около 5<sup>ти</sup>-6<sup>ти</sup> месец. Появяват се забележими промени в развитието, изоставане в растежа, тежки проблеми с говорното развитие. Постепенно се загубва целевото движение на ръцете, забелязва се размахване на ръцете или често поставяне в устата. Други симптоми са апраксия, клатещо се нестабилно тяло или ходене на пръсти, сколиоза, загуба на социален контакт, липса на очен контакт, дефицит на внимание. Допълнителни неврологични отклонения са спастични парепарези, вазомоторни нарушения на долните крайници и епилепсия (гърчове).

**Епилепсия** се наблюдава при 70% до 90% от пациентите с класически синдром на Rett [Cooper et al., 1998; Steffenbutg et al., 2001]. Пристъпите обикновено са от различни типове, включително комплексни, парциални, атипични абсансни и генерализирани тонично-клонични [Appleton, 2003]. Миоклоничните пристъпи често са трудни за различаване от типичните стереотипни движения, тремора на ръцете и дистонията, характерни за синдром на Rett [Moser et al., 2007; d'Orsi et al., 2009]. Много събития, които се оприличават на пристъпи, не корелират с изменения в ЕЕГ. Пристъпите обичайно започват в детска възраст и отслабват с напредване на възрастта. Едва една малка част остават тежки и са резистентни на лечение [Buoni et al., 2008; Artuso et al., 2010]. Обикновено по-ранното начало се асоциира с по-тежко засягане [Nissenkorn et al., 2010]. Наблюдават се разлики по отношение на начало, тип на гърчовете и медикаментозна резистентност [Pintaudi et al., 2010]. Индивидите с епилепсия проявяват по-тежка клинична картина по отношение на типичния фенотип за синдрома (по-голяма степен на умствено изоставане, стереотипни движения и липса на комуникативност [Glaze et al., 2010]).

**Дихателни проблеми** се появяват и задълбочават при стрес, дишането обикновено е нормално в спящо състояние и се появяват проблеми (спонтанни епизоди на хипервентилация) в будно състояние. Губят се нормалните способности за сън.

**Проводни и ритъмни нарушения** се наблюдава при децата с Rett синдром, като значително са намалени нискочестотните и високочестотни компоненти. RR интервала е значително по-къс, а коригирания QT интервал е по-дълъг при пациенти в сравнение с

нормални контроли [Guideri et al., 1999]. Авторите предполагат, че тази сърдечна проблематика води до сърдечна нестабилност и внезапна смърт при пациенти с Rett синдром.

В допълнение се забелязват **гастроинтестинални проблеми**, включващи тежък гастроезофагеален рефлукс. Налице е обилно слюнкоотделяне.

Керг и сътр. [1997] докладват 1.2% годишна смъртност при Rett синдром, голяма част от които (26%) са внезапни и с неизяснена причина.

Поради огромното разнообразие от клинични симптоми, съпровождащи RTT, през 2010 година критериите за заболяването бяха ревизирани [Neul et al., 2010]. Международно приетите в момента диагностични критерии са представени в Таблица 13.

**Таблица 13.** Диагностични критерии при синдром на Rett [Neul et al., 2010].

ИЗИСКВАНИЯ	
Типичен (класически) RTT	Атипичен (вариант) RTT
1. Период на регрес, последван от стабилизиране	1. Период на регрес, последван от стабилизиране
2. Наличие на всички основни и допълнителни критерии	2. Наблюдават се поне 2 от 4 <sup>те</sup> основни критерии
3. Допълнителните критерии не са задължителни, но често се манифестират при класически RTT	3. Наблюдават се поне 5 от 11 <sup>те</sup> основни критерии

КРИТЕРИИ	
Основни критерии	<ol style="list-style-type: none"> <li>Частична или пълна загуба на придобитите, съзнателно използвани умения на ръцете</li> <li>Частична или пълна загуба на придобитите говорни умения</li> <li>Аномална походка – частична (диспраксия) или пълна липса</li> <li>Стереотипни движения на ръцете</li> </ol>
Критерии за изключване на типичен RTT	<ol style="list-style-type: none"> <li>Мозъчни увреждания след пери- или постнатална травма, неврометаболитни заболявания или тежка инфекция, водеща до неврологични проблеми</li> <li>Тежко абнормално психомоторно развитие през първите 6 месеца от живота</li> </ol>
Критерии в подкрепа на атипичен RTT	<ol style="list-style-type: none"> <li>Дихателни нарушения в будно състояние</li> <li>Бруксизъм в будно състояние</li> <li>Нарушен патерн на съня</li> <li>Абнормален мускулен тонус</li> <li>Периферни вазомоторни нарушения</li> <li>Сколиоза / скифоза</li> <li>Нарушения в растежа</li> <li>Малки, студени ръце и крака</li> <li>Епизоди с издаване на неподходящ смях/писъци</li> <li>Снижен праг на болка</li> <li>Засилен очен контакт – втренчен поглед</li> </ol>

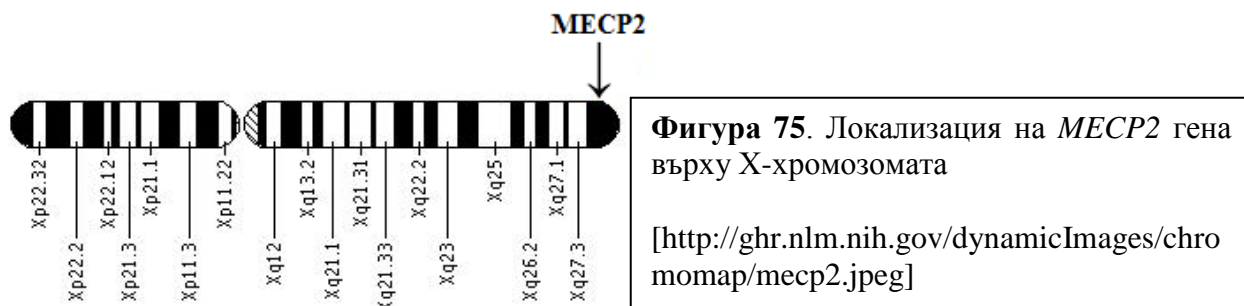
Атипичният RTT се разделя на 3 форми според спецификата на клиничните симптоми (Фигура 74).



**Фигура 74.** Форми на RTT вариант според ревизираните клинични критерии на Neul et al., [2010].

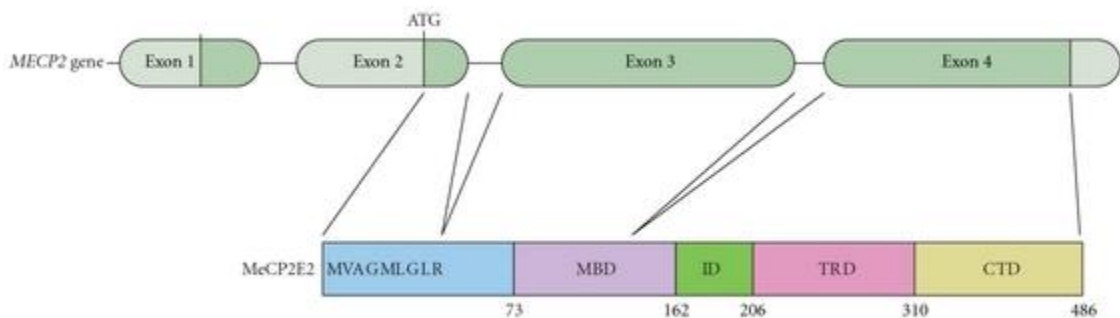
#### 4.2.2. Молекулни основи

През 1999 беше установено, че мутации в гена, кодиращ протеина Methyl-CpG binding protein 2 (*MECP2*, OMIM\*300005), са асоциирани със синдром на RTT [Amir et al., 1999]. Генът е разположен на дългото рамо на X-хромозомата (Xq28) и подлежи на X-хромозомна инактивация (Фигура 75) [Meehan et al., 1992; Adler et al., 1995; D’Esposito et al., 1996; Vilain et al., 1996].



**Генът *MECP2*** има 4 екзона, от които кодиращи са 2, 3 и 4 и се характеризира с много голям интрон 2 (около 60 кб) [Coy et al., 1999]. Транскрибира се от центромера към теломера, като на транскрипционно ниво се характеризира с високо консервативен 3'-нетранслируем регион от 8.5 кб [Coy et al., 1999].

**Белтъчният продукт MeCP2** се състои от 486 аминокиселинни остатъка, асоцииран е с хроматина и има три главни домена: метил-свързващ домен, домен подтискащ транскрипцията и С-терминален домен с неясна функция (Фигура 76). Този белтък се свързва с метилираните CpG острови, като *in vivo* е главно концентриран в зоната на хетерохроматина, но се среща и в зоната на еухроматина. Смята се, че основната функция на белтъка MeCP2 е репресираща чрез ремоделиране и опаковане на хроматина. За момента не се знаят точно гените, които се регулират специфично чрез действието на MeCP2. Друга функция на MeCP2 е взаимодействието с високоповторени елементи като LINE1 ретротранспозони [Yu et al., 2001].

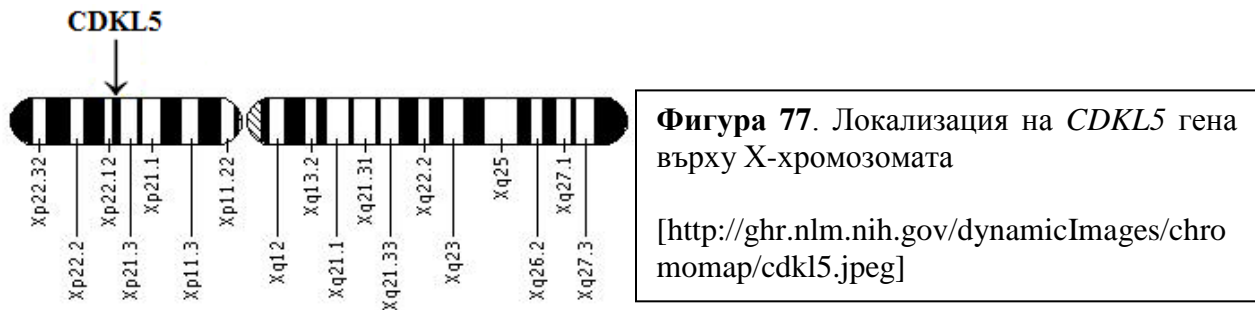


**Фигура 76.** Схематично представяне на структурата на MeCP2 протеина: MBD - метил-свързващ домен; ID – междинен домен; TRD - домен подтискащ транскрипцията; CTD - С-терминален домен [www.hindawi.com].

**Мутации** в *MECP2* гена се срещат при около 95-97% от индивидите с типичен RTT [Neul et al., 2008]. При „атипични“ пациенти процентът е по-нисък (50-70%) [Neul et al., 2010]. Между 3 и 5% от случаите, които отговарят на стриктните клинични критерии за синдром на RTT, нямат мутации в *MECP2*. В допълнение към това, мутации в *MECP2* са детектирани при пациенти без клинични симптоми на RTT. Докладвани са асимптоматични жени, носителки на *MECP2* мутации при фамилни случаи на RTT [Wan et al., 1999]. Тези индивиди са с екстремна X инактивация, позволяваща пълна липса на фенотип, поради хиперметиране на мутантното копие на *MECP2* гена. Момчета носители на мутации в *MECP2* гена, причиняващи типичен RTT при момичета са с тежко засягане или загиват вътреутробно [Wan et al., 1999; Kankirawatana et al., 2006].

При пациенти с RTT вариант и епилепсия с ранно начало, освен в *MECP2* гена, се откриват и мутации в гена *CDKL5*, кодиращ Cyclin-Dependent Kinase-Like 5 (OMIM\*300203), локализиран в региона Xp22.13 (Фигура 77) [Scala et al., 2005, Archer et al.,

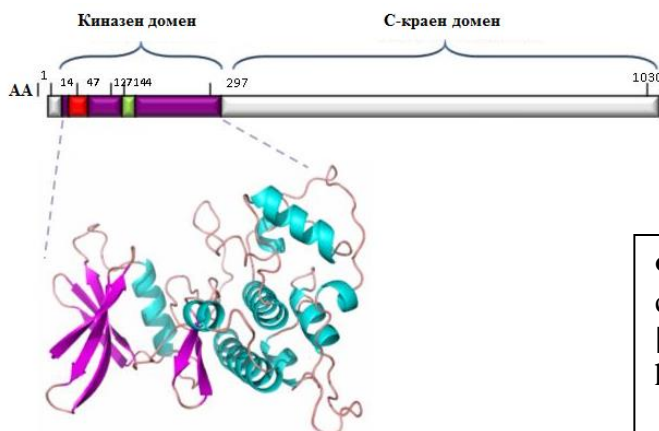
2006, Bahi-Buisson et al., 2008]. При тези пациенти липсват някои от отличителните черти на RTT, например ясен период на регрес и характерния „напрегат“ втречен поглед [Bahi-Buisson et al., 2008].



**Генът *CDKL5*** има 21 екзона (20 кодиращи) и покрива 228023 бази от човешкия геном.

***CDKL5* протеинът** е от особена важност за правилната мозъчна дейност. *CDKL5* е протеин с киназна активност, т.е. отговорен е за фосфорилирането на други протеини, чрез което влияе на тяхната функционална активност. Един от тези протеини е MeCP2, който играе важна роля в регулиране активността на невроните.

Структурата на протеина *CDKL5* е сравнително проста – той е изграден от един N-краен домен с киназна активност и един C-краен домен с все още неизяснена функция (Фигура 78).



**Фигура 78.** Схематично представяне на структурата на *CDKL5* протеина [http://protein.bio.unipd.it/research/disease.html].

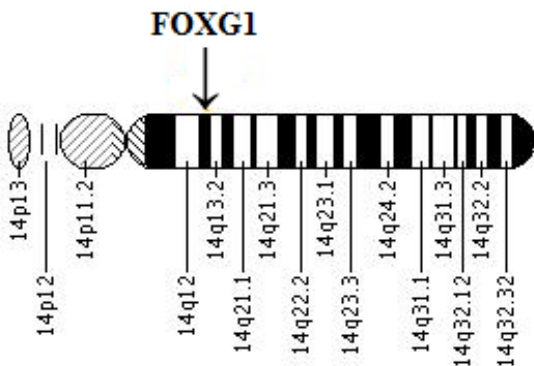
**Най-честите мутации в *MECP2* и *CDKL5* гените** са точкови мутации: транзиции и трансверзии, при които се заменя една аминокиселина с друга (missense) или се генерира

стоп кодон (nonsense). Срещат се и малки делеции и инсерции на няколко нуклеотида, както и комплексни мутационни събития.

В допълнение, в тези гени се откриват и големи делеции и дупликации, покриващи региони от един или няколко гена [Kleefstra et al., 2002; Ravn et al., 2005; Hardwick et al., 2007; Lugtenberg et al., 2009]. Голямата клинична вариабилност на RTT корелира с типа на мутацията, нейното разположение в *MECP2* гена и инактивацията на X хромозомата [Amir et al., 2000].

Мутации в *MECP2* и *CDKL5* гените са отговорни и за изява на типични и атипични форми Rett синдром.

При пациенти с конгенитален вариант на RTT се откриват мутации в друг ген Forkhead Box G1 (*FOXG1* – OMIM\*164874, хромозомна локализация 14q12, Фигура 79) [Ariani et al., 2008].



**Фигура 79.** Локализация на *FOXG1* гена върху 14<sup>-та</sup> хромозома [http://ghr.nlm.nih.gov/gene=foxg1].

**Генът *FOXG1*** има 1 екзон и покрива 2584 базови двойки.

*FOXG1* кодира **протеин Forkhead box G1 (FoxG1)**. Това е транскрипционен фактор, който се експресира тъканно специфично в мозъка и тестисите. Доменната организация на протеина е представена на Фигура 80.



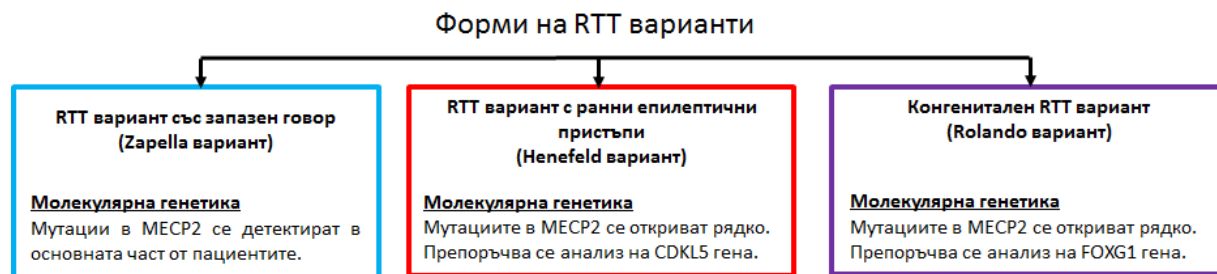
**Фигура 80.** Функционални домени на FoxG1 протеина: ДНК-свързващ домен (DNA-binding forkhead domain - FHD), Gro-свързващ домен (Gro-binding domain - GBD) и KDM5B-свързващ домен (KDM5B binding domain - JBD). Аминокиселинната номерация (AA) е показана в долния край на схемата.

Подобно на белтъка MeCP2 и протеина FoxG1 се асоциира индиректно с хистон деацетилаза 1 и последващата пост-транслационна модификация на хистоните. Сходните механизми на действие и специфична експресия са вероятна причина за близката фенотипна проява на мутациите в двата гена. Протеините MeCP2 и FoxG1 участват в двата основни метода за регулация на транскрипцията - метилиране на ДНК и деацетилиране на хистоновите „опашки“. Тези два процеса предизвикват компактна хроматинова конформация и последващо подтискане на транскрипцията. От друга страна деметилирането на ДНК и ацетилирането на хистоновите „опашки“ води до „отворена“ хистонова структура, която позволява висока транскрипционна активност.

Докладваните **мутации** във *FOXG1* гена са точкови замени от типа missense и nonsense [www.mecp2.chw.edu.au].

На базата на гореизложеното, може да се каже, че синдром на Rett се характеризира с широк фенотипен и генотипен спектър. Това силно затруднява молекулярно-генетичната диагностика и генотип-фенотипните корелации.

Големият брой публикувани случаи на атипичен RTT позволи да се направят някои препоръки за хода на молекулярно-генетичната диагностика при различните RTT варианти (Фигура 81).



**Фигура 81.** Препоръки за хода на молекулярно-генетичния анализ при различни форми на RTT [Neul et al., 2010].

#### 4.2.3. **Собствени резултати**

За разлика от разглежданите до тук заболявания, които бяха моногенни, синдром на Rett се асоциира с мутации в повече от един ген и генни локуси. Молекулярно-генетичната диагностика от технологична гледна точка при синдром на Rett не е предизвикателство, базира се на секвениране на ген/и и MLPA анализ за детекция на копийни варианти. Истинско предизвикателство при молекулярно-генетичната диагностика на синдром на Rett и атипичните форми на синдрома е да се насочим към най-вероятния ген за дадената

клинична диагноза. В противен случай диагностиката ген-по-ген на принципа на изключването може да е доста трудоемка, скъпа и безрезултатна задача. От особена важност в случая, за успеха на молекулярно-генетичната диагностика е подробното и точно клинично описание на пациента и интердисциплинарния подход (клиницист и генетик) при всеки конкретен случай.

За изминалия период от 9 години (2007-2015) изследвахме 98 момичета с клинична диагноза RTT, които бяха разпределени в две групи на базата на клиничната симптоматика: с класически Rett синдром и с атипичен Rett синдром [Тодоров, 2011, докторска дисертация]. В зависимост от наличие или отсъствие на епилепсия тези две групи бяха допълнително разделени на пациенти с епилепсия и пациенти без епилепсия [Киров, 2013, докторска дисертация]. Степента на умствено изоставане при пациентите с Rett синдром варира от лека (IQ=50-69) до много тежка (IQ<20). Като съпътстваща диагноза в някои от случаите се споменава аутизъм, West синдром (OMIM#308350), симптоматична (криптогенна) епилепсия, Prader-Willi/Angelman Syndroms (OMIM#176270, OMIM#105830) и Pitt-Hopkins синдром (OMIM#610954). Заболяването при всички представени случаи има прогресиращ характер. Началото на заболяването варира между първите месеци след раждане и 3 годишна възраст. При всички изследвани случаи липсват говорни умения и се наблюдава загуба на социален контакт. Друга характерна особеност при всички засегнати деца от тази група е наличието на стереотипни движения на ръцете, симптом на „миеци ръце“ и краката. Моторното развитие при тези деца е също тежко засегнато. Наблюдава се мускулна хипотония, забавен растеж на главата, клатещо се нестабилно тяло или ходене на пръсти, сколиоза. В някои случаи самостоятелното придвижване е невъзможно. Гърчове и епилептични припадъци са регистрирани при 41 пациента. Лицев дисморфизъм (микроцефалия) се наблюдава при около 1/4 от изследваните момичета. Всички деца от изследваната група не контролират тазови резервоари. Появяват се дихателни проблеми. Наблюдават се проблеми в циркулацията, които водят до студени, посиняли крака и ръце. В допълнение се забелязват гастроинтестинални проблеми, включващи тежък гастроезофагиален рефлукс. Налице е обилно слюнкоотделяне.

Двадесет и две от изследваните момичета с умствено изоставане (22%) са родени след патологична бременност и операция чрез Цезарово сечение. Редица ваксинации или прекарани тежки инфекциозни заболявания се съобщават от родителите като отключващ фактор за поява на първите патологични симптоми.

Като първа стъпка в процеса на изясняване на диагнозата при пациенти с предполагаем Rett синдром се извършва хромозомен анализ (кариотипиране), с помощта на който могат да бъдат отдиференцирани големи хромозомни преустройства, ангажиращи гени на X хромозомата и по този начин причиняващи симптоматика на Rett синдром. Този анализ обикновено е безрезултатен, ако диагнозата RTT е точно поставена. В нашата извадка не бяха установени пациенти с патологичен кариотип, който да включва хромозомни преустройства на X-хромозомата и да може да се асоциира с диагноза RTT синдром.

Молекулярно-генетичните изследвания при пациенти с RTT започват с PCR/секвениране на *MECP2* гена. При негативен резултат се преминава към MLPA анализ за търсене на големи делеции и дупликации по дължината на *MECP2* гена. Възможно е да се използва MLPA кит, анализиращ едновременно по-голям брой X хромозомни гени (напр. *MECP2*, *CDKL5* и др.), делеции или дупликации в които биха могли да се асоциират с умствено изоставане при момичета. При изследване на момичета за гени от X хромозомата обаче, интерпретацията на резултатите е комплицирана, поради наличието на две копия от X хромозомни гени. Делеция при пациент от женски пол се детектира като наполовина намален пик(ове), спрямо този/тези при контролата. Наличието на дупликация се детектира като по-висок пик(ове) от този/тези при контролата.

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

$\frac{\text{Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при пациент}}{\text{Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при контрола}} = \text{Съотношение на площите на пиковите}$
--

съотношение около 1 – нормален резултат

съотношение <0.6 – делеция

съотношение >1.6 – дупликация

**Точкови мутации, малки делеции, инсерции и комплексни мутационни събития (indels) в MECP2 гена**

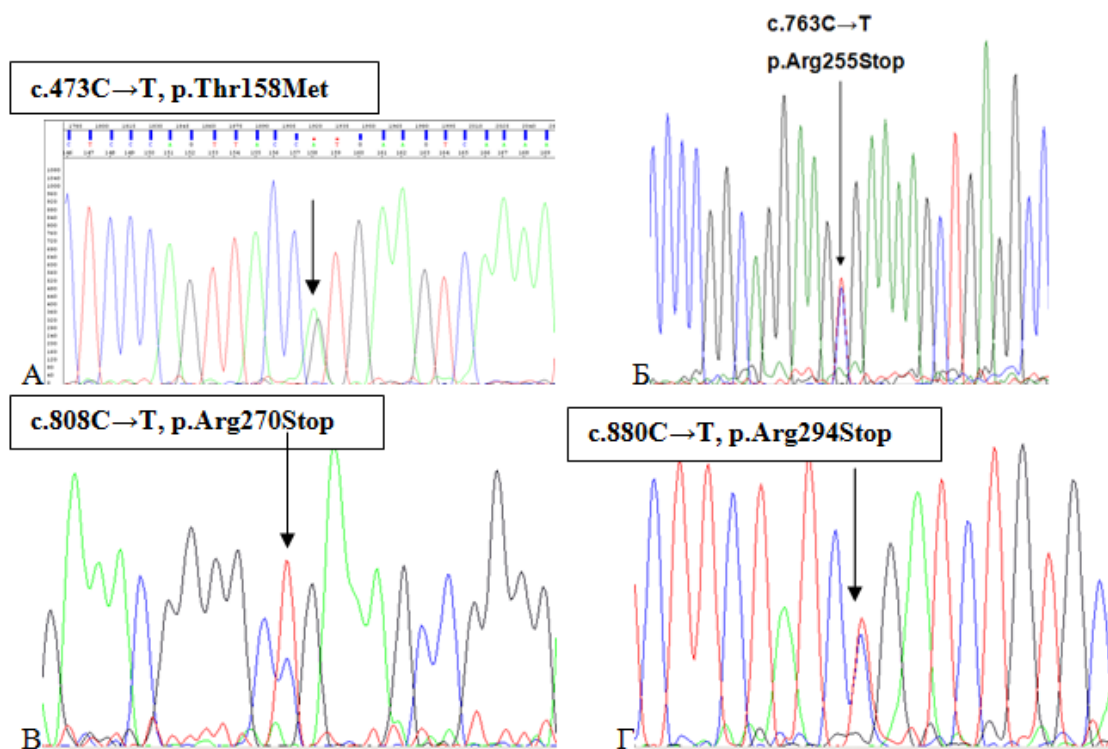
Резултатите от скрининга за мутации в MECP2 гена са представени в Таблица 14.

Част от мутациите, които открихме при нашите пациенти бяха вече публикувани в литературата [www.mecp2.chw.edu.au], но имаше и нови за времето си. В изследваната група от 98 момичета открихме 15 различни типа мутации (виж Таблица 14). Диагнозата RTT беше потвърдена на молекулно ниво при 35 деца (36%). Секвенционните профили на някои точкови мутации са представени на Фигури 82.

**Таблица 14.** Мутации в MECP2 гена при пациенти с диагноза Rett синдром.

№	Екзон	Нуклеотидна замяна	Аминокиселинна замяна	Брой пациенти
1	4	c.473C>T	p.Thr158Met	6
2	4	c.763C>T	p.Arg255*	5
3	4	c.808C>T	p.Arg270*	4
4	4	c.880C>T	p.Arg294*	2
5	4	c.916C>T	p.Arg306Cys	3
6	4	c.1157_1200del44	p.Leu386Glnfs*4	1
7	4	c.1157_1197del41	p.Leu386Glnfs*5	1
8	4	c.502C>T	p.Arg168*	4
9	2 интрон	c.27- 8C>G	Splice-site	1
10	4	c.806delG	p.Gly269Alafs*20	1
11	3	c.316C>T	p.Arg106Trp	2
12	4	c.819delG	p.Ser274Valfs*15	1
13	3-4	c.27-?_*?del*	Делеция екзон 3 и част от 4	2
14	4	c.[584_624del41insTT; 638delTinsCA]	Indel (frameshift)	1
15	3	c.321insGAAG	p.Lys107fs*4	1

\*-СТОП КОДОН



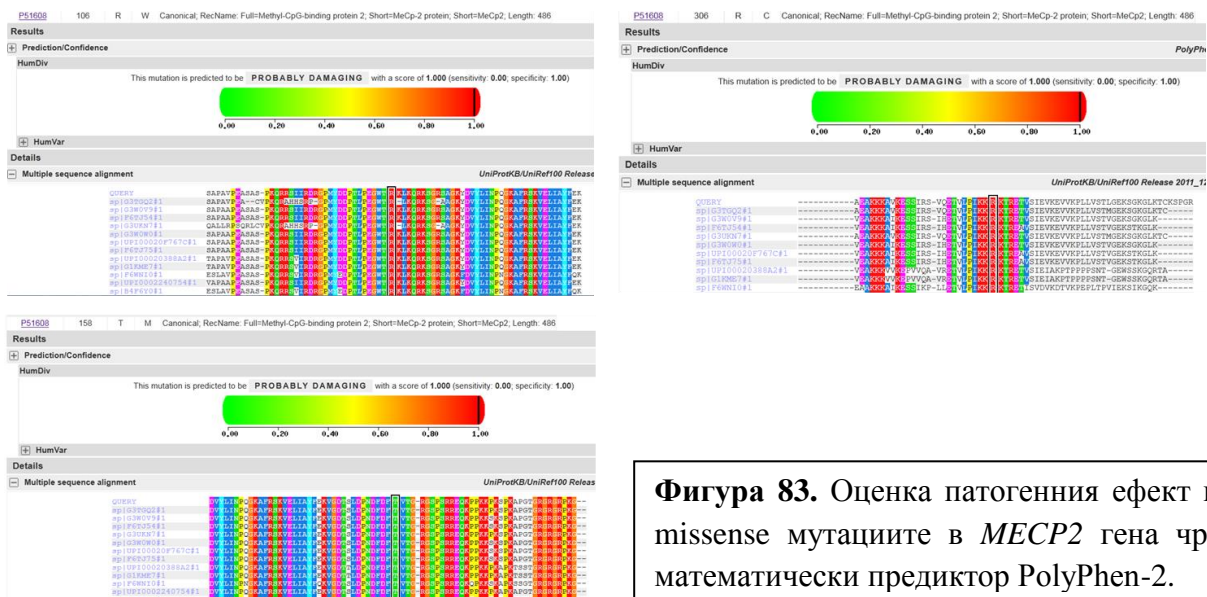
**Фигура 82 (А-Г).** Секвенционен профил на точкови мутации в *MECP2* гена.

Интересно е да се спомене, че всички екзонни нуклеотидни замени представляват транзиции на С към Т. Замяната, която нарушава сплайсинга *c.27-8C>G* е единствената трансверзия открита в нашата извадка. Всички транзиции засягат CpG динуклеотид, където 5-метилцитозин лесно се деамира и преминава в тимин, пропуска се от поправящите системи и остава фиксиран в генома като патологична мутация (model of mutagenesis by methylation-mediated deamination in CpGs) [Kunkel and Alexander, 1986]. Три от мутациите са missense, заменят една аминокиселина с друга. И трите missense мутации засягат еволюционно консервативен остатък и са оценени като вероятно патогенни със скор за патогенност 1.000 (Фигура 83). Мутацията *p.Thr158Met* попада в домена, отговорен за свързване с метилиран регион (Methylation Binding Domain, MBD). Има данни, че мутантният протеин свързва само два пъти по-слабо метилирана ДНК в сравнение с дивия тип [Ghosh et al., 2008]. Данни от кръгов дихроизъм показват, че вторичната структура на мутантния *p.Thr158Met* тип е сходна с тази на дивия тип, както в отсъствие, така и в присъствие на ДНК [Ghosh et al., 2008]. От друга страна обаче, температурната стабилност на MBD при мутантния протеин е съществено намалена в сравнение с дивия тип [Ghosh et al., 2008], което най-вероятно обяснява патологичната роля на този протеин. Въпреки че, механизмът на повлияване структурата и/или функцията на протеина при мутацията

p.Thr158Met е доста неясен, се установява, че това е една от най-често съобщаваните мутации в *MECP2* гена [Ballestar et al., 2000]. Авторите предполагат, че този аминокиселинен остатък може да играе друга важна роля в белтъчната функция, като например може да участва във взаимодействия с домена, отговорен за потискане на транскрипцията (transcriptional-repression domain). В нашата група пациенти тази мутация е също най-честата находка (6/35=17%).

Втората missense мутация p.Arg106Trp се намира също в метил-ДНК свързващия домен и съгласно математическите предиктори е патогенна, поради засягането на еволюционно високо-консервативен аминокиселинен остатък, без да е ясен точният механизъм на повлияване на белтъчната функция. Ние открихме тази мутация при двама пациенти (2/35=6%).

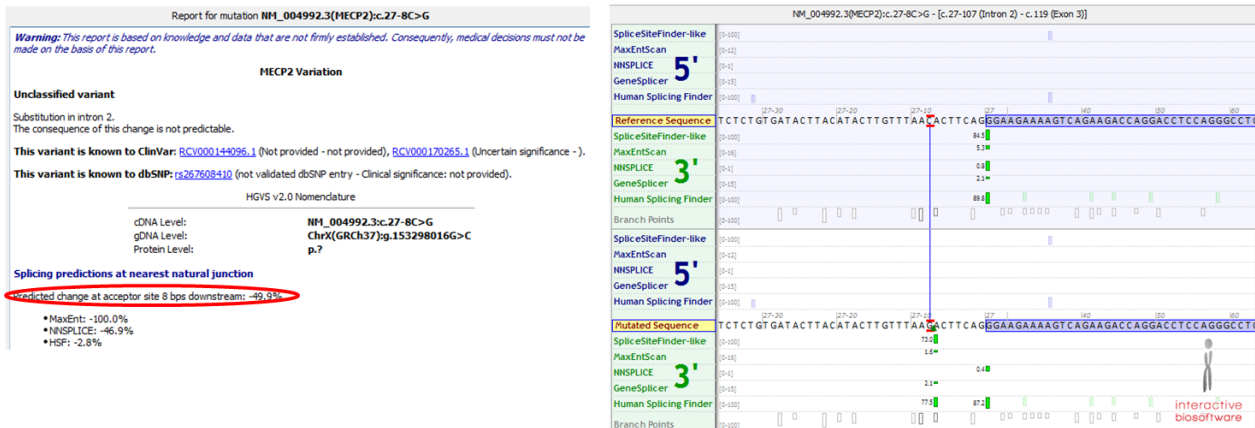
Третата missense мутация p.Arg306Cys се намира в домена, отговорен за подтискане на транскрипцията (transcriptional-repression domain), но за момента няма доказан ефект върху белтъчната функция, въпреки че патогенната ѝ роля е безпорна, тъй като е отново една от често срещаните мутации при RTT пациенти. В нашата извадка тя е открита при трима пациенти (3/35=9%).



**Фигура 83.** Оценка патогенния ефект на missense мутациите в *MECP2* гена чрез математически предиктор PolyPhen-2.

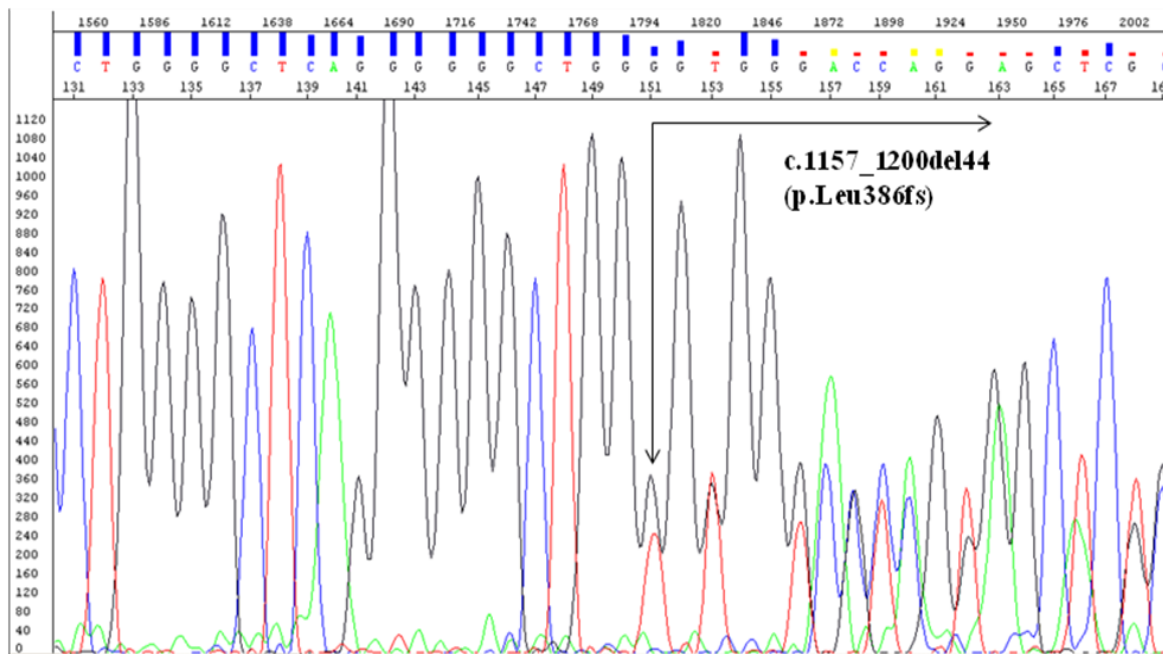
Останалите точкови мутации генерират стоп кодон (nonsense) и по този начин причиняват преждевременно прекратяване на белтъчната синтеза и тежка клинична изява на заболяването.

Интересна находка беше откритата мутация в интрон 2 с.27-8C>G, която според интерактивния биософтуер Alamut Visual v.2.6 повлиява сплайсинга в акцептор сплайс-сайта преди екзон 3 с -49.9% (Фигура 84).



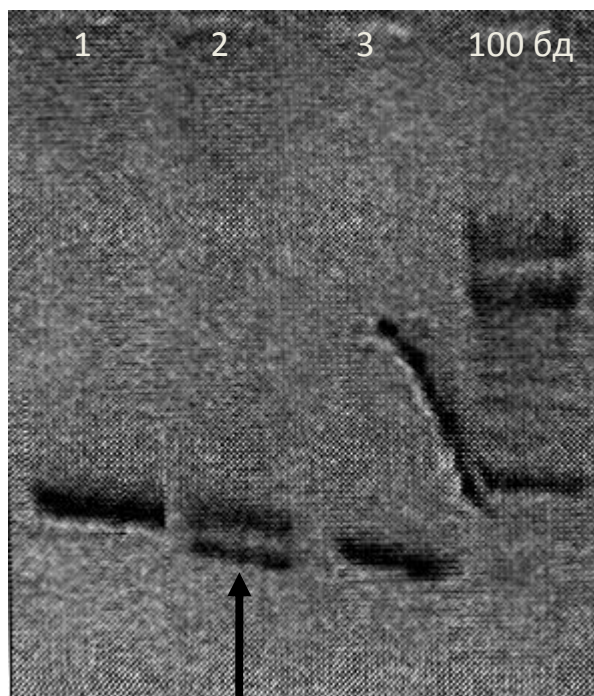
**Фигура 84.** Оценка патогенния ефект на сплайс-сайт мутацията в интрон 2 на *MECP2* гена с.27-8C>G посредством интерактивен биософтуер Alamut Visual v.2.6.

Освен точкови мутации открихме и друг тип дефекти в нашата извадка, като малки делеции, инсерции и комплексни мутационни събития. Делецията на 44 бд с.1157\_1200del44, p.Leu386fs е представена на Фигура 85).



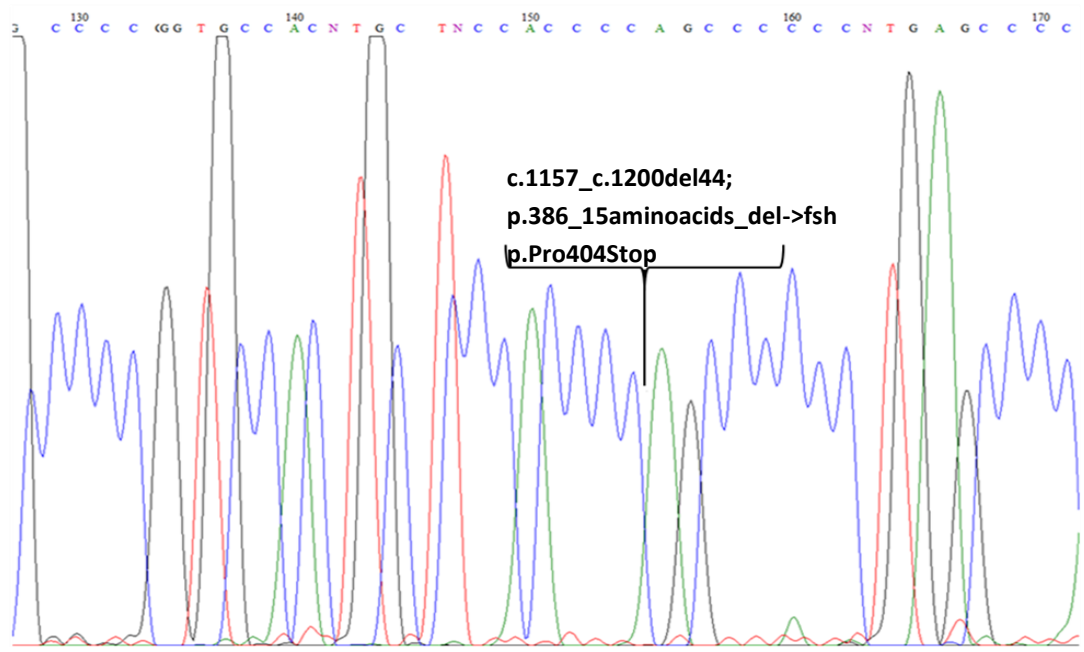
**Фигура 85.** Секвенционен профил на мутацията с.1157\_с.1200del44.

За потвърждаване на тази делеция и прецизно определяне на точната 5' и 3' точка на разкъсване (breakpoint) патологичният делетиран фрагмент беше екстрахиран от агарозен гел (Фигура 86), ре-амплифициран и секвениран (Фигура 87).



1 – Нормална контрола  
2 – Пациент  
3 – Нормална контрола  
100бд – Молекулен маркер

**Фигура 86.** Агарозна електрофореза, показваща нормален и делетиран фрагмент (посочен със стрелка)



**Фигура 87.** Секвенционен профил на мутацията c.1157\_c.1200del44 получен при секвениране на едноверижния фрагмент екстрахиран след разделяне в агарозна електрофореза.

Тази делеция причинява разместване на рамката на четене на генетичната информация и по този начин води до преждевременно прекратяване на белтъчната синтеза. Свързана е с тежка клинична изява на заболяването. Интересно е да се отбележи, че тази делеция попада в един от делеционните „горещи региони” за *MECP2* гена, като в този регион са докладвани делеции на 41, 44, 46 и 70 нуклеотида, както и комплексни мутационни събития като indels [De Bona et al., 2000; Lee et al., 2001]. Ние също открихме втори пациент с делеция в този регион, покриваща 41 нуклеотида (с.1157\_1197del41), която също е свързана с тежка клинична изява на заболяването. По отношение на клиничната изява на тези мутации е важно да се отбележи, че „preserved speech variants” с подобна на RTT клиника също се дължат на делеции на 41 и 44 нуклеотида точно в този регион, което ги определя като алелни форми на класическия RTT [De Bona et al., 2000]. Фактът, че в горещия делеционен регион се случват *de novo* еднотипни мутационни събития, предполага участие на околната секвенция (микросреда) в провокирането на молекулните дефекти. Задълбоченият анализ на околната секвенция, фланкираща делециите в този регион, показва наличието на директни (прави) повтори, които биха могли да провокират приплъзване на полимеразата в хода на репликацията [De Bona et al., 2000]. Микросредата, в която се случва нашата делеция на 44 бази е представена на Фигура 88. Наличието на перфектни и неперфектни директни (прави) повтори в двата фланга на делецията предполагат репликационни приплъзвания на полимеразата, последвани от неточни срязвания и/или снаждания като най-вероятен механизъм за възникване на мутацията.



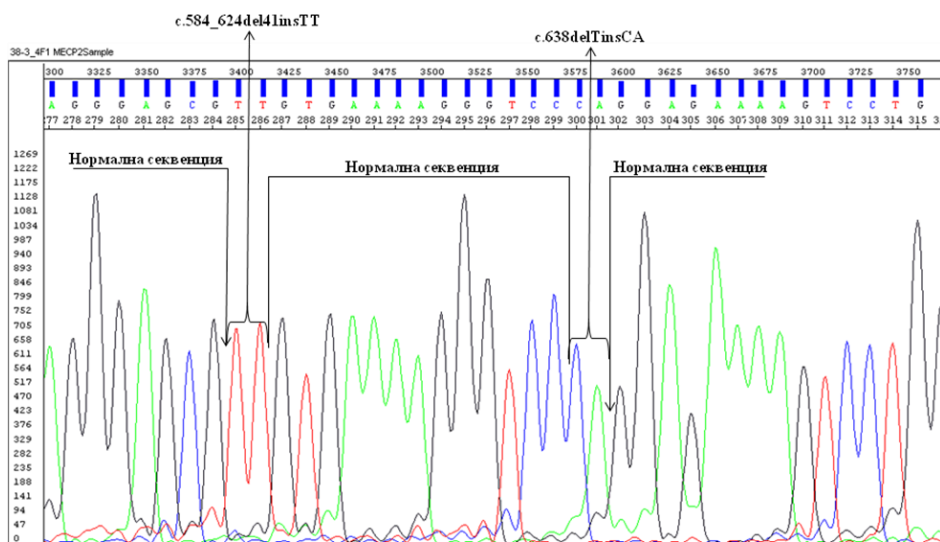
**Фигура 88.** Анализ на околната секвенция в *MECP2* гена в непосредствена близост до 44бд делеция. Делетираните бази са представени в червено. Перфектните и неперфектни прави повтори са оградени.

Друга интересна находка, на която попаднахме в хода на молекулярно-генетичната диагностика на RTT пациенти е комплексно мутационно събитие – комбинация от две инсерции/делеции (indels) – с.[584\_624del41insTT; 638delTinsCA]. Полученият

амплификационен профил при този пациент показваше два фрагмента – един нормален и един по-лек (Фигура 89). Секвенционният анализ показва неизвестен тип мутация, нарушаваща рамката на четене (frameshift). За потвърждаване на мутацията и прецизно идентифициране на типа беше използван аналогичен подход на описания при горната делеция на 44 базови двойки. Полученият мутантен фрагмент беше екстрахиран от агарозния гел, ре-амплифициран и секвениран. Секвенционният анализ на едноверижния фрагмент идентифицира две независими делеционно/инсерционни мутационни събития (indels) в *MECP2* гена (Фигура 90). Това комплексно мутационно събитие беше първата находка от комплексен тип в този ген и имаше своя принос в световната литература [Todorov, Todorova et. al., 2012].



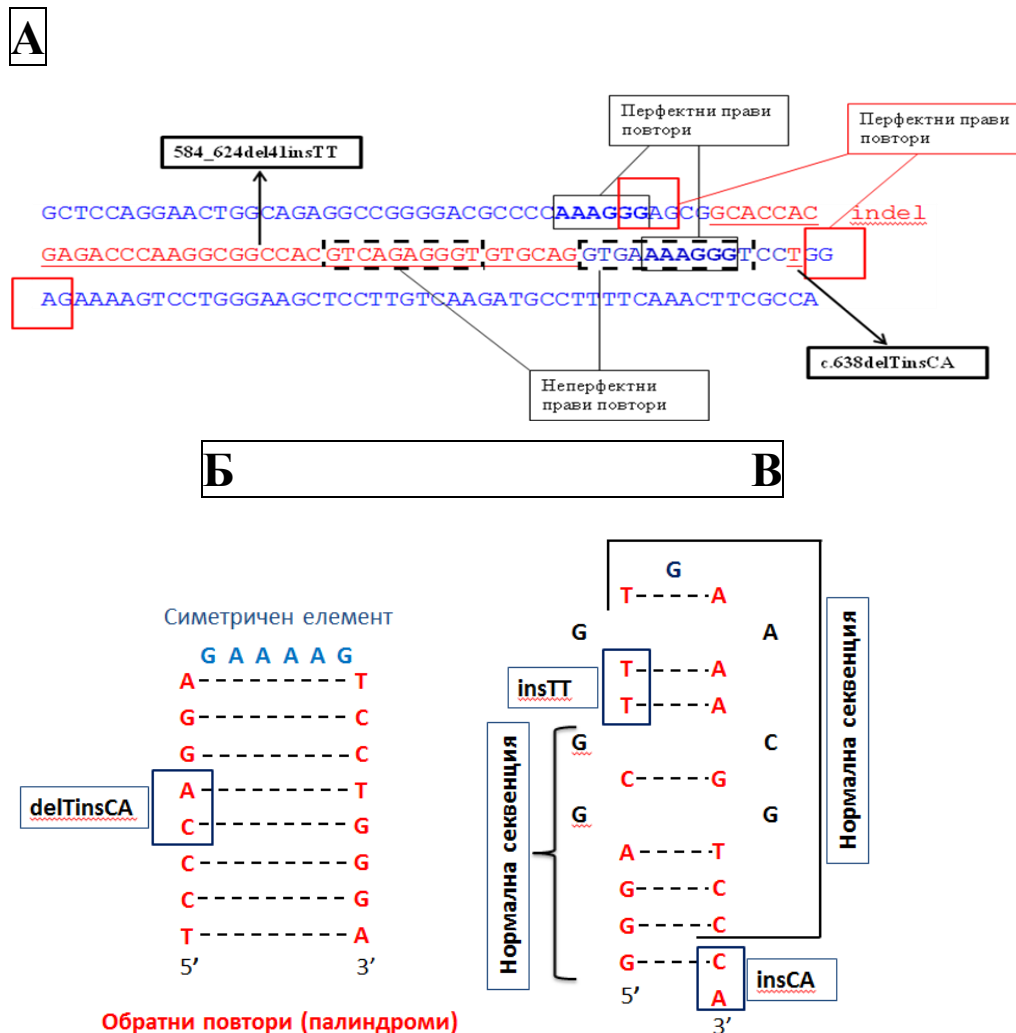
**Фигура 89.** Агарозна електрофореза, показваща нормален и мутантен фрагмент (посочени със стрелки).



**Фигура 90.** Секвенционен профил на едноверижния мутантен фрагмент след екстракция от агарозен гел. Установява се комплексен мутационен профил върху един алел: c.[584\_624del41insTT; 638delTinsCA].

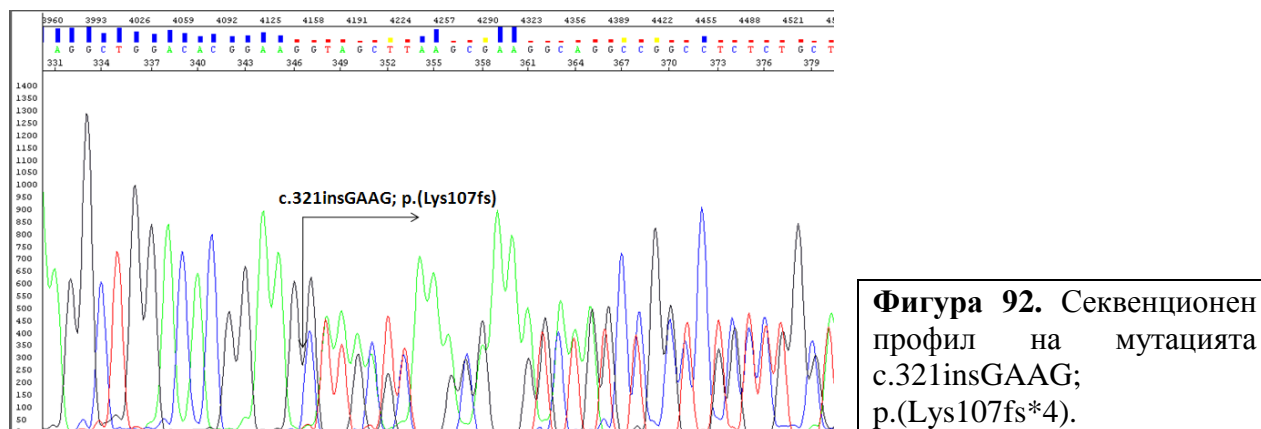
Двете мутационни събития в комплексния indel засягат един алел и най-вероятно са причинени от серия репликационни приплъзвания в права и обратна посока с участието на директни (прави) повтори [Chen et al., 2005]. Такива комплексни генни пренареждания, включващи множество делеционни и инсерционни събития са едни от най-сложните молекулни нарушения, които трудно могат да се обяснят с известните механизми на мутагенеза.

Опит за изясняване механизма на възникване на открития от нас комплексен indel е представен на Фигура 91А, Б, В. Задълбоченият анализ на околната секвенция показва наличието на перфектни и неперфектни директни (прави) повтори и перфектни и неперфектни палиндромы, заграждащи симетрични елементи, с чието участие се описва генерирането на комплексните мутационни преобразувания.



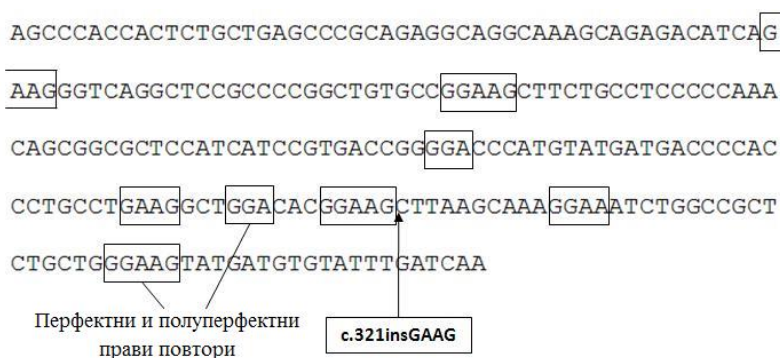
**Фигура 91. (А).** Анализ на секвенцията в непосредствена близост до района с комплексна делеция/инсерция в *MECP2* гена. Делетираните бази са представени в червено и са подчертани. Анализираният прави повтори са оградени. Обърнатите повтори (палиндромы), ангажиращи новоинсерирани нуклеотиди (оградени) са представени на два отделни панела (**Б** и **В**).

Друго интересно мутационно събитие, открито за пръв път при български пациент е инсерцията на 4 бд с.321insGAAG, р.(Lys107fs\*4) в екзон 3 на *MECP2* гена (Фигура 92). Клиничната диагноза при този пациент първоначално е била PWS, поради затлъстяване (с ясно изразена фамилна predisпозиция).



**Фигура 92.** Секвенционен профил на мутацията с.321insGAAG; р.(Lys107fs\*4).

Инсерираните 4 нуклеотида представляват интерес от научна гледна точка, тъй като генерират симетричен елемент GAAGGAAG, чрез повторение на мотива GAAG (Фигура 93). При задълбочения анализ на околната секвенция беше установено изобилие на (G)GA(AG) перфектни и полу-перфектни директни повтори, които биха могли да участват в неправилното сдвояване на веригите и приплъзване на полимеразата, завършващо с инсериране на GAAG мотив [Chen et al., 2005].

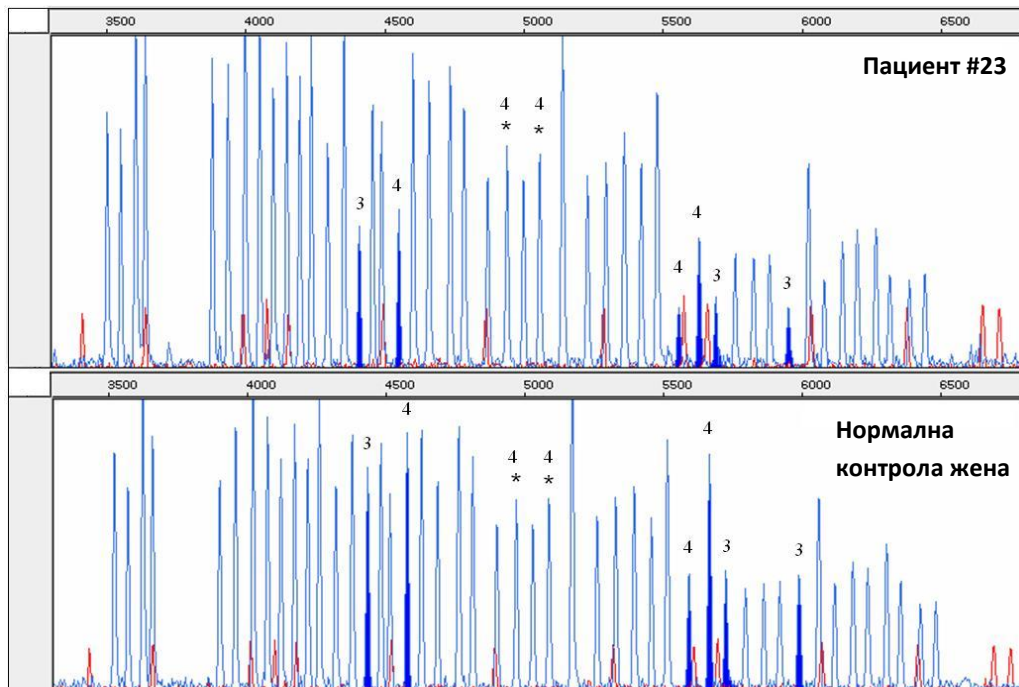


**Фигура 93.** Анализ на околната секвенция в района на 4 бд инсерция в екзон 3 на *MECP2* гена. Инсерираните нуклеотида са заградени, както и наличните перфектни и полуперфектни прави повтори (G)GA(AG) в региона.

Всички описани до тук мутации в *MECP2* гена са свързани с тежка клинична симптоматика, бърза прогресия на заболяването и тежко засягане както на умственото така и на физическото развитие на децата.

### Големи делеции в *MECP2* гена

MLPA анализът доведе до откриване на две идентични големи делеции покриващи целия екзон 3 и част от екзон 4 на *MECP2* гена (Фигура 94).



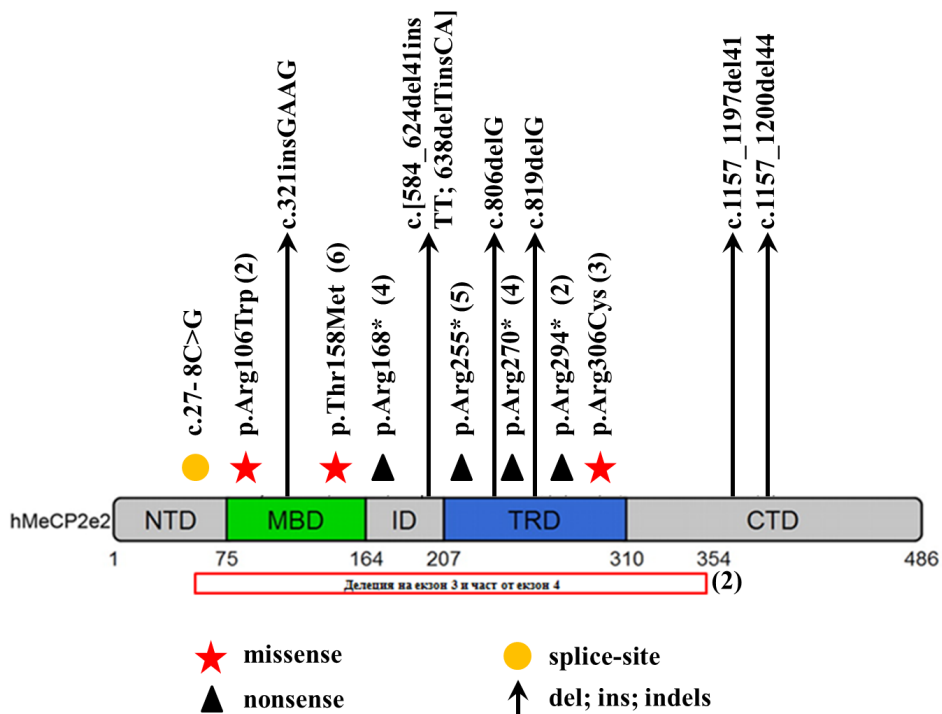
**Фигура 94.** MLPA електрофоретичен профил при пациент с делеция на екзон 3 и част от екзон 4. Делетираните екзони са маркирани в синьо, цифрата над пика показва номера на екзона, в който попада дадената сонда. Двата пика за екзон 4 маркирани със \* не са делетиран; това са двата крайни фрагмента от екзон 4 и 3' нетранслируемия регион.

Резултатите от математическата обработка на делетираните фрагменти са представени в Таблица 15. Получените съотношения за всички делетираните пикове показват стойности  $<0.6$ .

Локализацията на мутациите, открити при нашите пациенти е представена на Фигура 95. Анализът на данните показва, че мутациите са разпръснати по всички домени, като повечето са съсредоточени в двата най-важни функционални домена MBD и TRD.

Таблица 15. Математическа обработка на данните от MLPA анализа

Екзон на <i>MECP2</i> гена	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при пациент	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при контрола	Съотношение на площите на пиковите
3	0.50	0.93	0.54
3	0.28	0.69	0.41
3	0.31	0.83	0.37
4	0.53	1.11	0.48
4	0.26	0.67	0.39
4	0.73	1.27	0.57
4*	1.12	1.08	1.04
4*	0.76	0.81	0.94



Фигура 95. Локализация на мутациите в *MECP2* гена по дължината на белтъчните домени: N-краен домен (NTD), метил-ДНК свързващ домен (MBD), междинен домен (ID), подтискащ транскрипцията домен (TRD) и C-краен домен (CTD). \* - стоп-кодон мутация; в скоби до всяка мутация е показан брой пациенти, носители на съответната мутация.

### Генотип-фенотипни корелации

Поради широките вариации на клиничната картина при тази група пациенти, генотип-фенотипните корелации не са ясно изразени. Изследваните пациенти бяха

разпределени в групи според класическите или атипични клинични критерии и присъствието или отсъствие на епилепсия (Таблица 16).

**Таблица 16.** Класификация на пациентите с RTT според клиничните критерии и присъствие или отсъствие на епилепсия.

<b>Класификация на пациентите с RTT синдром</b>	<b>Пациенти (брой)</b>	<b>Мутации в <i>MECP2</i> (брой)</b>	<b>%</b>
Класически RTT с епилепсия	27	19	70
Класически RTT без епилепсия	20	7	35
Атипичен RTT с епилепсия	14	2	14
Атипичен RTT без епилепсия	10	0	0
Непълни клинични данни	27	7	26
<b>Общо</b>	<b>98</b>	<b>35</b>	

По литературни данни епилепсия се наблюдава при 70% до 90% от пациентите с класически синдром на Rett [Cooper et al., 1998; Steffenbutg et al., 2001]. Въпреки това към момента според последната ревизия на критериите за RTT (виж Таблица 13), епилепсията не участва в основните критерии. При нашите пациенти с класическа форма RTT този процент се оказва съществено по-малък  $27/47=57\%$ . Нашите резултати показваха, че пациентите с класическа форма на RTT и епилепсия два пъти по-често се асоциират с мутации в *MECP2* гена, отколкото пациентите с класически RTT без епилепсия, което съвпада с публикуваните данни [Neul et al., 2010]. Епилепсията може да се счита за симптом, провокиран от нарушаване репресионната функция на MeCP2 протеина спрямо други гени. Това води до свръх-експресия на гени в невроните на ЦНС и до промяна в морфологията на невроните и синаптогенезата. Провокира се хиперактивност на мозъчните неврони и драстично снижаване на епилептичния праг.

При атипичните форми RTT независимо от наличие или отсъствие на епилептична симптоматика мутациите в *MECP2* гена бяха рядка находка ( $2/24=8\%$ ). Това, най-вероятно, се дължеше на факта, че групата пациенти с атипични RTT беше изключително хетерогенна. Оказа се, че в тази група попадат немалко пациенти непокриващи съвременните критерии за синдром на Rett.

Интересно е да се спомене, че докато точковите мутации в екзон 4 на *MECP2* гена водят до тежка клинична симптоматика с епилептични прояви, то делецията на екзон 3 и част от екзон 4 не е свързана с епилепсия и EEG профилът е нормален, поне в началните етапи от развитие на заболяването.

#### **Тест за носителство при родителите на болните деца**

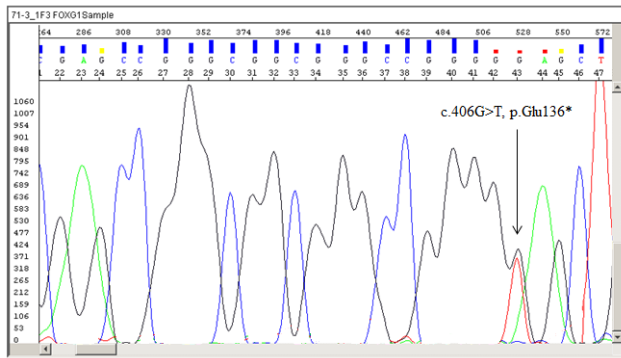
Всички открити мутации в изследваната група пациенти бяха проверени при техните родители. Резултатите показаха, че всички мутации са нововъзникнали при болното дете и не са унаследени от родителите. Тези резултати потвърдиха патологичния характер на откритите генни изменения.

#### **Анализ на други гени при пациенти с клинична диагноза RTT**

Пациентите, които бяха негативни за мутации в *MECP2* гена, в зависимост от клиничните симптоми, бяха скринирани за мутации в други гени, като например *CDKL5*, *FOXG1* и др.

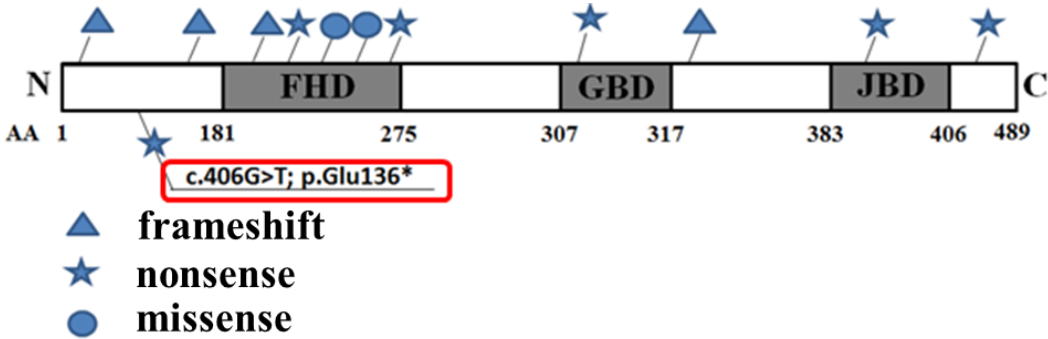
Около 5-10% от случаите с Rett синдром се асоциират с мутации в гена *CDKL5*. От пациентите в нашата извадка, 18 бяха подходящи според клиничната симптоматика за скриниране на *CDKL5* гена, но не бяха открити мутации в този ген.

Следващият прицелен ген беше *FOXG1*, който съгласно клиничните критерии е подходящ за скрининг при пациенти с конгенитален (Rolando) RTT вариант. Особено специфични за този RTT вариант са следните клинични данни: тежка постнатална микроцефалия, регрес на 5 м.в. и начало на гърчовете след начало на психомоторния регрес. Общо 9 пациента бяха подбрани от нашата извадка, като подходящи за скрининг на този ген. Благодарение на подробното и точно клинично описание, молекулярно-генетичната диагностика се увенча с успех. При един пациент беше открита непубликувана nonsense мутация в екзон 1 на *FOXG1* гена: c.406G>T; p.Glu136\* (Фигура 96).



**Фигура 96.** Секвенционен профил на мутацията p.Glu136\* във *FOXG1* гена.

Мутацията, която открихме попада в N-терминалния домен на гена, който при прегледа на публикуваните данни от други автори се оказва, че е сравнително беден на мутации. На Фигура 97 са представени мутациите, които бяха налични към този момент в световната литература. В N-терминалния домен бяха открити преди това само 2 мутации нарушаващи рамката на четене на генетичната информация (frameshift) и стоп-кодон мутацията открита при българския пациент беше единствената по рода си в този регион.



**Фигура 97.** Схематично представяне на публикуваните до тогава мутации в гена *FOXG1*. Представени са функционалните белтъчни домени: ДНК-свързващ домен (DNA-binding forkhead domain - FHD), Gro-свързващ домен (Gro-binding domain - GBD) и KDM5B-свързващ домен (KDM5B binding domain - JBD). Аминокиселинната номерация (AA) е показана под домовете. Различните типове мутации са изобразени със символи. Българската мутация е оградена с червено.

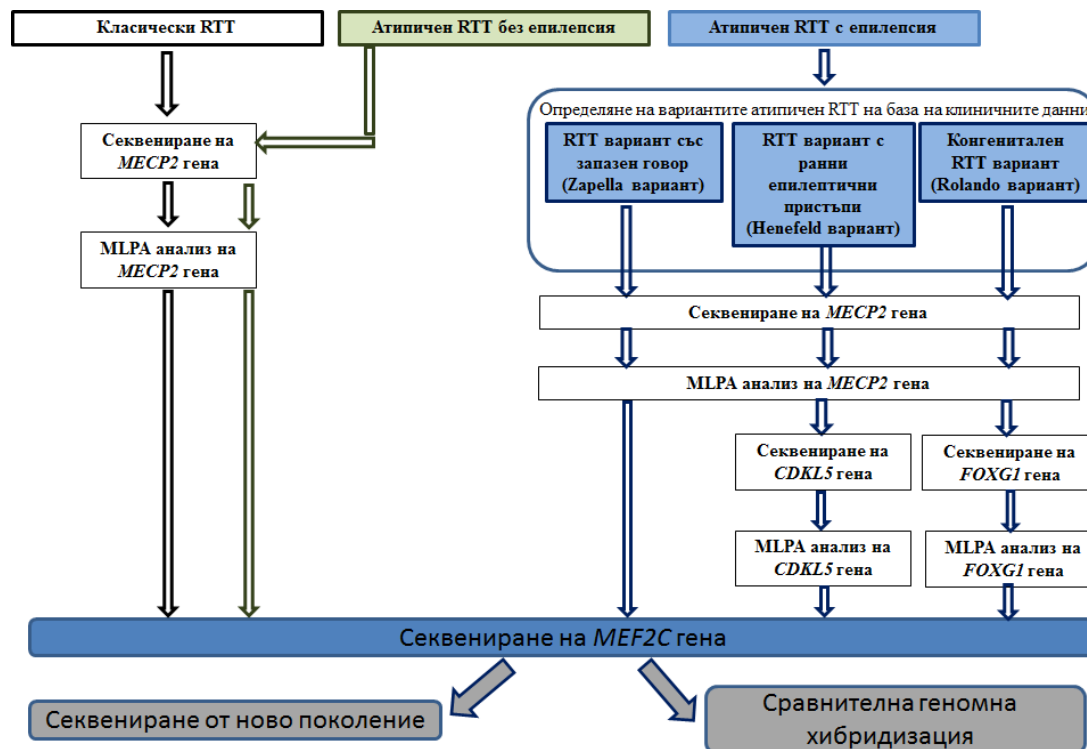
Изследването при двамата родители показва, че откритият дефект е нововъзникнал при пациента.

**4.2.4. Обобщение на получените резултати и заключителни бележки**

За период от 9 години (от 2007 до 2015) бяха скринирани за мутации в *MECP2* гена 98 деца с клинична диагноза типичен или атипичен Rett синдром и диагнозата беше

верифицирана на молекулно ниво при 36%. Този резултат надвишава значително публикуваните данни за периода, според които генетично се изясняваха едва 10-15% от случаите [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM]. Това показва, че нашите пациенти бяха много добре клинично охарактеризирани и правилно подбрани. В допълнение, беше открита и една мутация във *FOXG1* гена при пациент с конгенитален (Rolando) RTT вариант.

На базата на получените резултати разработихме системен подход за молекулярно-генетична диагностика на Rett синдром (Фигура 98).



**Фигура 98.** Системен подход за молекулярно-генетична диагностика на пациенти с RTT. Секвенирането на *MECP2* гена е препоръчително да се извършва на 2 етапа:

- 1) секвениране на екзон 4 на *MECP2* гена, където попадат 91% от мутациите
- 2) секвениране на останалите екзони на *MECP2* гена

Нашите изследвания върху мутациите и механизмите на мутагенеза в *MECP2* гена доведоха до следните заключения:

- 1) Мутациите в този ген възникват *de novo*, причинени от независими мутационни събития, но често засягат едни и същи нуклеотиди или генни региони. При различни пациенти и популации се откриват едни и същи делеции, nonsense и missense замени, което показва наличието на мутационни „горещи точки” [Wan et al., 1999] и предполага прякото участие на околната секвенция във възникването на мутационните събития.

2) Честа находка в този ген са комплексни мутационни събития върху един алел, които биха могли да се обяснят с геномната архитектура на региона, в който попада *MECP2* гена. Този хромозомен сегмент е богат на директни (прави) и обратни повтори в малък брой копия, чието присъствие може да генерира нестабилни ДНК структури, които биха могли да индуцират едноверижни нарушения и прекръстосвания в ДНК, колапс на репликационната вилка и приплъзване на полимеразата [Carvalho et al., 2009; Todorov, Todorova et al., 2012].

#### **4.3. ЕПИЛЕПТИЧНИ ЕНЦЕФАЛОПАТИИ (EARLY INFANTIL EPILEPTIC ENCEPHALOPATHY, EIEE)**

Епилептичните енцефалопатии (ЕЕ) са група от редки заболявания, асоциирана с когнитивни и поведенчески нарушения, както и други нарушения на мозъчната функция. Тази хетерогенна група има множествена етиология като симптоматични мозъчни лезии, метаболитни заболявания или различни генетични синдроми.

Епилептичните енцефалопатии се характеризират със забавяне или регрес на развитието, свързани с иктална и/или интериктална епилептиформна активност. Обикновено тя е по-честа по време на сън [Nabbout & Dulac, 2003a]. Класификацията на епилепсията и терминологията при описване на епилептични пристъпи е въведена от The International League Against Epilepsy (ILAE) Task Force on Classification and Terminology [Engel, 2001]. ILAE дефинира понятието „епилептична енцефалопатия“ като: „състояние, при което се приема, че епилептиформните ЕЕГ абнормалности сами по себе си допринасят за прогресиращо нарушение в мозъчната функция“. Приетата класификация се развива и модифицира, поради което някои заболявания като например „роландова епилепсия“ също могат да се впишат в дефиницията за епилептична енцефалопатия (Epileptic Encephalopathy, EE) [Coppola et al., 1995].

При ЕЕ се наблюдават и тежки когнитивни и поведенчески нарушения. Тези заболявания варират по отношение на начало на заболяването, етиология на заболяването, ниво на невропсихологичен дефицит, ЕЕГ специфичност, тип на пристъпите, прогноза и изход на заболяването. Високото ниво на хетерогенност води до трудности при разпознаването и правилното диагностициране. Друга важна и често срещана особеност е високата резистентност към стандартните епилептични медикаменти. В резултат на това се използват „по-агресивни“ медикаменти при подтискането на интериктални епилептиформни разряди (бензодиазепани, валпроат, ламотрижин), имуномодулираща

терапия (кортикостероиди, имуноглобулин и др.), кетогенна диета и др. Често се обсъжда и хирургическа намеса като опция за лечение.

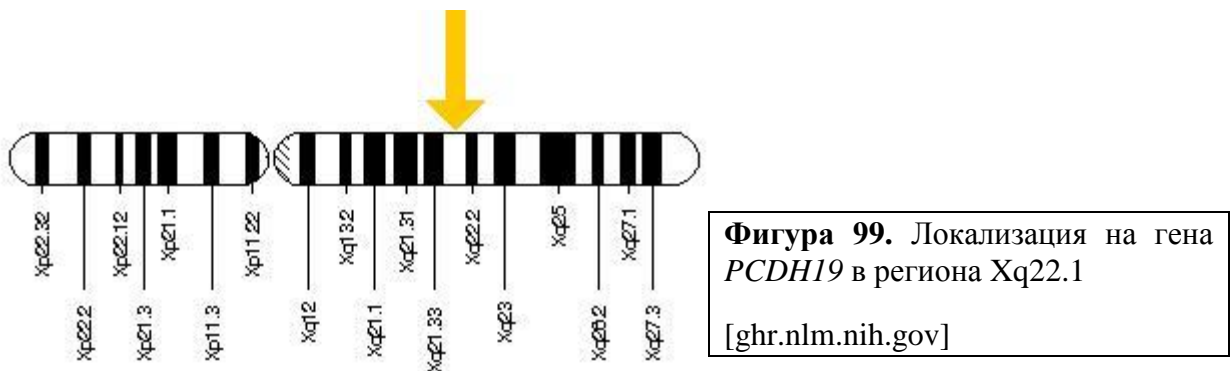
През последните години беше отбелязан значителен прогрес в идентифицирането на гените, мутации в които са отговорни за инфантилни ЕЕ. Сред синдромите с генетична предиспозиция особено интересен е синдромът с епилепсия и интелектуален дефицит лимитиран при жени (Epilepsy and mental retardation limited to females EFMR (OMIM#300088). Това заболяване се класифицира още като ранна инфантилна ЕЕ (EIEE), тип 9 (OMIM#300088).

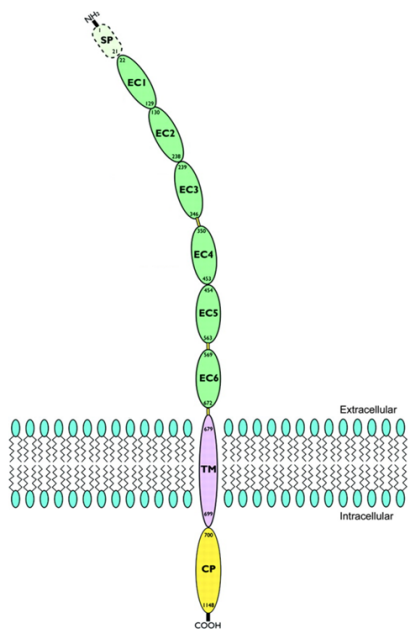
#### 4.3.1. Ранна инфантилна ЕЕ (EIEE), тип 9

##### Клинична картина и молекулни основи

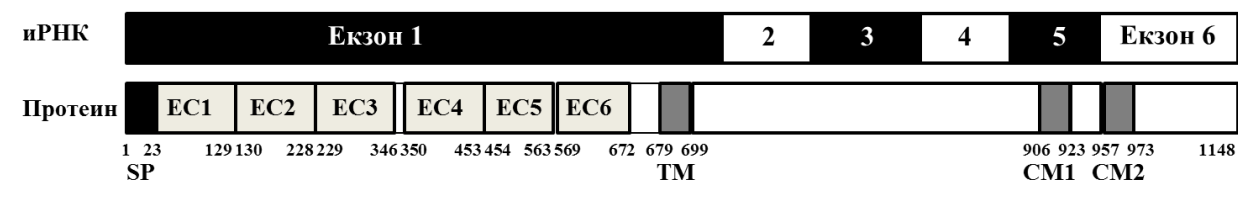
Заболяването се характеризира с пристъпи с ранно начало (6-36 месечна възраст) и когнитивни нарушения. **Клиничните симптоми** са описани преди повече от 40 години [Juberg & Hellman, 1971], като през това време е преописвано [Fabisiak & Erickson, 1990]. Заболяването клинично се припокрива със синдром на Dravet и едва през последните няколко години беше доказано, че се дължи на **мутации в гена *PCDH19*** [Dibbens et al., 2008; Depienne et al., 2009; Dibbens et al., 2011; Depienne et al., 2011].

**Генът *PCDH19*** (OMIM\*300460) е разположен на дългото рамо на X-хромозомата (Xq22.1) (Фигура 99) и е изграден от 6 екзона, първият от които е необичайно голям и кодира всички извънклетъчни домени и трансмембрания домен (Фигура 100).





**Фигура 100.** Структура на *PCDH19* иРНК и протеин.  
 SP: сигнален пептид;  
 ЕС: извънклетъчни кадхеринови домени;  
 ТМ: трансмембранен домен;  
 CM1 и CM2: цитоплазмни домени 1 и 2  
 [www.neurology.org]



**Протеинът**, кодиран от *PCDH19* гена, спада към семейството на Протокадхерините (Pcdhs) и е изграден от 1148 аминокиселини. Тези протеини са трансмембранни протеини, участващи основно в калциево-зависимата адхезия на клетките. При бозайници са открити повече от 70 протокадхеринови гена. На база на организирането им в генома, те се разделят на две големи групи – клъстерни протокадхерини (58 гена) и неклъстерни протокадхерини (13 гена). Обичайната структура на протокадхерините представлява 6 или повече извънклетъчни домена, наречени ектодомени (ЕС), свързващи калциеви йони. ЕС домоените отговарят за хомофилни или хетерофилни взаимодействия между клетките. След ЕС домоените следва трансмембранен домен, последван от специфични цитоплазмни домени (виж Фигура 100) [Yagi & Takeichi, 2000; Patel et al., 2003; Redies et al., 2005; Patel et al., 2006; Morishita and Yagi, 2007].

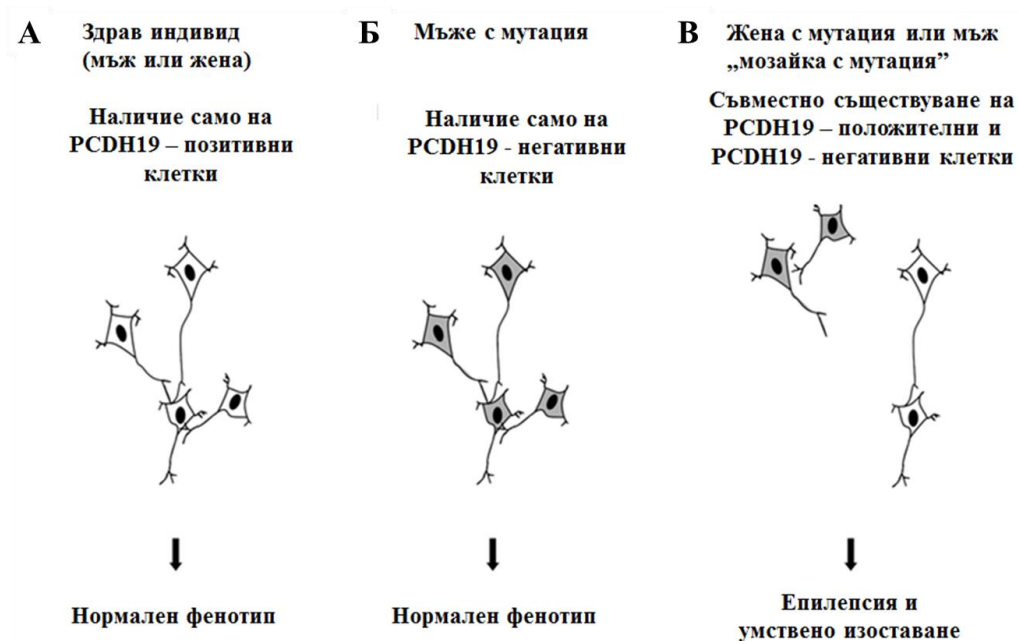
Pcdhs, подобно на много други кадхерини се експресират предимно в мозъка, където играят важна роля при невронната миграция и синаптичната пластичност [Frank and Kemler, 2002; Junghans et al., 2005; Redies et al., 2005; Morishita and Yagi, 2007]. Комбинираната експресия на множество кадхерини отговаря за молекулната специфичност и комплексност на невронните мрежи в церебралния кортекс [Krishna et al., 2011].

Експресията на *PCDH19* се регулира прецизно по време на развитието на централната нервна система. Генът се отличава с уникален експресионен профил сред протокадхерините и се експресира интензивно в развиващия се мозък, включително зони от церебралния кортекс, хипокампуса и субикулума [Vanhalst et al., 2005; Gaitan and Bouchard, 2006; Kim et al., 2007; Kim et al., 2010; Hertel and Redies, 2011; Krishna et al., 2011].

Точните функция и механизъм на действие на протокадхерин 19 към момента не са известни. Известно е, че други протокадхерини доказани *in vitro* и *in vivo* са посредници в калциево-зависимата клетъчна адхезия [Redies et al., 2005] и могат да регулират изграждането на невронни връзки по време на развитието на мозъка и/или ремоделиране на синаптичните контакти по време на ранния постнатален период [Kim et al., 2007]. Въпреки това в контраст с другите кадхерини, които се асоциират със силни хомофилни взаимодействия между клетките, извънклетъчните домени на протокадхерин 19 проявяват специфични, но слаби хомофилни адхезионни взаимодействия. Това предполага, че протокадхерин 19 участва по-скоро с хетерофилните взаимодействия [Biswas et al., 2010; Tai et al., 2010].

**Експресията на X-свързаната EIEE, тип 9** е необичайно. Обикновено мутации в гени, разположени на X-хромозомата се унаследяват и експресират X-рецесивно, при което мъжете са винаги засегнати, а жените са здрави или изявиени носителки, но с много по-лека фенотипна проява.

**Мутациите** в *PCDH19* гена се унаследяват и експресират различно от гореописания модел. Тежко засегнати са жените, които са хетерозиготни носителки на мутация в гена или мъже с мозаечен генотип по отношение на мутацията в *PCDH19* гена; мъжете, хемизиготни носители на мутация са без клинична проява [Dibbens et al., 2008; Depienne et al., 2009; Dibbens et al., 2011; Depienne et al., 2011]. Този специфичен начин на фенотипната изява на X-свързан ген се обяснява чрез механизма на клетъчна интерференция (Фигура 101).



**Фигура 101 (А, Б, В).** Схематично илюстриране на механизма на клетъчна интерференция при нормален и мутантен *PCDH19* ген.

При нормални индивиди се наблюдава хомогенна популация от *PCDH19*-позитивни клетки, при което невроните могат да формират нормална невронна мрежа (Фигура 101А). При мъже с мутация хемизиготността води до получаване на хомогенна популация от *PCDH19*-негативни клетки, при което невроните също успяват да формират нормална невронна мрежа (Фигура 101Б). При жени, хетерозиготни носители на мутация в резултат на случайна X-инактивация или при мъже с мозаечен генотип се получава смесена популация от *PCDH19*-негативни и позитивни клетки (Фигура 101В). Наличието на смесена популация води до различна клетъчна миграция и това не позволява формирането на нормална невронна мрежа. Точните механизми на повлияване формирането на невронната мрежа са все още неясни [Derienne et al., 2009].

Мъже, хемизиготни носители на мутация в *PCDH19* гена обикновено показват нормална когнитивна функция и липса на пристъпи, въпреки че е възможно да се проявят леки психиатрични отклонения [Dibbens et al., 2008]. Липсата на сериозни симптоми при хемизиготни мъже по отношение на мутации в *PCDH19* гена показва, че пълна загуба на функция на протокадхерин 19 не е патогенна. Очевидно, въпреки важната функция на *PCDH19* гена в ранната мозъчна морфогенеза при други видове [Emond et al., 2009], продуктът протокадхерин 19 не е жизнено важен при хора. Най-вероятно това се дължи на компенсирането на неговата функция от други кадхерини или сигнални пътища.

За разлика от мъжете, жените хетерозиготни носителки проявяват пълния фенотип на заболяването. Случайното X-инактивиране на теория води до тъканен мозаицизъм, т.е. съвместно съществуване на клетки, експресиращи мутантен и клетки, експресиращи нормален протеин [Depienne et al., 2009]. Този мозаицизъм вероятно повлиява междуклетъчните взаимодействия или води до нови такива [Ryan et al., 1997; Dibbens et al., 2008; Depienne et al., 2009]. По този начин загубата на функция на клетъчно ниво води до поява на нова функция на тъканно ниво, механизъм наречен „клетъчна интерференция“ [Wieland et al., 2004]. Идентификацията на мъже с фенотипна проява и доказана „мозаечност“ във фибробласти силно подкрепя механизма на клетъчна интерференция [Depienne et al., 2009]. За пълно доказване на теорията е нужно да се открие жена хомозиготен носител (или двоен хетерозиготен носител) на мутация в *PCDH19* гена. За момента не е съобщаван такъв случай в научната литература.

**Nonsense мутации** в *PCDH19* гена водят до загуба на функция. При **missense мутации** се синтезира протеин с променени адхезивни функции. Обикновено тези мутации са в екстрацелуларните домени и повлияват аминокиселини от центъра на свързване с калциеви йони [Patel et al., 2006; Marini et al., 2010].

#### **4.3.2. Ранна инфантилна ЕЕ (ЕИЕЕ), тип 2**

##### **Клинична картина и молекулни основи**

Този тип ЕИЕЕ (ОМIM#300672) се характеризира със забавяне или регрес на развитието, свързани с иктална и/или интериктална епилептиформена активност. Появата на първите симптоми е значително по-ранна (първите 5 месеца) спрямо ЕИЕЕ тип 9, което води до потенциално по-високо отражение върху детското развитие спрямо епилепсиите с по-късно начало.

##### **Молекулни характеристики**

Мутации в гена *CDKL5* се асоциират и с ЕИЕЕ тип 2: ~17% от момчетата с ЕИЕЕ и начало на пристъпите преди 5 месеца [Archer et al., 2006] и ~38% от момчетата с тежък интелектуален дефицит и ЕИЕЕ с много ранно начало [Elia et al., 2008]. Този ген е представен подробно в главата атипичен синдром на Rett. *CDKL5*-свързаните ЕИЕЕ се отличават по няколко белега от RTT като например липса на ясен период на регрес, втрещен поглед и невровегетативни нарушения. Фенотипната изява при момчетата, подобно на RTT е по-тежка, двигателни умения не се развиват [Melani et al., 2011]. Пациентите много рано

манифестираат нарушения в невро-моторното развитие, включително вяло сучене, липса на очен контакт, дори преди поява на първите гърчове. Постепенно се забелязва липсата на целево използване на ръцете, тежко изоставане в развитието и липса на говорни умения [Archer et al., 2006; Elia et al., 2008; Neul et al. 2010; Melani et al., 2011]. Епилепсията се появява под формата на епилептична енцефалопатия с инфантилни спазми и начало между първите дни и четвъртия месец [Archer et al., 2006]. Пациентите показват специфични пристъпи с удължени генерализирани тонично-клонични гърчове с продължителност 2-4 минути, характерни са специфични ЕЕГ абнормалности [Melani et al., 2011]. Все още не е известно дали тези специфични ЕЕГ находки с необичайни инфантилни спазми са уникални за мутации в *CDKL5* гена или се дължат на епилепсията в много ранна възраст (първите дни от живота).

Въпреки наличието на специфичен фенотип, различен от този на РТТ, разграничаването на пациентите с атипичен РТТ и епилептични енцефалопатии с ранно начало среща редица трудности.

#### **4.3.3. Собствени резултати**

Благодарение на усилена интердисциплинарна колаборация между невролози (Доц. Петя Димова, МБАЛ „Св. Иван Рилски“) и генетици стана възможно да се преразгледат клинично пациенти с неясен тип епилепсии с ранно начало и подбрахме пациенти, отговарящи на ЕИЕЕ тип 9 и тип 2 [Киров, 2013, докторска дисертация].

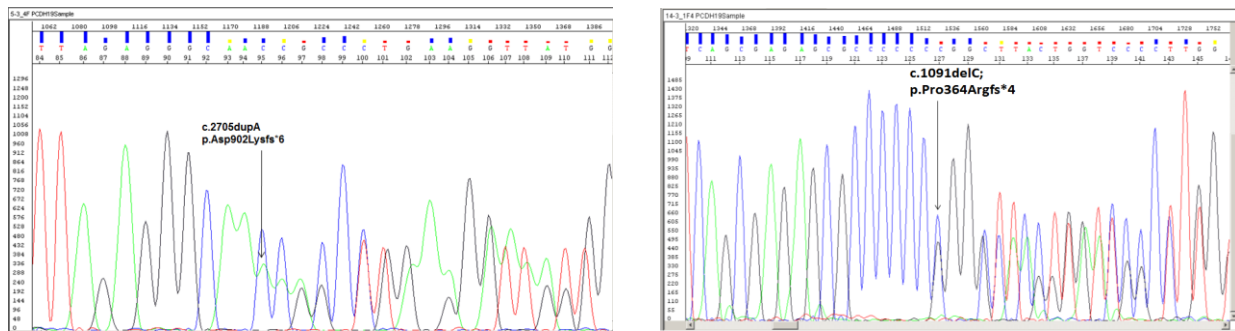
При избраната група от 11 пациентки бяха проведени молекулярно-генетични изследвания на *PCDH19* и/или *CDKL5* гените в зависимост от манифестираните симптоми. Технологично, генетичното изследване беше проведено посредством секвенционен анализ на двата гена (*PCDH19* и *CDKL5*). Пациентките, които бяха скринирани за мутации в *PCDH19* гена проявяваха пристъпи с ранно начало (6-36 месечна възраст) и когнитивни нарушения, като епилептичните гърчове предшестваха появата на интелектуалния дефицит. Пациентките, скринирани за мутации в *CDKL5* гена проявяваха по-тежък фенотип: гърчове с по-ранно начало (преди 6 месечна възраст или веднага след раждането). Седем пациентки бяха скринирани и за двата гена. Откритите мутации са представени в Таблица 17. Бяха открити две мутации в *PCDH19* гена: с.2705dupA; p.Asp902Lysfs\*6 и с.1091delC; p.Pro364Argfs\*4 (Таблица 17 и Фигура 102).

**Таблица 17.** Мутации в гените *PCDH19* и *CDKL5* при български пациенти с епилептична енцефалопатия с ранно начало.

№	Диагноза	Ген	Нуклеотидна замяна	Ефект на ниво белтък
1	EIEE 9	<i>PCDH19</i>	c.2705dupA	p.Asp902Lysfs*6
2	EIEE 9	<i>PCDH19</i>	c.1091delC	p.Pro364Argfs*4
3	EIEE 2	<i>CDKL5</i>	c.539C>T	p.Pro180Leu
4	EIEE 2	<i>CDKL5</i>	c.825+1G>T	сплайсинг ефект

\*-стоп кодон

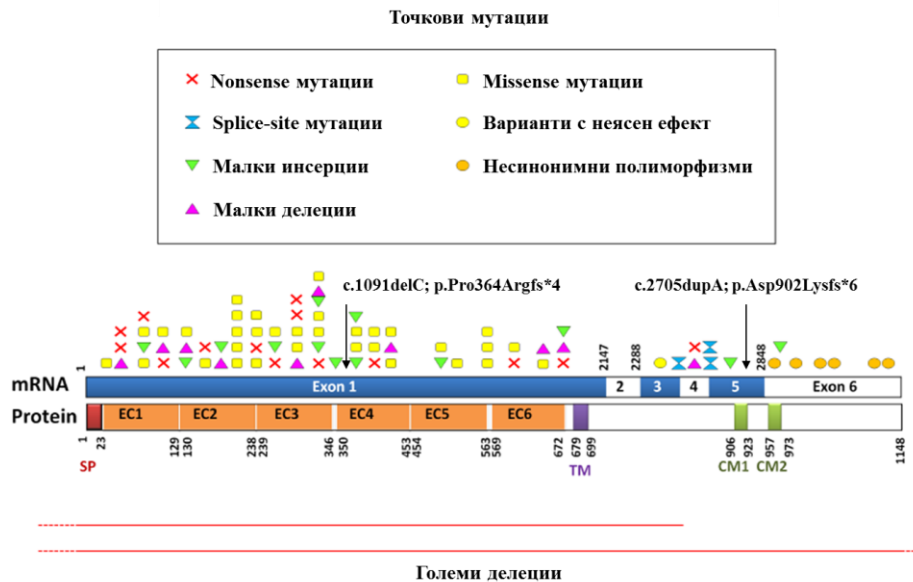
И двете мутации са тежки, нарушаващи рамката на четене на генетичната информация. По онова време имаше много малко случаи на ЕЕ асоциирани с мутации в *PCDH19* гена, поради което нашите резултати представляваха интересни находки от научна гледна точка и бяха публикувани в *Pediatric Neurology* [Dimova et al., 2012].



**Фигура 102.** Секвенционен профил на мутации в *PCDH19* гена.

Мутацията c.2705dupA е локализирана в екзон 5 на гена, докато повечето съобщавани мутации до тогава бяха съсредоточени в екзон 1 [Jamal et al., 2010; Depienne et al., 2011]. На Фигура 103 представихме схематично известните до тогава мутации в *PCDH19* гена, заедно с откритите 2 мутации при нашите пациенти. Екзон 5 кодира двата цитоплазмени домена, които са силно консервативни еволюционно [Hynes et al., 2010; Jamal et al., 2010] и там попадат много малко от известните мутации, включително и нашата c.2705dupA.

Втората мутация, която открихме в този ген, делеция на един нуклеотид c.1091delC, попада в екзон 1 на гена, в региона кодиращ екстрацелуларен домен 4 на протеина.



**Фигура 103.** Локализация на мутациите в *PCDH19* гена по литературни данни. Българските мутации са посочени със стрелки.

### **Тест за носителство на откритите *PCDH19* мутации при родителите на болните деца**

Мутацията c.2705dupA беше изследвана при родителите и беше установено носителство на същия генетичен дефект при асимптоматичната майка. Тази находка промени нашите представи до момента за експресия на мутациите в *PCDH19* гена, съгласно феномена на клетъчна интерференция. Майката не беше съобщено да манифестира пристъпи, имаше нормално интелектуално развитие (IQ 98) и ЕЕГ в будно състояние и по време на сън не показваше отклония. Този случай беше първият по онова време, който беше в противоречие с хипотезата за клетъчна интерференция, обясняваща така добре асимптоматичните носители на мутации в *PCDH19* гена. Към днешна дата, това все още е един от малкото известни в света случаи на подобно унаследяване на мутация в *PCDH19* гена. Обикновено при фамилен случай мутацията се унаследява от клинично здрав баща или майка с по-лека клиника [Derienne et al., 2009]. По-леката клиника при майката се обяснява с наличие на клетки експресиращи преимуществено мутантния или нормалния протеин, а не очакваните смесени протеини [Dibbens et al., 2011]. При баща носител, мутацията е без фенотипна изява поради липса на смесен тип протеини, съгласно механизма на клетъчна интерференция.

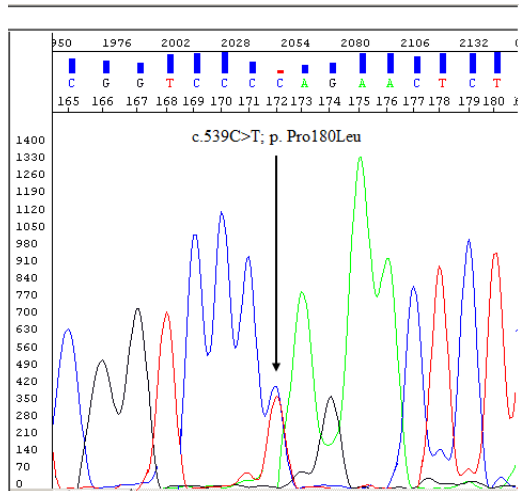
Секвенционните профили при изследваната пациентка и нейната майка бяха абсолютно идентични и не подсказаха наличие на мозайцизъм при майката, което би могло

да обясни преимуществена експресия на един тип протеин и липса на клинична изява. Тогава, единственото логично обяснение за липсата на фенотипна изява при асимптоматичната майка беше неслучайна X-инактивация в съотношение по-голямо от 30:70 или 20:80, което не би позволило изява на клетъчна интерференция и прехвърляне на минималния праг за отключване на епилепсия. Преимществена инактивация на едната X-хромозома спрямо другата в съотношения като 70:30 или 80:20 се предполагаше, че би могло да има отношение към изява на по-лек фенотип, отколкото случайната (50:50) X-инактивация, асоциирана с максимална степен на клетъчна интерференция [Depienne et al., 2011]. В нашия случай, само пълна липса на клетъчна интерференция, в комбинация с други генетични и епигенетични фактори можеше да обясни липсата на фенотипна изява при майката.

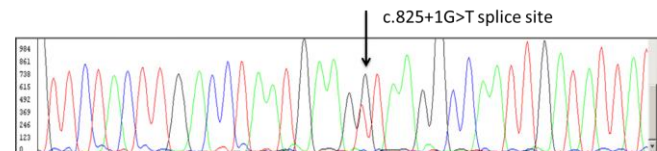
При второто дете с мутация с.1091delC в *PCDH19* гена не беше достъпен биологичен материал от родителите и поради това не бяха проведени изследвания за изясняване унаследяването на тази мутация.

На базата на нашите резултати и резултати от други проучвания [Hynes et al., 2010; Marini et al., 2010; Depienne et al., 2011; Higurashi et al., 2011; Specchio et al., 2011] заключихме, че генът *PCDH19* е добър прицелен ген за изследване при спорадични случаи характеризиращи се с ранни епилептични гърчове и начало в детска възраст, изоставане в невро-психичното развитие, поведенчески отклонения и фебрилно-индуцирани гърчове при пациенти от женски пол.

Вторият ген, който изследвахме при пациенти с епилептична енцефалопатия с ранно начало беше генът *CDKL5*. Бяха открити две мутации в *CDKL5* гена: с.539C>T; p.Pro180Leu и с.825+1G>T (Таблица 17 и Фигура 104). Мутацията p.Pro180Leu заменя една аминокиселина с друга, което наложи нейната софтуерна обработка за оценка на патогенния ефект върху белтъчната функция (Фигура 105).

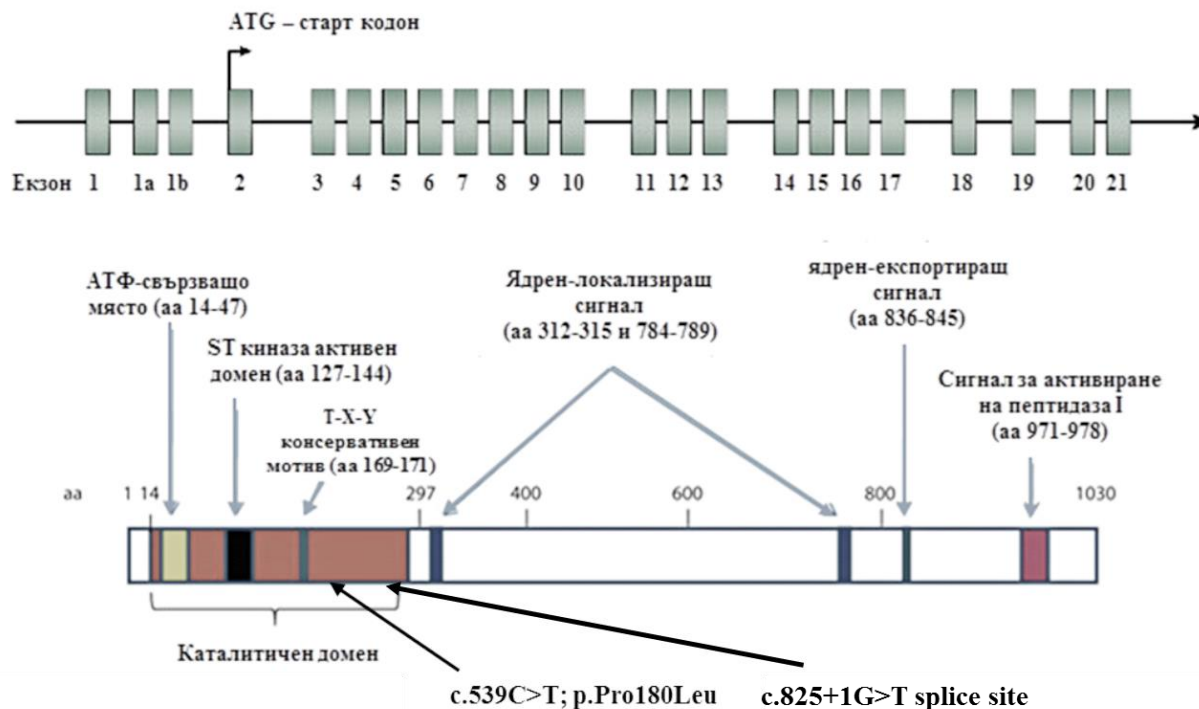


**Фигура 104.** Секвенционен профил на откритите мутации в гена *CDKL5*.



**Фигура 105.** Резултати от софтуерна обработка на мутацията p.Pro180Leu в *CDKL5* гена  
Interactive BioSoftware Alamut v.2.2e.

Мутацията засяга еволюционно консервативна аминокиселина и математическите модели показват сравнително висока вероятност за патогенност (MutationTaster: disease causing (p-value: 0.684). Друго доказателство за патогенния ефект на тази замяна върху белтъчната функция е локализацията на мутацията в каталитичния домен на протеина (Фигура 106). Мутацията беше и публикувана като патогенна в базата данни UniProt - UniProtKB/Swiss-Prot O76039.



**Фигура 106.** Структура на *CDKL5* протеина и разположение на откритите при български пациенти мутации в *CDKL5* гена.

Втората мутация в *CDKL5* гена c.825+1G>T засягаше +1 позицията на консервативния донор сплайс-сайт и не се нуждаеше от допълнителни доказателства за патогенния ѝ характер. Тази мутация също попада в каталитичния домен на протеина (виж Фигура 106) и се очаква да има съществен патогенен ефект върху белтъчната функция.

#### **Тест за носителство на откритите *CDKL5* мутации при родителите на болните деца**

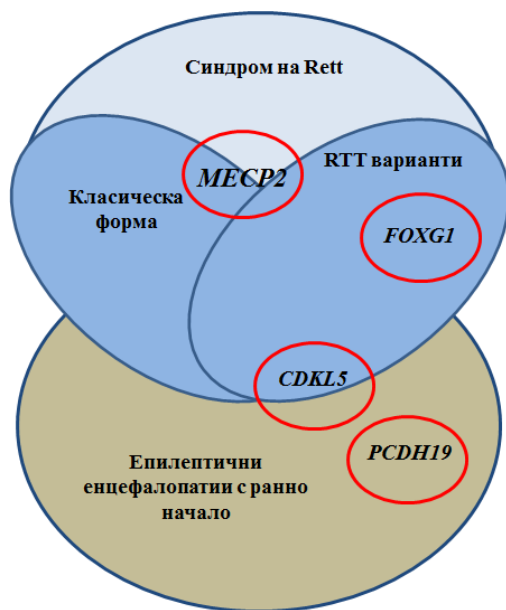
И в двете семейства, при които открихме мутации в *CDKL5* гена, родителите бяха негативни, което потвърди очакванията, че мутациите са *de novo* възникнали при засегнатите деца.

#### **4.3.4. Обобщение на получените резултати и заключителни бележки**

За изминалия период от около 5 години (2011-2015) подбрахме 11 момичета, които отговаряха на стриктните критерии за клинична диагноза епилептична енцефалопатия с ранно начало. След като скринирахме двата кандидат гена *PCDH19* и *CDKL5* открихме мутации при 4 деца (по 2 мутации във всеки прицелен ген). Общо 36% от ЕЕ с ранно начало бяха изяснени на молекулно ниво. Този процент беше много висок, за което основна

заслуга имаше водещият клиницист доц. Петя Димова, която подбра таргетната група. Клиничната интерпретация на ЕЕ често е затруднена, поради изключителната хетерогенност на заболяването. Провеждането на генетични изследвания често цели прецизиране на диагнозата, подбор на правилна терапия и адекватна медико-генетична консултация в семейството.

От генетична гледна точка проблемът също не е лесен за решаване. Огромен (непрекъснато нарастващ) брой гени се асоциират с тези синдроми. Мутации в един и същи ген биха могли да водят до различни заболявания с припокриваща се, но и специфична симптоматика, както и сходна клинична симптоматика може да е провокирана от мутации в различни гени (Фигура 107). Молекулярно-генетичните изследвания често са скъпи, трудоемки и нерядко се налага изследването на повече от един ген при конкретен пациент. Като цяло процентът на клинично верифицираните случаи при епилепсии с ранно начало е нисък.

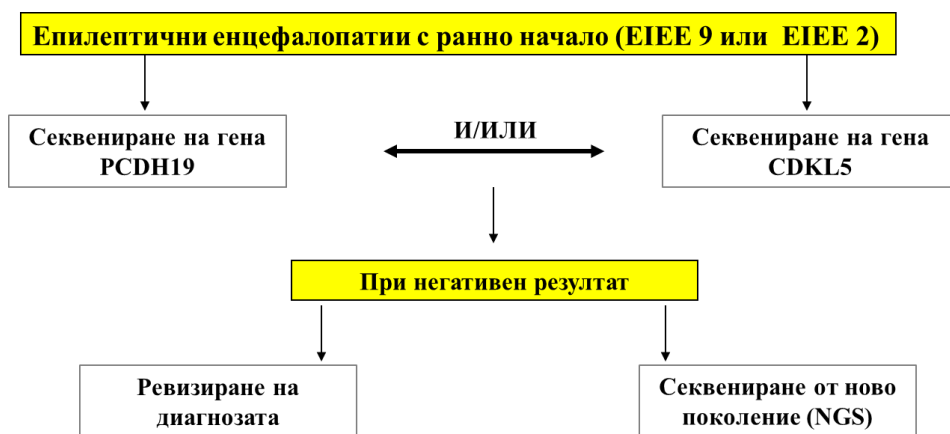


**Фигура 107.** Клинично и генетично припокриване на епилептични енцефалопатии и различни форми RTT синдром.

Останалите пациенти с все още неясна генетична причина подлежат на бъдещи клинични прекласификации съгласно непрекъснато променящите се критерии и представляват подходящ обект за допълнителни генетични изследвания, например секвениране от ново поколение (NGS). Комплексният подход към тази група заболявания е наложителен, като непрекъснато се ревизира и прецизира клиничната диагноза. Клиничната хетерогенност е пряко свързана с генетична хетерогенност като в допълнение се намесват и епигенетични фактори. Това налага непрекъснато адаптиране на системния подход за

молекулярно-генетични изследвания при дадена патология съгласно новите познания за генотип-фенотипните корелации. Актуалният за момента системен подход е представен на Фигура 108.

Най-важният урок, който научихме в битката с епилептичните енцефалопатии е, че в рамките на едно семейство, носители на една и съща мутация от един и същи пол могат да бъдат както асимптоматични, така и с изключително тежка епилептична симптоматика. Допълнителният ефект на други генетични и епигенетични фактори е безспорен, но за момента можем само да подозираме тяхната намеса. Това затруднява изключително много медико-генетичното консултиране в засегнатото семейство.



**Фигура 108.** Системен подход за молекулярно-генетична диагностика на пациенти с ЕЕ.

#### 4.4. СИНДРОМ НА DRAVET (DS)

Синдромът на Dravet (DS) или Severe Myoclonic Epilepsy in Infancy (SMEI, OMIM#607208) се причисли към спектъра на генерализираните епилепсии с фебрилни гърчове плюс (Generalized Epilepsy with Febrile Seizures Plus, GEFS+) през последните няколко години. Синдромът на Dravet е рядка епилептична енцефалопатия (честота: 1/20 000 – 1/40 000), по-често наблюдавана при момчета (съотношение мъже:жени – 2:1) [Dravet et al., 2002].

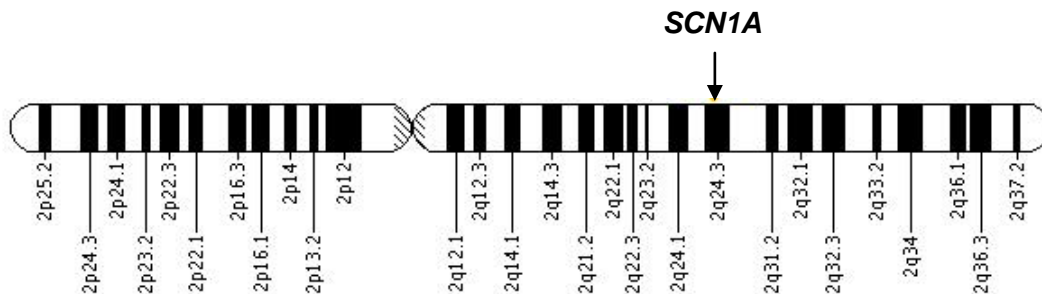
##### 4.4.1. Клинична картина и лабораторни изследвания

Началото на болестта е през първата година от живота с фебрилни, често продължителни спазми. Скоро след тях се добавят нови фебрилни и афебрилни генерализирани-тонично клонични или клонични пристъпи със склонност към епилептични статуси. Често се наблюдава забавяне в психомоторното развитие и атаксия. Синдромът на

Dravet често е неподатлив на лечение, с неблагоприятен често летален изход [Dravet et al., 2002].

#### 4.4.2. Молекулни основи

Класическата форма на синдром на Dravet се асоциира с мутации в ***SCN1A*** гена (OMIM\*182389), локализиран на хромозома 2q24.3 [Malo et al., 1994] (Фигура 109). Генът се състои от 26 екзона и покрива 84479 бази от човешкия геном [<http://genome.ucsc.edu>].

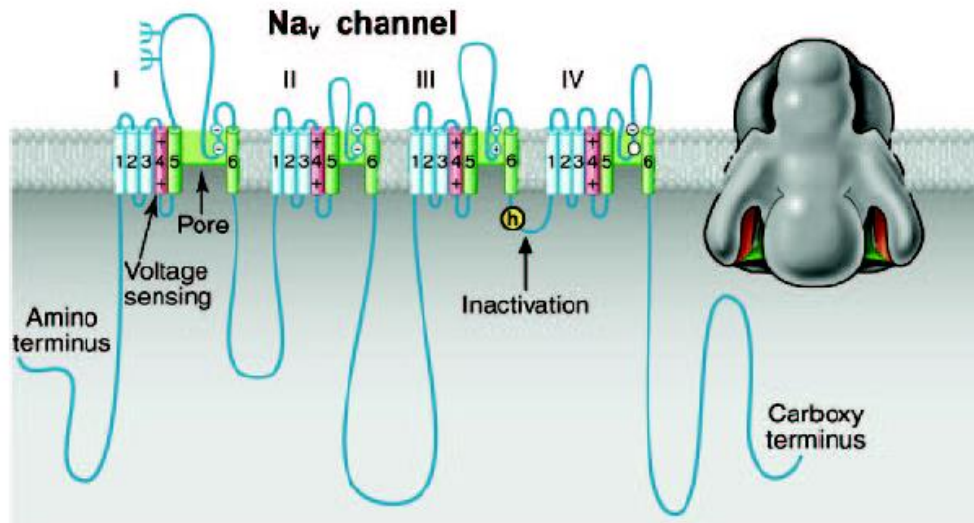


**Фигура 109.** Локализация на *SCN1A* гена (Sodium Channel, Neuronal Type I, Alpha Subunit gene) върху 2q24.3-хромозома [<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/SCN1A>]

**Белтъчният продукт** е алфа-субединица тип 1 на натриевия канал. Секвенцията на човешката алфа-субединица тип 1 на натриевия канал е високо консервативна и е 98% идентична с тази при плъх [Plummer and Meisler, 1999]. Белтъчният продукт на гена *SCN1A* се експресира в невроните на централната и периферна нервна система [Escaug et al., 2000; Escaug et al., 2001]. Предполага се, че разположението на тази субединица в началните сегменти на аксона и прищъпванията на Ранвие, правят тази субединица критична в контрола на генерирането и разпространението на акционния потенциал [Duflocq et al., 2008; Reid et al., 2009].

**Алфа 1 субединицата** на натриевите канали е голям, трансмембранен белтък съставен от 2,009 аминокиселини остатъка, изграждащи четири хомоложни домена (DI-DIV), всеки от които съдържа шест трансмембранни сегмента (S1-S6) [Yu et al., 2005]. Сегментите S5 и S6 заграждат пората на канала (Фигура 110), а S4 съдържа няколко положително заредени аминокиселинни остатъка и играе роля на волтажен сензор. Трансмембранните сегменти (S1-S6) са високо консервативни в течение на еволюцията. Късият вътреклетъчен участък свързващ домените DIII и DIV служи за инактивация на

пората, нагъвайки се в каналната структура и блокирайки пората отвътре по време на продължителната деполяризация на мембраната [Catterall et al., 2005].



**Фигура 110.** Структура на волтаж-зависим натриев канал. Ляво, схематично представяне на ( $\alpha$ )-субединицата на натриевия канал. С римски цифри са означени хомоложните домени (I-IV). Алфа-верижните трансмембранни сегменти S5 и S6 и поровият участък между тях са означени в зелено. Положително зареденият S4 сегмент е маркиран в лилаво [Noda et al., 1989; Heinemann et al., 1992]. В дясно е представена електронно микрографската 3D-структурата на NaV  $\alpha$ -субединицата в резолюция 20Å. Адаптирано по Sato et al. [2001] и Yu and Catterall [2004].

### Мутации в SCN1A гена

Първата мутация в *SCN1A* гена е описана през 2000г. [Escayg et al., 2000] и до сега са публикувани над 200 мутации и асоциираната с тях клиника при пациенти с епилепсия, а над 600 варианта са съобщени в *SCN1A* - базата данни изградена във VIB Department of Molecular Genetics, Antwerp, Belgium [<http://www.molgen.ua.ac.be/SCN1AMutations/>]. Има описани фамилни случаи, като най-честите фамилни мутациите са missense [Mulley et al., 2005; Lossin, 2009; Kanai et al., 2009], но в последствие са съобщени и nonsense фамилни мутации [Orrico et al., 2009].

През 2001г. за първи път бяха описани пациенти с Dravet синдром и с *de novo* мутации в *SCN1A* [Claes et al., 2001]. В последствие при последващи изследвания на колективи от цял свят е установено, че при приблизително 70-80% от пациентите със синдром на Dravet се открива мутация в *SCN1A* гена [Claes et al., 2001; 2003; Sugawara et al., 2002; Ohmori et al., 2002; Fujiwara et al., 2003; Nabbout et al., 2003b; Annesi et al., 2003;

Wallace et al., 2003; Fukuma et al., 2004; Ceulemans et al., 2004; Kimura et al., 2005; Marini et al., 2006].

Интересно е да се отбележи, че 95% от мутациите, описани досега, са *de novo SCNIA* мутации (настъпващи по време на мейозата) [Singh et al., 2001; Sugawara et al., 2002; Ceulemans et al., 2004]. Установено е, че мутациите водят до скъсен (“truncating”) и неефективен (“loss-of-function”) протеин или до инактивиране на едното копие на гена (haploinsufficiency) и оттам до загуба на функцията на натриевите канали. Най-често откриваните дефекти са missense мутации (~40%), останалите са вътрегенни делеции, nonsense мутации и мутации засягащи сплайсинга [Harkin et al., 2007; Lossin et al., 2009; Scheffer et al., 2009]. Няколко от missense мутациите намерени при пациенти с DS също водят до загуба на функцията [Lossin et al., 2003]. Бяха описани и делеции и дупликации на цели екзони при 10% от децата негативни за точкови мутации в гена [Mulley et al., 2006; Marini et al., 2007, Marini et al., 2009]. По-големите делеции могат да включват както целия *SCN1A* ген, така и съседни гени, които в някои случаи могат да доведат до появата на дисморфични белези в зависимост от засегнатия допълнителен ген [Suls et al., 2006; Madia et al., 2006; Wang et al., 2008].

Описани са и мутации предадени от асимптоматични родители или родители с леки симптоми, които са предимно от missense тип, но в малък брой случаи са описани и “truncating” мутации, които също са унаследени [Fujiwara et al., 2003; Nabbout et al., 2003b; Mulley et al., 2005; Kimura et al., 2005]. Наличието на членове на семейството с лек GEFS+ фенотип предполага, че фамилната *SCN1A* missense мутация е само един от няколко възможни гени допринасящи за заболяването в семейството. Възможно е гени модификатори да оказват влияние при тежко засегнатите индивиди в семейството, проявяващи клинична картина на синдрома на Dravet [Scheffer et al., 2009]. Допълнителен утежняващ фактор може да се окаже наличието на мозаицизъм в соматичните или половите клетки, допринасящ за фенотипната вариабилност в рамките на GEFS+. Докладвани са няколко случая на семейства с по две деца със синдром на Dravet, при които изглежда, че *SCN1A* мутацията е *de novo* [Morimoto et al., 2006; Marini et al., 2006; Gennaro et al., 2006; Depienne et al., 2006; Scheffer et al., 2009]. При подробен молекулярно-генетичен анализ е установен мозайцизъм на мутацията при единия родител, който е здрав носител или има лек GEFS+ фенотип, например фебрилни гърчове. Феноменът на родителския мозаицизъм може да се окаже от голямо значение при генетичното консултиране на синдром на Dravet [Scheffer et al., 2009].

#### **4.4.3. Генотип-фенотипни корелации**

Бързото увеличаване на броя публикувани мутации в *SCN1A* гена позволи търсенето на **генотип-фенотипни корелации**. Генетичните дефекти намерени в *SCN1A* са разпръснати по цялата дължина на гена, но все пак се наблюдава известно групиране на мутациите в С-крайния участък, важен за локализацията на канала в мембраната на аксона и в района между сегментите S5 и S6 на първите три домена на белтъка [Gambardella and Marini, 2009]. Известно струпване на мутации се забелязва и в N-крайния участък [Scheffer et al., 2005]. Missense мутациите в поровия участък между S5–S6 трансмембранните сегменти на всички домени са отговорни за изявата на тежък Dravet фенотип. Фамилните *SCN1A* мутации, предствляващи 10% от GEFS+ пациентите [Escaug et al., 2000; Wallace et al., 2001], най-често са missense мутации разположени извън поровия район и променящи само кинетиката на канала [Kanai et al., 2004; Mulley et al., 2005]. Някои мутации възникват спонтанно при различни пациенти [Gambardella and Marini, 2009]. Има докладвани случаи на еднакви *SCN1A* мутации при пациенти със синдром на Dravet и GEFS+. Това показва, че все още връзките генотип-фенотип при GEFS+ са неясни. Ясно е обаче, че мутациите в *SCN1A* гена променят действието на йонните канали предизвиквайки постоянен вътрешен поток на Na-йони. Това води до повишаване възбудимостта на мембраната на невроните и причинява продължителната ѝ деполяризация, което представлява основния биофизичен механизъм отговорен за наследствените епилепсии [Lossin et al, 2002]. Функционалните дефекти варират от загуба до придобиване на функция на канала.

#### **4.4.4. Собствени резултати**

Молекулярно-генетичната диагностика на синдром на Dravet следва стандартния ход на секвениране на *SCN1A* гена и последващ MLPA анализ за големи делеции и дупликации по дължината на гена [Йорданова, 2013, докторска дисертация]. За изминалия период от около 5 години бяха насочени 29 деца с предполагаема клинична диагноза DS, GEFS+ или МАЕ (миоклонична астатична епилепсия) за *SCN1A* скрининг. Мутации в гена *SCN1A* бяха открити при 9 деца. Резултатите са представени в Таблица 18. От таблицата прави впечатление, че групата е интернационална. От изследваните 29 деца 7 бяха от арменски произход и от тях при 5 диагнозата DS беше потвърдена на молекулно ниво (5/7=71%). За този висок процент изяснени арменски случаи заслугата е основно на насочващия невролог от Армения. Двадесет и едно деца от изследваната група бяха от български произход, но в тази група само при 3 диагнозата беше изяснена на молекулно ниво (14%). Един пациент с

мутация в *SCN1A* гена беше от македонски произход. По отношение на половото разпределение, в нашата група от *SCN1A*-асоциирани случаи засегнатите пациенти бяха главно от мъжки пол, като съотношението момчета:момичета беше 3.5:1. Това съотношение се различаваше съществено от очакваното по литературни данни 2:1. Разликата най-вероятно се дължи на малкия брой генетично верифицирани случаи. При 8 от 9-те деца с мутации в *SCN1A* гена клиничната диагноза беше DS, а в един от случаите - MAE.

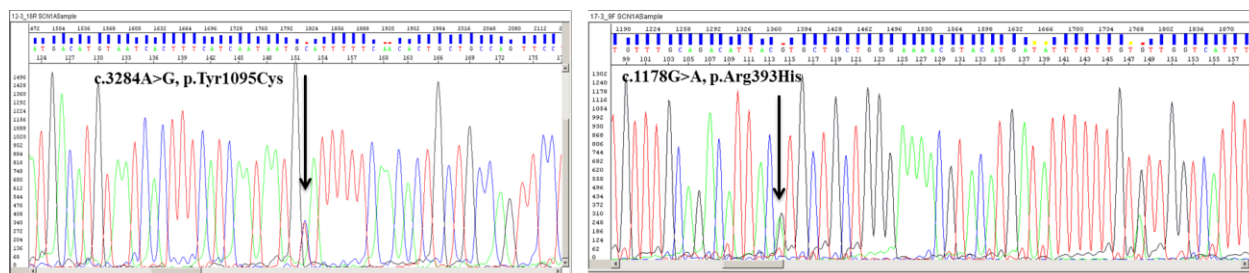
**Таблица 18.** Мутации в гена *SCN1A*.

№	п о л	Нац.	Диагноза	Нуклеотидна замяна	Аминокиселинна замяна	Екзон	Вид мутация	Унаследяване
1.	Ж	М	DS	c.4205_4208delGAAA	p.(Arg1402_Asn1403fs)	21	frameshift	de novo
2.	М	Б	MAE	c.3521C>G	p.(Thr1174Ser)	17	missense	майка
3.	М	Б	DS	c.3991G>T	p.(Glu1331*)	20	nonsense	de novo
4.	М	А	DS	c.3284A>G	p.(Tyr1095Cys)	16	missense	?
5.	М	А	DS	c.2928G>A	p.(Met976Ile)	15	missense	?
6.	М	А	DS	c.919G>T	p.(Glu307*)	6	nonsense	?
7.	М	А	DS	c.1178G>A	p.(Arg393His)	9	missense	de novo
8.	М	Б	DS	c.3587_3588insCTTC	p.(Glu1197Phefs*32)	18	frameshift	de novo
9.	Ж	А	DS	c.1834C>T	p.Arg612*	11	nonsense	баща мозайка (~26%)

\*-стоп кодон; Нац. – националност; М – Македония; Б – България; А – Армения. Подчертаните мутации са непубликувани в световната литература.

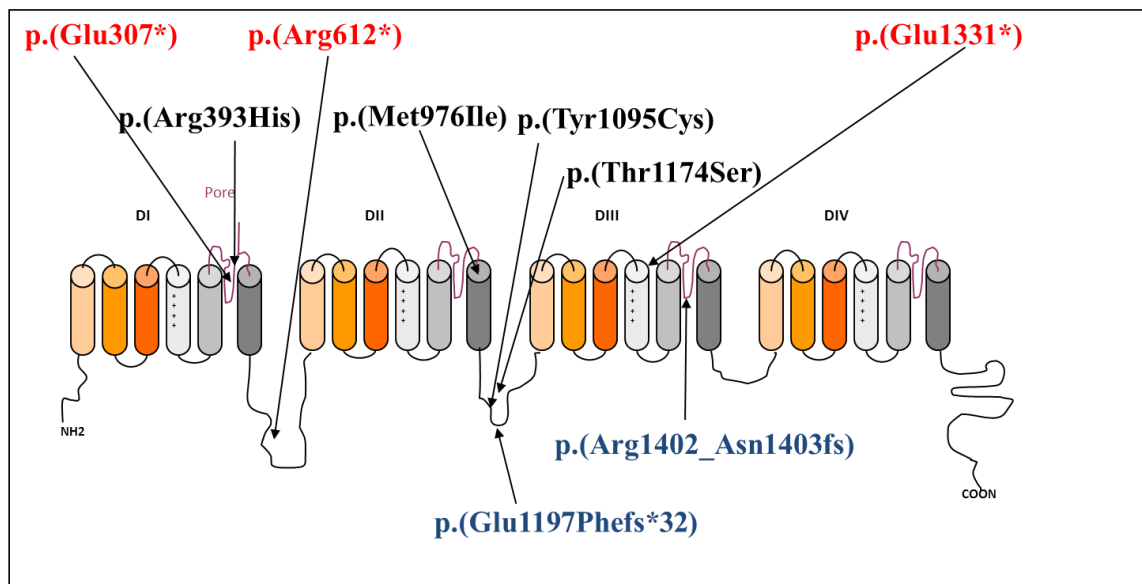
### Мутации в *SCN1A* гена

Мутациите, които открихме в нашата група пациенти са 4 missense, 3 nonsense и 2 мутации, нарушаващи рамката на четене на генетичната информация (делеция на 4 нуклеотида и инсерция на 4 нуклеотида). Някои от секвенционните профили са представени на Фигура 111.



**Фигура 111.** Секвенционен профил на мутации в *SCN1A* гена.

По отношение на типа нуклеотидни замени бяха наблюдавани всякакви възможни комбинации от типа транзиции и трансверзии. Мутациите са разпръснати в различни екзони по дължината на гена. Пет от откритите генетични изменения не бяха известни преди това в световната литература. Локализацията на мутациите в съответните домени на алфа-субединицата на натриевия канал е представена схематично на Фигура 112.



**Фигура 112.** Локализация на мутациите в съответните домени на алфа-субединицата на натриевия канал. Nonsense мутациите са маркирани в червено, missense – в черно и мутациите нарушаващи рамката на четене на генетичната информация – в синьо. Всеки белтъчен домен е изграден от 6 трансмембранны сегмента: S1, S2, S3, S4, S5 и S6, представени в различен цвят.

Една от стоп-кодон мутациите попада в сегмента S4 на домен III, който играе ролята на волтажен сензор. Три от мутациите (1 missense, 1 nonsense и 1 frameshift) засягат поровия участък между алфа-верижните трансмембранны сегменти S5 и S6; 1 missense попада в сегмента S6. Най-много мутации в нашата група засягат свързващите участъци между домените: в DII\_DIII свързващия участък (3) и в DI\_DII свързващия участък (1). Локализацията на представените тук мутации във важни за белтъчната функция региони и домени има отношение към патогенния характер на тези генетични изменения и към факта, че ги откриваме при тежко засегнати пациенти с Dravet синдром. Не открихме мутации в C-крайния домен IV на белтъка. Missense мутациите бяха проверени по отношение на еволюционната консервативност на заменените аминокиселинни остатъци в различни видове Na<sub>v</sub> канали. Резултатите са представени на Фигура 113. Оказа се, че само мутацията в поровия участък между алфа-верижните трансмембранны сегменти S5 и S6, както и

мутацията в сегмент S6 променят еволюционно висококонсервативен аминокиселинен остатък, което би могло да обясни техния патогенен ефект. Останалите две мутации, локализирани в свързващите междудоменни участъци засягат неконсервативни аминокиселини. Три от четирите missense мутации бяха публикувани и от други автори като патогенни, само една p.Tyr1095Cys беше открита за пръв път при пациент от нашата група.

c.1178G>A, p.(Arg393His)

Локализация в DIS5-S6 свързващ участък в Na<sub>v</sub> – канали

```

SCN1A_Homo   NLYQLTIRRAAGKTYMIFFFVLVIFLGSFYLINLILAVVAMAYEE
SCN1A_Mus    NLYQLTIRRAAGKTYMIFFFVLVIFLGSFYLINLILAVVAMAYEE
SCN1A_Rattus NLYQLTIRRAAGKTYMIFFFVLVIFLGSFYLINLILAVVAMAYEE
SCN2A_Homo   NLYQLTIRRAAGKTYMIFFFVLVIFLGSFYLINLILAVVAMAYEE
SCN2A_Mus    NLYQLTIRRAAGKTYMIFFFVLVIFLGSFYLINLILAVVAMAYEE
SCN3A_Homo   NLYQLTIRRAAGKTYMIFFFVLVIFLGSFYLVNLIILAVVAMAYEE
SCN3A_Rattus NLYQLTIRRAAGKTYMIFFFVLVIFLGSFYLVNLIILAVVAMAYEE
SCN9A_Homo   NLYQQTIRRAAGKTYMIFFFVVVIFLGSFYLINLILAVVAMAYEE
SCN8A_Homo   NLYQLTIRRAAGKTYMIFFFVLVIFVGSFYLVNLIILAVVAMAYEE
SCN4A_Homo   NLFQLTIRRAAGKTYMIFFFVVIIFLGSFYLINLILAVVAMAYEE
SCN5A_Homo   RLYQQTIRRAAGKTYMIFFFVLVIFLGSFYLVNLIILAVVAMAYEE
SCN10A_Homo  RLYQQTIRRSAGKIYMIFFFVLVIFLGSFYLVNLIILAVVTMAYEE
SCN11A_Homo  KLYQQTIRRTGLYSVFFVIVVIFLGSFYLVNLIILAVVTMAYEE

```

c.2928G>A, p.(Met976Ile)

Локализация в DIIS6 домен в Na<sub>v</sub> – канали

```

SCN1A_Homo   A--GQAMCLTVFMMVMIGNLVVNLFLALLLSSFSADNLAAT
SCN1A_Mus    A--GQAMCLTVFMMVMIGNLVVNLFLALLLSSFSADNLAAT
SCN1A_Rattus A--GQAMCLTVFMMVMIGNLVVNLFLALLLSSFSADNLAAT
SCN2A_Homo   A--GQTMCLTVFMMVMIGNLVVNLFLALLLSSFSADNLAAT
SCN2A_Mus    A--GQTMCLTVFMMVMIGNLVVNLFLALLLSSFSADNLAAT
SCN3A_Homo   A--GQTMCLTVFMMVMIGNLVVNLFLALLLSSFSADNLAAT
SCN3A_Rattus A--GQTMCLTVFMMVMIGNLVVNLFLALLLSSFSADNLAAT
SCN9A_Homo   A--GQAMCLIVVMVMVMIGNLVVNLFLALLLSSFSADNLAAT
SCN8A_Homo   A--GQAMCLIVFMMVMVMIGNLVVNLFLALLLSSFSADNLAAT
SCN4A_Homo   A--GQAMCLTVFMMVMVMIGNLVVNLFLALLLSSFSADNLAAT
SCN5A_Homo   S--GQSLCLLVFLVMVMIGNLVVNLFLALLLSSFSADNLAAT
SCN10A_Homo  G--QKSIICLLFLVVMVMIGNLVVNLFLALLLSSFSADNLAAT
SCN11A_Homo  ANASSSLCIVVIFLVMVMIGNLVVNLFLALLLSSFSADNLAAT

```

c.3284A>G; p.(Tyr1095Cys)

Локализация в DII - DIII домен свързващ участък в Na<sub>v</sub> – канали

```

SCN1A_Homo   GSSVEVYIIDEVDYMSFINNPS-LTIVTVPIAV
SCN1A_Mus    GSSVEVYIIDEVDYMSFINNPS-LTIVTVPIAV
SCN1A_Rattus GSSVEVYIIDEVDYMSFINNPS-LTIVTVPIAV
SCN2A_Homo   -SSVEVYIIDEVDYMSFINNPS-LTIVTVPIAV
SCN2A_Mus    -SSVEVYIIDEVDYMSFINNPS-LTIVTVPIAV
SCN3A_Homo   GSSVEVYIIDEVDYMSFINNPS-LTIVTVPIAV
SCN3A_Rattus GSSVEVYIIDEVDYMSFINNPS-LTIVTVPIAV
SCN9A_Homo   -SSVDVHIMEDSDGQSFHNPN-LTIVTVPIAV
SCN8A_Homo   -SSVEVYIIDE-DHMSFINNPN-LTIVTVPIAV
SCN4A_Homo   -LADGVPSSLELDLHNFNNPY-LTIQVPIAV
SCN5A_Homo   ESDTDIQEEDENSLGTEESKQESQFVSG
SCN10A_Homo  PIAEGSLDLDLEDGGEDAQSFQQEVIPKQ
SCN11A_Homo  HDWTWIAFLAEEEDVFEVSGEDNAQRITQPEP

```

c.3521C>G; p.(Thr1174Ser)

Локализация в DII - DIII домен свързващ участък в Na<sub>v</sub> – канали

```

SCN1A_Homo   DIGAPVE--EQPVVEPEHTLEPEACFTEGCVRQRF
SCN1A_Mus    DIGAPAE--EQPVIEPEHTLEPEACFTEGCVRQRF
SCN1A_Rattus DIGAPAE--EQPVMEPEHTLEPEACFTEGCVRQRF
SCN2A_Homo   DIGAPAE--EQPEVEPEHTLEPEACFTEGCVRQRF
SCN2A_Mus    DIGAPAE--EQPEVEPEHTLEPEACFTEGCVRQRF
SCN3A_Homo   DVVLPREG-EQAEIEPEHTLEPEACFTEGCVRQRF
SCN3A_Rattus DVAPPREG-EQAEIEPEHTLEPEACFTEGCVRQRF
SCN9A_Homo   DNPLPREG-EQAEIEPEHTLEPEACFTEGCVRQRF
SCN8A_Homo   DIK-PEVE-EVPVEQPEHTLEPEACFTEGCVRQRF
SCN4A_Homo   DYKPEEEDPEEQAEENPHGQPEEPCFTEACVQRPF
SCN5A_Homo   DMTNTAELLEQIPDLGQVVDPEDCFTEGCVRQRF
SCN10A_Homo  DCLDPPEILRRIPELADILPEPDCFTEGCVRQRF
SCN11A_Homo  STIDLQDGFGLPEMVPHTQPERCLPKGFGCCFP

```

**Фигура 113.** Еволюционната консервативност на заменените в резултат на missense мутации аминокиселинни остатъци в различни видове Na<sub>v</sub> канали.

Делецията на 4 бази c.4205\_4208delGAAA представляваше интересен модел за изследване механизмите на мутагенеза в човешкия геном, тъй като беше свързана със загуба на едното копие на директен повтор GAAAGAAA в екзон 21 [Yordanova et al., 2011]. Механизмът на приплъзване и неправилно сдвояване (Slipped-strand mispairing) по време на ДНК репликацията би могъл да обясни възникването на тази мутация. Подобни делеции на 4 бази (c.5010\_5013delGTTT, p.(Leu1670Leufs\*9) и c.5536\_5539delAAAC, p.(Lys1846Serfs\*11) засягащи къси директни повтори в екзон 26 на *SCN1A* гена вече бяха съобщавани при пациенти с DS [Ebach et al., 2005; Marini et al., 2009].

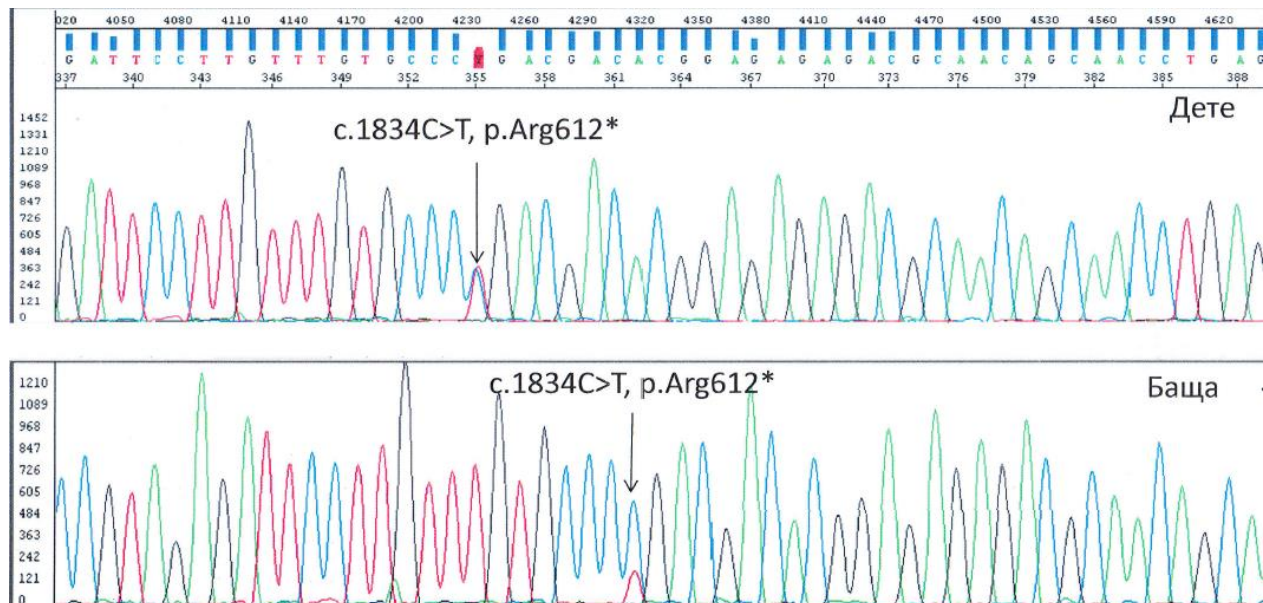
От технологична гледна точка, до момента всички генетични изменения, които открихме в *SCN1A* гена се детектираха чрез секвениране, не бяха намерени големи делеции и дупликации, които изискват MLPA анализ.

## Генотип-фенотипни корелации и тест за носителство на откритите *SCN1A* мутации при родителите на болните деца

Откриването на генетичните дефекти в *SCN1A* гена не беше проблем от технологична гледна точка. Истинско предизвикателство беше обаче, интерпретацията на мутациите в контекста на клиничната симптоматика при различни пациенти, както и в рамките на едно семейство. По отношение на клиничната симптоматика нашата група беше доста еднородна, като всички пациенти манифестираха тежка форма Dravet синдром, а само едно дете беше с фенотип на МАЕ [Йорданова, 2013, докторска дисертация]. При това дете открихме вече публикувана мутация p.(Thr1174Ser) [Escayg et al, 2001; Gargus et al., 2007] в екзон 17 на *SCN1A* гена. Същата мутация беше съобщавана при пациент с juvenile myoclonic epilepsy (JME) [Escayg et al., 2001], както и в едно семейство с hemiplegic migraine, в което детето проявява миоклонии и има абнормно ЕЕГ, а майка му е с атаксичен мигренозен синдром (ataxic migraine syndrome) [Gargus et al., 2007]. Нашият пациент е с МАЕ фенотип, от спектъра на генетичните епилепсии, асоциирани с мутации в *SCN1A* гена. За да проследим унаследяването на тази мутация в семейството, разполагахме с материал само от майката, която изненадващо се оказа асимптоматичен носител. Нашите резултати при това семейство обогатиха световните данни относно мутацията p.(Thr1174Ser) и свързаният с нея клиничен спектър, като беше добавен и асимптоматичен носител [Йорданова et al., 2011; Йорданова, 2013, докторска дисертация].

Четири от мутациите бяха *de novo*, възникнали за пръв път при засегнатите деца, а в три от случаите не разполагахме с материал от родителите, за да проследим унаследяването на мутациите в семействата.

Особено интересна от гледна точка на унаследяването се оказа новооткритата стоп кодон мутация p.Arg612\* в екзон 11 на *SCN1A* гена, която при изследване на проби от двамата родители се оказа унаследена от асимптоматичен баща. При бащата, в ДНК от венозна кръв беше установен мозаечен генотип по отношение на мутантния алел, който представлява около 26% от дивия тип алел (Фигура 114).

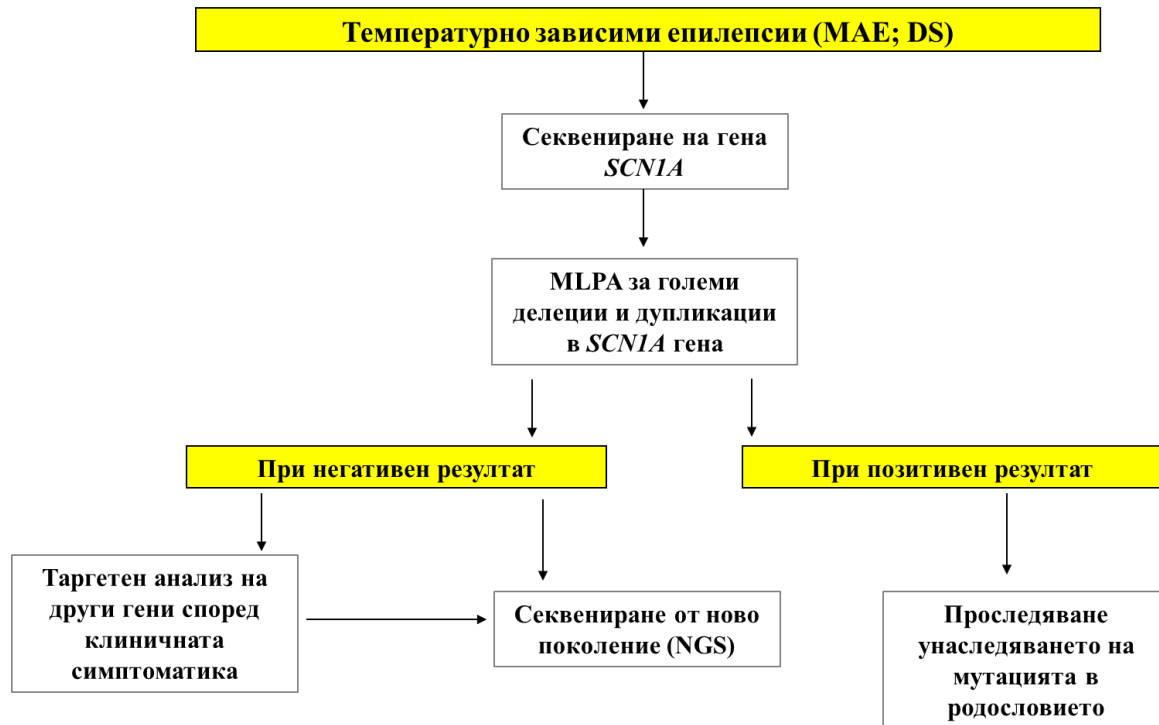


**Фигура 114.** Секвенционен профил на мутацията p.Arg612\* в *SCN1A* гена при пациент и неговия баща, при който се детектира мозаечен генотип по отношение на мутантния спрямо дивия тип алел.

Вече има публикувани редица случаи на унаследени мутации в *SCN1A* гена, но това са най-вече missense мутации разположени извън поровия район и променящи само кинетиката на канала [Kanai et al., 2004; Mulley et al., 2005]. Нашата мутация p.Arg612\* представлява тежка стоп кодон мутация, но може би локализацията ѝ в DI<sub>1</sub>DI<sub>2</sub> свързващия участък на протеина би могла да обясни асимптоматичното ѝ присъствие в мозаечния генотип на бащата.

#### **4.4.5. Обобщение на получените резултати и заключителни бележки**

За изминалия период от 5 години (2011-2015) изяснихме на молекулно ниво 31% от изследваните пациенти с тежка епилептична симптоматика, клинично диагностицирани като Dravet синдром. Откритите мутации са само точкови, малки делеции и инсерции, разпръснати по цялата дължина на гена и съответно по белтъчните домени. Актуалният към момента системен подход за молекулярно-генетична диагностика на температурно зависими епилепсии (Dravet синдром и др.) е представен на Фигура 115.



**Фигура 115.** Системен подход за молекулярно-генетична диагностика на температурно зависими епилепсии.

Молекулярно-генетичната диагностика на епилептичните синдроми все по-често ни сблъсква с необясним механизъм на унаследяване на мутации в рамките на едно семейство, от който произтичат сложни за интерпретиране генотип-фенотипни взаимодействия. Нашите представи за връзката генотип – фенотип се променят ежедневно и все повече се убеждаваме, че мутациите, на които се натъкваме в хода на молекулярната диагностика често пъти нямат самостоятелен ефект, а се комбинират с други генетични и епигенетични фактори. На този етап, медико-генетичното консултиране при епилептични синдроми е истинско предизвикателство и страда от все още твърде бедна генетична информация, на която да се позовем.

Изясняването на функционалните последици, резултат от увреждане на Na-канали може да доведе до огромен напредък в разкриването на някои от механизмите на възникване на епилепсията. От своя страна, по-доброто разбиране на патофизиологичната основа за дисфункцията на Na-канали може да помогне при разработване на специфична терапия за тези заболявания [Callenbach et al., 2005]. Антиепилептични лекарства (АЕЛ), които действат върху белтъчни продукти от мутирали гени и променят тяхното действие могат да бъдат много ефективни при лечение на съответните епилептични синдроми.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

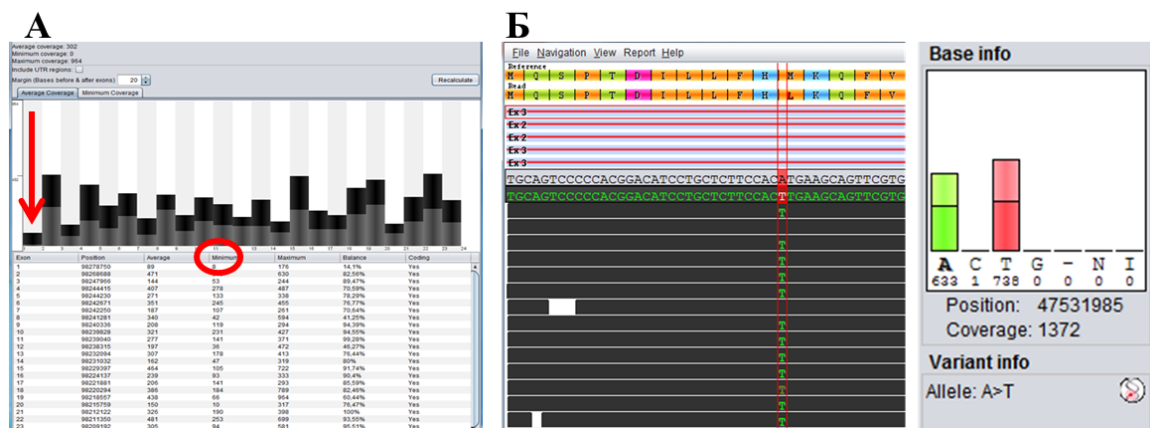
В ерата на бурно развиващите се геномни технологии, специалистите по молекулярна диагностика ежедневно се сблъскват с редица предизвикателства. Нашите познания за човешкия геном, за взаимодействието между генетични и епигенетични фактори, за това как да интерпретираме всеки резултат и да анализираме генотип-фенотипните корелации, се променят ежедневно. Това до голяма степен е свързано с огромните възможности на съвременните технологии, което също изисква големи усилия от страна на специалистите постоянно да надграждат квалификационните си умения и да бъдат в крак с технологиите от нова генерация.

Настоящият труд целеше да проследи еволюцията на геномните технологии и тяхното приложение в неврогенетиката за нуждите на молекулярната диагностика. Използвах конкретни примери невромускулни, неврологични и невродегенеративни заболявания с интелектуален дефицит, за да представя еволюцията на технологиите от една страна и проблемите с които се сблъскахме в хода на диагностичната дейност, от друга. Моите познания в областта на генетиката също претърпяха съществен поврат. Моногенните заболявания с ясна етиология на унаследяване също се оказа, че имат своите предизвикателства, като например, как да докажем хетерозиготна делеция на един или повече екзони на ДНК или РНК ниво, преодолявайки маскиращия ефект на здравия алел или да докажем, че синонимна замяна има в действителност патогенен сплайсинг ефект. Доказването, оразмеряването и интерпретирането на динамични мутации в човешкия геном, експандирането или контрахирането на тези мутации в хода на унаследяването в поколенията, както и оценката на различни профили на метилиране, ни поднасяха често изненади и изискваха от наша страна постоянно да разработваме и оптимизираме нови посъвършени методики, на които можем да се доверим в ежедневната ни диагностична практика. И накрая, но не на последно място епилептичните енцефалопатии и епилептични синдроми преобърнаха нашите представи за генотип-фенотипни корелации с установяването на едни и същи генетични дефекти в рамките на едно семейство, които могат да са свързани както с асимптоматично носителство така и с тежка клинична симптоматика. За момента можем само да предполагаме намесата на гени модификатори и други генетични и епигенетични фактори. Този факт затруднява изключително много медико-генетичното консултиране в засегнатото семейство.

Изследването на механизмите на мутагенеза в човешкия геном ме вълнуваше през всички тези години посветени на преследване на мутации в човешкия геном. Всеки път си

задавах въпроса как се случва тази нуклеотидна грешка, защо точно в тази позиция, има ли механизъм, който я провокира. Редица мутации възникват *de novo*, причинени от независими мутационни събития, но засягат едни и същи нуклеотиди или генни региони. На теория, това са случайни и независими мутационни събития, но практически засягат винаги една и съща точка, което не изглежда да е случайно, а по-скоро предполага прякото участие на околната секвенция в провокирането на мутационните събития. Възникването на комплексни мутационни събития върху един алел също до голяма степен би могло да се обясни с геномната архитектура на региона.

NGS модерните технологии, заедно с биоинформационните софтуери навлизат все по-дълбоко в нашата пряка диагностична работа. При Rett синдром, епилепсиите и епилептичните енцефалопатии, след като покрием възможностите за молекулярно-генетична диагностика ген-по-ген и не сме достигнали до изясняване на генетичната причина за заболяването (това са около 65%-70% от случаите), следваща стъпка е NGS (виж диагностичните алгоритми на Фигури 98, 108 и 115). През 2015 г., когато пиша този материал, NGS технологиите предлагат диагностични панели, *clinical exome* (~5000 гена с диагностична стойност), *whole exome*, *whole genome* и други генни и геномни комбинации за диагностични цели. За момента обаче, новите технологии също имат своите ограничения. Например някои региони от човешкия геном не могат да бъдат достатъчно надеждно покрити, така че резултатът да има дефинитивна диагностична стойност (Фигура 116A). Поради този факт не е възможно да се издаде негативен резултат само на базата на NGS анализа и се налага комбинирането на NGS технологиите с класическото секвениране по Sanger.



**Фигура 116.** Резултати от NGS анализ. (А) Регион от даден ген, който не е покрит достатъчно (min 8x) за дефинитивно диагностично заключение. (Б) „Случайна находка“, която няма отношение към настоящата клинична картина при пациента.

Освен това голям брой от генетичните находки, които откриваме, не отговарят на клиничната картина при пациента или пък могат да се окажат свързани с ракови заболявания или други неврологични заболявания с късно начало, които ние диагностицираме сега в детска възраст. Това са т.нар. „случайни находки“ (Фигура 116Б), които нямат отношение към правилното диагностициране на пациента в момента, според наблюдаваната клинична картина. Навлизаме в сверата на етичните норми при генетични изследвания. Големи дебати и спорове се водят относно това, дали да изследваме whole genome или whole exome, каква част от находките да докладваме в резултата на пациента и как да интерпретираме правилно това, което научаваме от книгата на живота. Ясно, еднозначно решение няма, но технологичният прогрес и геномната ера в медицината и молекулярната диагностика са факт и ние трябва да сме подготвени.

Най-важният урок в ежедневната ни диагностична практика остава интерпретирането на резултатите от генетичните изследвания. Всеки конкретен резултат, колкото и убедително да изглежда на пръв поглед като патогенен или непатогенен трябва да се интерпретира с повишено внимание.

## **БИБЛИОГРАФИЯ**

### **Българска литература**

1. Абаджиев М, Георгиев И, Василев М, Младенов П, Йосифов И, Семков С. (1977) Популационно-генетични проучвания на дегенеративните неврологични заболявания в Михайловградски окръг. Неврол, психиатр. и неврохирургия (София) 3:153-160.
2. Ангелова Л. (1994) Генетико-диагностично проучване при лица с умствено изоставане в училищна възраст, дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”.
3. Божинов и сътр. (1973) Прогресивна мускулна дистрофия. Медицина и Физкултура, 20-80.
4. Георгиева Б. (2006) Молекулярно-генетично и епидемиологично проучване на мускулна дистрофия пояс-крайник тип 2С и тип 2А в България. Докторска дисертация.
5. Йорданов и сътр. (1964) Патобиохимия на прогресивна мускулна дистрофия (обзор). Невр Псих и Неврох., 3(6):472-479.
6. Йорданова И. (2013) Генетика на епилепсията при български пациенти. Изясняване на основните молекулни характеристики на епилепсии с фебрилно провокирани пристъпи и неонатални епилептични пристъпи при български пациенти. Докторска дисертация.
7. Киров А. (2013) Молекулни характеристики на идиопатична генерализирана епилепсия и синдромни епилепсии с ранно начало в България. Докторска дисертация.
8. Тодоров Т. (2011) Молекулни основи на синдроми с умствено изоставане в България. Докторска дисертация.
9. Тодорова А. (1999) Мускулна дистрофия Дюшен/Бекер в България. Молекулни характеристики, механизми на мутагенеза и профилактика. Докторска дисертация.

10. Цветанова Е. (1979) Ензими, изоензими и протеини в патогенезата и диагнозата на прогресивна мускулна дистрофия и други нервно мускулни заболявания. Докторска дисертация.
11. Чамова Т, Гергелчева В, Райчева М, Тодоров Т, Генова Ж, Бичев С, Божинова В, Митев В, Търнев И, Тодорова А. (2012) Когнитивни нарушения при пациенти с дистрофинопатии. Генотип-фенотип корелации. Българска Неврология 13(3):25-30.

### **Чуждестранна литература**

1. Adler DA, Quaderi NA, Brown SD, Chapman VM, Moore J, Tate P. (1995) Disteche CM. The X-linked methylated DNA binding protein, MeCP2, is subject to X inactivation in the mouse. *Mamm Genome* 6(8):491-2.
2. Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran ChO, Francke U, Zoghbi HY. (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nature Genet.*, 23:185-188.
3. Amir RE, Van den Veyver IB, Schultz R, Malicki DM, Tran CQ, Dahle EJ, Philippi A, Timar L, Percy AK, Motil KJ, Lichtarge O, Smith EO, Glaze DG, Zoghbi HY. (2000) Influence of mutation type and X chromosome inactivation on Rett syndrome phenotypes. *Ann Neurol* 47:670–679.
4. Anderson LV, Davison K, Moss JA, Richard I, Fardeau M, Tome FM, Hubner C, Lasa A, Colomer J, Beckmann JS. (1998) Characterization of monoclonal antibodies to calpain 3 and expression in muscle from patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Am J Pathol.*, 153(4): 1169-1179.
5. Angelicheva D, Calafell F, Savov A, Jordanova A, Kufardjieva A, Galeva I, Nedkova V, Ivanova T, Yankova P, Konstantinova D, Genev E, Kalaydjieva L. Cystic fibrosis mutations and associated haplotypes in Bulgaria - a comparative population genetic study. *Hum Genet.* 1997; 99(4):513-20.
6. Annesi G, Gambardella A, Carrideo S, Incorpora G, Labate A, Pasqua AA, Civitelli D, Polizzi A, Annesi F, Spadafora P, Tarantino P, Ciro Candiano IC, Romeo N, De

- Marco EV, Ventura P, LePiane E, Zappia M, Aguglia U, Pavone L, Quattrone A. (2003) Two novel SCN1A missense mutations in generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Epilepsia* 44:1257–1258.
7. Appleton R. (2003) Aetiology of epilepsy and learning disorders: specific epilepsy syndromes; genetic chromosomal and sporadic syndromes. In: Trimble M, editor. *Learning disability and epilepsy: an integrative approach*. Guildford, UK: Clarius Press Ltd. p. 47–64.
  8. Archer HL, Evans J, Edwards S, Colley J, Newbury-Ecob R, O’Callaghan F, Huyton M, O’Regan M, Tolmie J, Sampson J, Clarke A, Osborne J. (2006) CDKL5 mutations cause infantile spasms, early onset seizures, and severe mental retardation in female patients. *J Med Genet* 43:729-734.
  9. Ariani F, Hayek G, Rondinella D, Artuso R, Mencarelli MA, Spanhol-Rosseto A, Pollazzon M, Buoni S, Spiga O, Ricciardi S, Meloni I, Longo I, Mari F, Broccoli V, Zappella M, Renieri A. (2008) FOXP1 is responsible for the congenital variant of Rett syndrome. *Am J Hum Genet.*, 83:89-93.
  10. Arocena GD, de Diego Y, Oostra BA, Willemsen R, Mirta Rodriguez M. (2000) A fragile X case with an amplification/deletion mosaic pattern. *Hum Genet.*, 106(3):366-9.
  11. Artuso R, Mencarelli MA, Polli R, Sartori S, Ariani F, Pollazzon M, Marozza A, Cilio MR, Specchio N, Vigevano F, Vecchi M, Boniver C, Dalla Bernardina B, Parmeggiani A, Buoni S, Hayek G, Mari F, Renieri A, Murgia A. (2010) Earlyonset seizure variant of Rett syndrome: definition of the clinical diagnostic criteria. *Brain Dev.*, 32(1):17–24.
  12. Bahi-Buisson N, Nectoux J, Rosas-Vargas H et al. (2008) Key clinical features to identify girls with CDKL5 mutations. *Brain* 131(10):2647-61.
  13. Bailey JA, Liu G, Eichler EE. (2003) An Alu transposition model for the origin and expansion of human segmental duplications. *Am J Hum Genet.*, 73(4):823-34.
  14. Bakker E, Veenema H, den Dunnen JT, van Broeckhoven C et al. (1989) Germinal mosaicism increases the recurrence risk for “new” Duchenne muscular dystrophy mutations. *J Med Genet.*, 26:553-559.

15. Baldrich K, Baldrich M, Monaco AP, Muller CR. (1992) Replication errors may contribute to the generation of large deletions and duplications in the dystrophin gene. *Hum Mutat.*, 1(4):280-7.
16. Ballestar E, Yusufzai TM, Wolffe AP. (2000) Effects of Rett syndrome mutations of the methyl-CpG binding domain of the transcriptional repressor MeCP2 on selectivity for association with methylated DNA. *Biochemistry* 39(24):7100-6.
17. Baumbach LL, Chamberlain JS, Ward PA, Farwell NJ, Caskey CT. (1989) Molecular and clinical correlations of deletions leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurology* 39:465–474.
18. Becker PE, Kiener F (1955). Eine neue X chromosomal muscular dystrophie. *Arch Psychiatr Zeitschr Neurol.*, 193:427-448.
19. Beckmann JS, Richard I, Hillaire D, Broux O, Antignac C, Bois E, Cann H, Cottingham RW Jr, Feingold N, Feingold J, et al. (1991) A gene for limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 15 by linkage. *C R Acad Sci III*;312(4):141-8.
20. Beckmann JS and Fardeau M. (1998) Limb-girdle muscular dystrophies. *Neuromuscular Disorders: Clinical and Molecular Genetics*. Ch 6. Edited by Emery AEH, John Wiley & Sons Ltd. New York, pp132-156.
21. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkle LM. (1990) Detection of 98% of DMD/BMD deletions by PCR. *Hum Genet.*, 6:45-48.
22. Benedetti S, Menditto I, Degano M, Rodolico C, Merlini L, D'Amico A, Palmucci L, Berardinelli A, Pegoraro E, Trevisan CP, Morandi L, Moroni I, Galluzzi G, Bertini E, Toscano A, Olivè M, Bonne G, Mari F, Caldara R, Fazio R, Mammì I, Carrera P, Toniolo D, Comi G, Quattrini A, Ferrari M, Previtali SC. (2007) Phenotypic clustering of lamin A/C mutations in neuromuscular patients. *Neurology* 69(12):1285-92.
23. Biswas S, Emond MR, Jontes JD. (2010) Protocadherin-19 and N-cadherin interact to control cell movements during anterior neurulation. *J Cell Biol.*, 191(5):1029-41.
24. Bonne G1, Di Barletta MR, Varnous S, Bécane HM, Hammouda EH, Merlini L, Muntoni F, Greenberg CR, Gary F, Urtizbera JA, Duboc D, Fardeau M, Toniolo D, Schwartz

- K. (1999) Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet.*, 21(3):285-8.
25. Bonne G, Mercuri E, Muchir A, Urtizbera A, Bécane HM, Recan D, Merlini L, Wehnert M, Boor R, Reuner U, Vorgerd M, Wicklein EM, Eymard B, Duboc D, Penisson-Besnier I, Cuisset JM, Ferrer X, Desguerre I, Lacombe D, Bushby K, Pollitt C, Toniolo D, Fardeau M, Schwartz K, Muntoni F. (2000) Clinical and molecular genetic spectrum of autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy due to mutations of the lamin A/C gene. *Ann Neurol.*, 48(2):170-80.
  26. Bronzova J, Todorova A, Janakieva T, Gotchev D, Janakiev P, Kalaydjieva L, Kotzev P. (1993) Molecular defects and electrocardiographic and echocardiographic investigations in DMD/BMD Bulgarian patients – attempt to correlate the data. *Acta Cardiologica V(2)*:245-254.
  27. Bronzova J, Todorova A, Kalaydjieva L. (1994) Detection of carriers of deletions in the dystrophin gene in Bulgarian DMD-BMD families. *Hum Genet.* 93(2):170-4.
  28. Bronzova J, Todorova A, Stoyanova V, Jankova S, Janakiev P, Kremensky I. (1995) Characterisation of dinucleotide repeat polymorphisms along the dystrophin gene in Bulgarian Duchenne and Becker muscular dystrophy families. *Balkan J Clin Labor* 3:13-16.
  29. Brown WT, Nolin S, Houck G Jr, Ding X, Glicksman A, Li SY, Stark-Houck S, Brophy P, Duncan C, Dobkin C, Jenkins E. (1996) Prenatal diagnosis and carrier screening for fragile X by PCR. *Am J Med Genet.* 64(1):191-5.
  30. Brown CA, Lanning RW, McKinney KQ, Salvino AR, Cherniske E, Crowe CA, Darras BT, Gominak S, Greenberg CR, Grosman C, Heydemann P, Mendell JR, Pober BR, Sasaki T, Shapiro F, Simpson DA, Suchowersky O, Spence JE. (2001) Novel and recurrent mutations in lamin A/C in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Am J Med Genet.* 102(4):359-67.
  31. Buoni S, Zannolli R, Felice CD, Saponari S, Strambi M, Dotti MT, Castrucci E, Corbini L, Orsi A, Hayek J. (2008) Drugresistant epilepsy and epileptic phenotype-EEG association in MECP2 mutated Rett syndrome. *Clin Neurophysiol.*, 119(11):2455–8.

32. Bushby KMD. (1995) Diagnostic criteria for the limb girdle muscular dystrophies: report of the ENMC consortium on limb-girdle muscular dystrophies. *Neuromuscular Disorders*, 5;71-74.
33. Bushby KMD. (1997) *Diagnostic Criteria for Neuromuscular Disorders*, 2nd edn, Chapter 4: The limb-girdle muscular dystrophies. Royal Society of Medicine Press, London; European Neuromuscular Centre, Baarn, The Netherlands.
34. Bushby KMD. (1999) The limb-girdle muscular dystrophies- multiple genes, multiple mechanisms. *Hum Mol Genet*, 8:1875-1882.
35. Bushby K and Beckmann J. (2003) The 105th ENMC workshop – Pathogenesis in the nonsarcoglycan limb-girdle muscular dystrophies. *Neuromuscular Disorders*, 13: 80-90.
36. Callenbach PM, van den Maagdenberg AM, Frants RR, Brouwer OF. (2005) Clinical and genetic aspects of idiopathic epilepsies in childhood. *Eur J Paediatr Neurol.*, 9(2):91-103.
37. Camerino G, Mattei MG, Mattei JF, Jaye M, Mandel JL. (1983) Close linkage of fragile X-linked mental retardation syndrome to haemophilia B and transmission through a normal male. *Nature* 306: 701-707.
38. Capanni C, Cenni V, Mattioli E, Sabatelli P, Ognibene A, Columbaro M, Parnaik VK, Wehnert M, Maraldi NM, Squarzoni S, Lattanzi G. (2003) Failure of lamin A/C to functionally assemble in R482L mutated familial partial lipodystrophy fibroblasts: altered intermolecular interaction with emerin and implications for gene transcription. *Exp Cell Res.*, 291(1):122-34.
39. Carvalho CM, Zhang F, Liu P, Patel A, Sahoo T, Bacino CA, Shaw C, Peacock S, Pursley A, Tavyev YJ, Ramocki MB, Nawara M, Obersztyn E, Vianna-Morgante AM, Stankiewicz P, Zoghbi HY, Cheung SW, Lupski JR. (2009) Complex rearrangements in patients with duplications of MECP2 can occur by fork stalling and template switching. *Hum Mol Genet.*, 18(12):2188-203.

40. Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. (2005) International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev.*, 57(4):397-409.
41. Ceulemans BP, Claes LR, Lagae LG. (2004) Clinical correlations of mutations in the SCN1A gene: from febrile seizures to severe myoclonic epilepsy in infancy, *Pediatr Neurol.*, 30(4):236-423.
42. Chae J, Minami N, Jin Y, Nakagawa M, Murayama K, Igarashi F, Nonaka I. (2001) Calpain 3 gene mutations: genetic and clinico-pathologic findings in limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.*, 11(6-7):547-555.
43. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. (1989) Deletion screening of the Duchenne Muscular Dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.*, 16:11141-11156.
44. Chamova T, Guergeltcheva V, Raycheva M, Todorov T, Genova J, Bichev S, Bojinova V, Mitev V, Tournev I, Todorova A (2013) Association between loss of dp140 and cognitive impairment in duchenne and becker dystrophies. *Balkan J Med Genet.* 16(1):21-30.
45. Chamova T, Tournev T, Todorova A. (2011) Approaches in diagnostic & care of Duchenne/Becker muscular dystrophy. Genotype-phenotype correlations in Duchenne/Becker muscular dystrophy patients. Lambert Academic Publishing. ISBN:978-3-8473-1737-1.
46. Charniot JC, Pascal C, Bouchier C, Sébillon P, Salama J, Duboscq-Bidot L, Peuchmaurd M, Desnos M, Artigou JY, Komajda M. (2003) Functional consequences of an LMNA mutation associated with a new cardiac and non-cardiac phenotype. *Hum Mutat.*, 21(5):473-81.
47. Chen J-M, Chuzhanova N, Stenson PD, Ferec C, Cooper DN. (2005) Complex gene rearrangements caused by serial replication spippage. *Hum Mut.*, 26(2):125-134.
48. Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B, Lagae L, Van Broeckhoven C, De Jonghe P. (2001) De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am J Hum Genet.*, 68(6):1327-1332.

49. Claes L, Ceulemans B, Audenaert D, Smets K, Löfgren A, Del-Favero J, Ala-Mello S, Basel-Vanagaite L, Plecko B, Raskin S, Thiry P, Wolf NI, Van Broeckhoven C, De Jonghe P. (2003) De novo SCN1A mutations are a major cause of severe myoclonic epilepsy of infancy, *Hum Mutat.*, 21(6):615-621.
50. Clemens PR, Fenwick RG, Chamberlain JS, Gibbs RA, de Andrade M, Chakraborty R, Caskey CT. (1991) Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms. *Am J Hum Genet* 49(5):951-60.
51. Collins FS, Morgan M, Patrinos A. (2003) The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science* 300 (5617): 286–290.
52. Cooper DN, Krawczak M. (1990) The mutational spectrum of single base-pair substitutions causing human genetic disease: patterns and predictions. *Hum Genet.* 85(1):55-74.
53. Cooper RA, Kerr AM, Amos PM. (1998) Rett syndrome: critical examination of clinical features, serial EEG and video-monitoring in understanding and management. *Eur J Paediatr Neurol.*, 2(3):127–35.
54. Coppola G, Plouin P, Chiron C, Robain O, Dulac O. (1995) Migrating partial seizures in infancy: a malignant disorder with developmental arrest. *Epilepsia* 36(10):1017-24.
55. Coy JF, Sedlacek Z, Bächner D, Delius H, Poustka A. (1999) A complex pattern of evolutionary conservation and alternative polyadenylation within the long 3'-untranslated region of the methyl-CpG-binding protein 2 gene (MeCP2) suggests a regulatory role in gene expression. *Hum Mol Genet.*, 8(7):1253-62.
56. Crawford DC1, Meadows KL, Newman JL, Taft LF, Scott E, Leslie M, Shubek L, Holmgren P, Yeargin-Allsopp M, Boyle C, Sherman SL. (2002) Prevalence of the fragile X syndrome in African-Americans. *Am J Med Genet.*, 110(3):226-33.
57. d'Orsi G, Demaiò V, Minervini MG. (2009) Myoclonic status misdiagnosed as movement disorders in Rett syndrome: a video-polygraphic study. *Epilepsy Behav.*, 15(2):260–2.

58. Danieli GA, Mioni F, Muller CR, Vitiello L, Mostacciuolo ML, Grimm T. (1993) Patterns of deletions of the dystrophin gene in different European populations. *Hum Genet.*, 91:342-346.
59. Darras BT, Blattner P, Harper JF, Spiro AJ, Alter S, Francke U. (1988) Intragenic deletions in 21 Duchenne muscular dystrophy (DMD)/Becker muscular dystrophy families studied with the dystrophin cDNA: location of breakpoints on HindIII and BglII exon-containing fragment maps, meiotic and mitotic origin of the mutations. *Am J Hum Genet.*, 43:620-629.
60. Davids JR, Hagerman RJ, Eilert RE. (1990) Orthopaedic aspects of fragile-X syndrome. *J. Bone Joint Surg. 72A*: 889-896.
61. De Bona C, Zappella M, Hayek G, Meloni I, Vitelli F, Bruttini M, Cusano R, Loffredo P, Longo I, Renieri A. (2000) Preserved speech variant is allelic of classic Rett syndrome. *Eur J Hum Genet* 8(5):325-30.
62. Den Dunnen JT, Bakker E, Klein-Breteler EG, Pearson PL, Van Ommen GJB. (1987) Direct detection of more than 50% Duchenne muscular dystrophy mutations by field-inversion gels. *Nature.*, 329:640-642.
63. Den Dunnen JT, Bakker E, van Ommen GJ, Pearson PL. (1989) The DMD gene analysed by field inversion gel electrophoresis. *Br Med Bull.* 45(3):644-58.
64. de Paula F, Vainzof M, Passos-Bueno MR, Pavanello RCM, Matioli SR, Anderson LVB, Nigro V, Zata M. (2002) Clinical variability in calpainopathy: What makes the difference? *European Journal of Human Genetics*, 10: 825-832.
65. Depienne C, Arzimanoglou A, Trouillard O, Fedirko E, Baulac S, Saint-Martin C, Ruberg M, Dravet C, Nabbout R, Baulac M, Gourfinkel-An I, LeGuern E. (2006) Parental mosaicism can cause recurrent transmission of SCN1A mutations associated with severe myoclonic epilepsy of infancy. *Hum Mutat.* 27(4):389.
66. Depienne C, Bouteiller D, Keren B, Cheuret E, Poirier K, Trouillard O, Benyahia B, Quelin C, Carpentier W, Julia S, Afenjar A, Gautier A, Rivier F, Meyer S, Berquin P, Hélias M, Py I, Rivera S, Bahi-Buisson N, Gourfinkel-An I, Cazeneuve C, Ruberg M, Brice A, Nabbout R, Leguern E. (2009) Sporadic infantile epileptic encephalopathy

caused by mutations in PCDH19 resembles Dravet syndrome but mainly affects females. *PLoS Genet.*, 5 e1000381.

67. Depienne C, Trouillard O, Bouteiller D, Gourfinkel-An I, Poirier K, Rivier F, Berquin P, Nabbout R, Chaigne D, Steschenko D, Gautier A, Hoffman-Zacharska D, Lannuzel A, Lackmy-Port-Lis M, Maurey H, Dusser A, Bru M, Gilbert-Dussardier B, Roubertie A, Kaminska A, Whalen S, Mignot C, Baulac S, Lesca G, Arzimanoglou A, LeGuern E. (2011) Mutations and deletions in PCDH19 account for various familial or isolated epilepsies in females. *Hum Mutat.*, 32:E1959-75.
68. D'Esposito M, Ciccodicola A, Gianfrancesco F, Esposito T, Flagiello L, Mazzarella R, Schlessinger D, D'Urso M. (1996) A synaptobrevin-like gene in the Xq28 pseudoautosomal region undergoes X inactivation. *Nat Genet.*, 13(2):227-9.
69. Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP, Mandel JL. (1993) The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nat Genet.*, 4(4):335-40.
70. Diaz BG, Moldoveanu T, Kuiper MJ, Campbell RL, Davies PL. (2004) Insertion sequence 1 of muscle-specific calpain, p94, acts as an internal propeptide. *J Biol Chem.*, 279(26):27656-27666.
71. Dibbens LM, Tarpey PS, Hynes K, Bayly MA, Scheffer IE, Smith R, Bomar J, Sutton E, Vandeleur L, Shoubridge C, Edkins S, Turner SJ, Stevens C, O'Meara S, Tofts C, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Halliday K, Jones D, Lee R, Madison M, Mironenko T, Varian J, West S, Widaa S, Wray P, Teague J, Dicks E, Butler A, Menzies A, Jenkinson A, Shepherd R, Gusella JF, Afawi Z, Mazarib A, Neufeld MY, Kivity S, Lev D, Lerman-Sagie T, Korczyn AD, Derry CP, Sutherland GR, Friend K, Shaw M, Corbett M, Kim HG, Geschwind DH, Thomas P, Haan E, Ryan S, McKee S, Berkovic SF, Futreal PA, Stratton MR, Mulley JC, Géczy J. (2008) X-linked protocadherin 19 mutations cause female-limited epilepsy and cognitive impairment. *Nat Genet.*, 40:776–81.
72. Dibbens LM, Kneen R, Bayly MA, Heron SE, Arsov T, Damiano JA, Desai T, Gibbs J, McKenzie F, Mulley JC, Ronan A, Scheffer IE. (2011) Recurrence risk of epilepsy

and mental retardation in females due to parental mosaicism of PCDH19 mutations. *Neurology* 76:1514-9.

73. Dimova PS, Kirov A, Todorova A, Todorov T, Mitev V. (2012) A novel PCDH19 mutation inherited from an unaffected mother. *Pediatr Neurol.*, 46(6):397-400.
74. Dincer P, Leturcq F, Richard I, Piccolo F, Yalnizoglu D, de Toma C, Akcoren Z, Broux O, Deburgrave N, Brenguier L, Roudant C, Urtizbera A, Jung D, tan E, Janpierre M, Campbell KP, Kaplan J, Beckmann JS, Topaloglu H. (1997) A biochemical, genetic and clinical survey of autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy in Turkey. *Ann Neurol*, 42: 222-229.
75. Dincer P, Akcoren Z, Demir E, Richard I, Sancak O, Kale G, Ozme S, Karaduman A, Tan E, Urtizbera A, Beckmann JS, Topaloglu H. (2000) A cross section of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies in 38 families. *J Med Genet*, 37(5): 361-367.
76. Dravet C, Bureau M, Oguni H, et al. Severe myoclonic epilepsy in infants. In: Roger J, Bureau M, Dravet C, Genton P, Tassinari CA, Wolf P, etc. (2002) *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence*. 3rd edn. London: John Libbey, 81–104.
77. Duchenne GBA (1868). *Recherches sur la paralysie musculaire pseudohypertrophique ou paralysie myo-sclerosique*. *Arch Gen Med*. 11:5-25.
78. Duflocq A, Le Bras B, Bullier E, Couraud F, Davenne M. (2008) Nav1.1 is predominantly expressed in nodes of Ranvier and axon initial segments. *Mol. Cell Neurosci.*, 39(2):180-92.
79. Ebach K, Joos H, Doose H, Stephani U, Kurlemann G, Fiedler B, Hahn A, Hauser E, Hundt K, Holthausen H, Müller U, Neubauer BA. (2005) SCN1A mutation analysis in myoclonic astatic epilepsy and severe idiopathic generalized epilepsy of infancy with generalized tonic-clonic seizures. *Neuropediatrics* 36(3):210-3.
80. Elia M, Falco M, Ferri R, Spalletta A, Bottitta M, Calabrese G, Carotenuto M, Musumeci SA, Lo Giudice M, Fichera M. (2008) CDKL5 mutations in boys with severe encephalopathy and early-onset intractable epilepsy. *Neurology* 71(13):997-9.

81. Emery AEH. (1988) Duchenne muscular dystrophy. In: Oxford monographs on medical genetics No15. Oxford University Press.
82. Emery AEH. (1989) Emery-Dreifuss syndrome. *J Med Genet.*, 26(10):637-41.
83. Emery AEH. (1994) Diagnostic criteria for neuromuscular disorders. European Neuromuscular Centre, Baarn, The Netherlands
84. Emond MR, Biswas S, Jontes JD. (2009) Protocadherin-19 is essential for early steps in brain morphogenesis. *Dev Biol.*, 334(1):72-83.
85. Engel J Jr. (2001) A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia* 42(6):796-803.
86. Eriksson M1, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, Erdos MR, Robbins CM, Moses TY, Berglund P, Dutra A, Pak E, Durkin S, Csoka AB, Boehnke M, Glover TW, Collins FS. (2003) Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423(6937):293-8.
87. Escayg A, MacDonald BT, Meisler MH, Baulac S, Huberfeld G, An-Gourfinkel I, Brice A, LeGuern E, Moulard B, Chaigne D, Buresi C, Malafosse A. (2000) Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nat Genet.*, 24(4):343-5.
88. Escayg A, Heils A, MacDonald BT, Haug K, Sander T, Meisler MH. (2001) A novel SCN1A mutation associated with generalized epilepsy with febrile seizures plus-and prevalence of variants in patients with epilepsy, *Am J Hum Genet.*, 68(4):866-873.
89. Fabisiak K, Erickson RP. (1990) A familial form of convulsive disorder with or without mental retardation limited to females: extension of a pedigree limits possible genetic mechanisms. *Clin Genet.*, 38:353-8.
90. Fanin M, Nascimbeni AC, Fulizio L, Trevisan CP, Meznaric-Petrusa M, Angelini C. (2003) Loss of calpain-3 autocatalytic activity in LGMD2A patients with normal protein expression. *Am J Pathol.*, 163(5):1929-36.

91. Fanin M, Fulizio L, Nascimbeni AC, Spinazzi M, Piluso G, Ventriglia VM, Ruzza G, Siciliano G, Trevisan CP, Politano L, Nigro V, Angelini C. (2004) Molecular diagnosis in LGMD2A: mutation analysis or protein testing? *Hum Mutat.*, 24(1):52-62.
92. Fardeau M, Eymard B, Mignard C, Tome FM, Richard I, Beckmann JS. (1996a) Chromosome 15-linked linked limb-girdle muscular dystrophy: clinical phenotypes in Reunion Island and French metropolitan communities. *Neuromusc Disord.*, 6: 447-453.
93. Fardeau M, Hillarie D, Mignard C, Feingold N, Feingold J, Mignard D, deUbeda B, Collin H, Tome FMS, Richard I, Beckmann J. (1996b) Juvenile limb-girdle muscular dystrophy. Clinical, histopathological and genetic data from a small community living in the Reunion Island. *Brain*, 119: 295-308.
94. Feener CA, Boyce FM, Kunkel LM. (1991) Rapid detection of CA polymorphisms in cloned DNA: application to the 5' region of the dystrophin gene. *Am J Hum Genet* 48(3):621-7.
95. Fisher DZ, Chaudhary N, Blobel G. (1986) cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(17):6450-4.
96. Frank M, Kemler R. (2002) Protocadherins. *Curr Opin Cell Biol.*, 14(5):557-62.
97. Fujiwara T, Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, Takahashi Y, Fukushima K, Watanabe M, Hara K, Morikawa T, Yagi K, Yamakawa K, Inoue Y. (2003) Mutations of sodium channel alpha subunit type 1 (SCN1A) in intractable childhood epilepsies with frequent generalized tonic-clonic seizures. *Brain* 126(Pt3):531–546.
98. Fukuma G, Oguni H, Shirasaka Y, Watanabe K, Miyajima T, Yasumoto S, Ohfu M, Inoue T, Watanachai A, Kira R, Matsuo M, Muranaka H, Sofue F, Zhang B, Kaneko S, Mitsudome A, Hirose S. (2004) Mutations of neuronal voltage-gated Na<sup>+</sup> channel alpha 1 subunit gene SCN1A in core severe myoclonic epilepsy in infancy (SMEI) and in borderline SMEI (SMEB). *Epilepsia* 45:140–8.

99. Gaitan Y, Bouchard M. (2006) Expression of the delta-protocadherin gene *Pcdh19* in the developing mouse embryo. *Gene Expr Patterns* 6(8):893-9.
100. Galvagni F, Saad FA, Danieli GA, Miorin M, Vitiello L, Mostacciuolo ML, Angelini C. (1994) A study on duplications of the dystrophin gene: evidence of a geographical difference in the distribution of breakpoints by intron. *Hum Genet.*, 94:83-87.
101. Gambardella A, Marini C. (2009) Clinical spectrum of *SCN1A* mutations. *Epilepsia* 50 Suppl 5:20-3.
102. Gargus JJ, Tournay A. (2007) Novel mutation confirms seizure locus *SCN1A* is also familial hemiplegic migraine locus *FHM3*. *Pediatr Neurol.*, 37(6):407-10.
103. Gennaro E, Santorelli FM, Bertini E, Buti D, Gaggero R, Gobbi G, Lini M, Granata T, Freri E, Parmeggiani A, Striano P, Veggiotti P, Cardinali S, Bricarelli FD, Minetti C, Zara F. (2006) Somatic and germline mosaicisms in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Biochem Biophys Res Commun.*, 341(2):489-93.
104. Georgieva B, Todorova A, Tournev I, Mitev V, Plageras P, Kremensky I. (2005) 550delA mutation in calpain 3 (*CAPN3*) gene: *DMD/BMD*, *SMA*, or *LGMD2A* – clinically misdiagnosed cases. *Am J Med Genet* 136A:399-400.
105. Ghosh RP, Horowitz-Scherer RA, Nikitina T, Gierasch LM, Woodcock CL. (2008) Rett-syndrome causing mutations in human *MeCP2* result in diverse structural changes that impact folding and DNA interactions. *J Biol Chem* 283(29):20523-20534.
106. Glass CA, Glass JR, Taniura H, Hasel KW, Blevitt JM, Gerace L. (1993) The alpha-helical rod domain of human lamins A and C contains a chromatin binding site. *EMBO J.*, 12(11):4413-24.
107. Glaze DG, Percy AK, Skinner S, Motil KJ, Neul JL, Barrish JO, Lane JB, Geerts SP, Annese F, Graham J, McNair L, Lee HS. (2010) Epilepsy and the natural history of Rett syndrome. *Neurology* 74(11):909–12.
108. Grasso, M, Faravelli, F, Lo Nigro, C, et al. (1999) Mosaicism for the full mutation and a microdeletion involving the CGG repeat and flanking sequences in the *FMR1* gene in eight fragile X patients. *Am J Med Genet.*, 85: 311–16.

109. Guideri F, Acampa M, Hayek G, Zappella M, Di Perri T. (1999) Reduced heart rate variability in patients affected with Rett syndrome. A possible explanation for sudden death. *Neuropediatrics* 30(3):146-8.
110. Hagberg B, Aicardi J, Dias K, Ramos O. (1983) A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: report of 35 cases. *Ann Neurol.*, 14(4):471-9.
111. Hagberg B and Hadberg G. (1997) Rett syndrome: epidemiology and geographical variability. *Eur Child Adolesc Psych* 1:5-7.
112. Hagerman RJ, Van Housen K, Smith AC, McGavran L. (1984a) Consideration of connective tissue dysfunction in the fragile X syndrome. *American Journal of Medical Genetics* 17(1): 111-21.
113. Hagerman R J and Synhorst D P. (1984b) Mitral valve prolapse and aortic dilatation in the fragile X syndrome. *American Journal of Medical Genetics* 17(1): 123-31.
114. Hamed SA. (2006) Drug evaluation: PTC-124-a potential treatment of cystic fibrosis and Duchenne muscular dystrophy. *IDrugs*. 9(11):783-9.
115. Hardwick SA, Reuter K, Williamson SL, Vasudevan V, Donald J, Slater K, Bennetts B, Bebbington A, Leonard H, Williams SR, Smith RL, Cloosterman D, Christodoulou J. (2007) Delineation of large deletions of the MECP2 gene in Rett syndrome patients, including a familial case with a male proband. *Eur J Hum Genet* 15:1218-1229.
116. Harkin LA, McMahon JM, Iona X, Dibbens L, Pelekanos JT, Zuberi SM, Sadleir LG, Andermann E, Gill D, Farrell K, Connolly M, Stanley T, Harbord M, Andermann F, Wang J, Batish SD, Jones JD, Seltzer WK, Gardner A. (2007) Infantile Epileptic Encephalopathy Referral Consortium, G. Sutherland, S.F. Berkovic, J.C. Mulley, I.E. Scheffer. The spectrum of SCN1A-related infantile epileptic encephalopathies. *Brain* 130:843-852.
117. Heinemann SH, Terlau H, Stuhmer W, Imoto K, Numa S. (1992) Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature (Lond)* 356:441-443.

118. Henke W, Herdel K, Jung K, Schnorr D and Loening SA. (1997) Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 25(19):3957-3958.
119. Herasse M, Ono Y, Fougerousse F, Kimura E, Stockholm D, Beley C, Montarras D, Pinset C, Sorimachi H, Suzuki K, Beckmann JS, Richard I. (1999) Expression and functional characteristics of calpain 3 isoforms generated through tissue-specific transcriptional and posttranscriptional events. *Mol Cell Biol.*, 19(6):4047-55.
120. Hertel N, Redies C. (2011) Absence of layer-specific cadherin expression profiles in the neocortex of the reeler mutant mouse. *Cereb Cortex* 21(5):1105-17.
121. Higurashi N, Shi X, Yasumoto S, Oguni H, Sakauchi M, Itomi K, Miyamoto A, Shiraishi H, Kato T, Makita Y, Hirose S. (2012) PCDH19 mutation in Japanese females with epilepsy. *Epilepsy Res.*, 99(1-2):28-37.
122. Hoffman EP, Brown RHJr, Kunkel LM. (1987) Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell.* 51 (6): 919-928.
123. Höger TH, Krohne G, Kleinschmidt JA. (1991) Interaction of *Xenopus* lamins A and LII with chromatin in vitro mediated by a sequence element in the carboxyterminal domain. *Exp Cell Res.*, 197(2):280-9.
124. Hu X, Ray PN, Worton RG. (1991) Mechanisms of tandem duplication in the Duchenne muscular dystrophy gene include both homologous and nonhomologous intrachromosomal recombination. *EMBO J.*, 10:2471-2477.
125. Huang Y, Wang KK. (2001) The calpain family and human disease. *Trends Mol Med.*, 7(8):355-362.
126. Hutchison CJ, Alvarez-Reyes M, Vaughan OA. (2001) Lamins in disease: why do ubiquitously expressed nuclear envelope proteins give rise to tissue-specific disease phenotypes? *J Cell Sci.*, 114(Pt1):9-19.
127. Hynes K1, Tarpey P, Dibbens LM, Bayly MA, Berkovic SF, Smith R, Raisi ZA, Turner SJ, Brown NJ, Desai TD, Haan E, Turner G, Christodoulou J, Leonard H, Gill D, Stratton MR, Gecz J, Scheffer IE. (2010) Epilepsy and mental retardation limited to females with PCDH19 mutations can present de novo or in single generation families. *J Med Genet.*, 47(3):211-6.

128. Jamal SM1, Basran RK, Newton S, Wang Z, Milunsky JM. (2010) Novel de novo PCDH19 mutations in three unrelated females with epilepsy female restricted mental retardation syndrome. *Am J Med Genet A.*, 152A(10):2475-81.
129. Jia Z, Petrounevitch V, Wong A, Moldoveanu T, Davies PL, Elce JS, Beckmann JS. (2001) Mutations in calpain 3 associated with limb girdle muscular dystrophy: analysis by molecular modeling and by mutation in m-calpain. *Biophys J.*, 80(6):2590-2596.
130. Jin P, Warren ST. (2000) Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet.*, 9:901-908.
131. Joncourt F, Burgunder J, Steinlin M, Gallati S. (2003) LGMD2A caused by a large deletion: clinical, histochemical and molecular analysis. *Eur J Hum Genet* .,11, Supplement 1, P667.
132. Juberg RC, Hellman CD. (1971) A new familial form of convulsive disorder and mental retardation limited to females. *J Pediatr.*, 79:726–32.
133. Junghans D, Haas IG, Kemler R. (2005) Mammalian cadherins and protocadherins: about cell death, synapses and processing. *Curr Opin Cell Biol.*, 17(5):446-52.
134. Kalaydjieva L, Eigel A, Horst J. The molecular basis of beta thalassaemia in Bulgaria. *J Med Genet.* 1989; 26(10):614-8.
135. Kanai K, Hirose S, Oguni H, Fukuma G, Shirasaka Y, Miyajima T, Wada K, Iwasa H, Yasumoto S, Matsuo M, Ito M, Mitsudome A, Kaneko S. (2004) Effect of localization of missense mutations in SCN1A on epilepsy phenotype severity. *Neurology* 63:329–34.
136. Kanai K, Yoshida S, Hirose S, Oguni H, Kuwabara S, Sawai S, Hiraga A, Fukuma G, Iwasa H, Kojima T, Kaneko S. (2009) Physicochemical property changes of amino acid residues that accompany missense mutations in SCN1A affect epilepsy phenotype severity. *J Med Genet.*, 46(10):671-9.
137. Kankirawatana P, Leonard H, Ellaway C et al. (2006) Early progressive encephalopathy in boys and MECP2 mutations. *Neurology* 67:164–166.

138. Kerr AM, Armstrong DD, Prescott RJ, Doyle D, Kearney DL. (1997) Rett syndrome: analysis of deaths in the British survey. *Europ Child Adolesc Psychiat.*, 6 (suppl. 1): 71-74.
139. Khaniani MS, Kalitsis P, Burgess T, Slater HR. (2008) An improved diagnostic PCR assay for identification of cryptic heterozygosity for CGG triplet repeat alleles in the Fragile X gene (FMR1). *Mol Cytogenet.*, 8:1-6.
140. Kim SY, Chung HS, Sun W, Kim H. (2007) Spatiotemporal expression pattern of non-clustered protocadherin family members in the developing rat brain. *Neuroscience* 147(4):996-1021.
141. Kim SY, Mo JW, Han S, Choi SY, Han SB, Moon BH, Rhyu IJ, Sun W, Kim H. (2010) The expression of non-clustered protocadherins in adult rat hippocampal formation and the connecting brain regions. *Neuroscience* 170(1):189-99.
142. Kimura K, Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, Hoshino K, Nomura Y, Tateno A, et al. (2005) A missense mutation in SCN1A in brothers with severe myoclonic epilepsy in infancy (SMEI) inherited from a father with febrile seizures. *Brain Dev.*, 27:424–30.
143. King SC, Stapleton PM, Walker AP, Love DR. (1994) Two dinucleotide repeat polymorphisms at the DMD locus. *Hum Mol Genet* 3(3):523.
144. Kleefstra T, Yntema HG, Oudakker AR, Romein T, Sistermans E, Nillessen W, van Bokhoven H, de Vries BBA, Hamel BCJ. (2002) De novo MECP2 frameshift mutations in a boy with moderate mental retardation, obesity and gynaecomastia. *Clin Genet.*, 61:359-362.
145. Köchling S, den Dunnen JT, Dworniczak B, Horst J. (1995) Two polymorphic dinucleotide repeats in intron 44 of the dystrophin gene. *Hum Genet* 95(4):475-7.
146. Koekkoek SK, Yamaguchi K, Milojkovic BA, Dortland BR, Ruigrok TJ, Maex R, De Graaf W, Smit AE, VanderWerf F, Bakker CE, Willemsen R, Ikeda T, Kakizawa S, Onodera K, Nelson DL, Mientjes E, Joosten M, De Schutter E, Oostra BA, Ito M, De Zeeuw CI. (2005) Deletion of FMR1 in Purkinje cells enhances parallel fiber LTD, enlarges spines, and attenuates cerebellar eyelid conditioning in Fragile X syndrome. *Neuron* 47(3):339-52.

147. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener CA, Kunkel LM (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell.*,50:509-517.
148. Krawczak M, Cooper DN. (1991) Gene deletions causing human genetic disease: mechanisms of mutagenesis and the role of the local DNA sequence environment. *Hum Genet.* 86(5):425-41.
149. Krawczak M, Reiss J, Cooper DN. (1992) The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet.*, 90(1-2):41-54.
150. Krishna KK, Hertel N, Redies C. (2011) Cadherin expression in the somatosensory cortex: evidence for a combinatorial molecular code at the single-cell level. *Neuroscience* 175:37-48.
151. Kunkel TA, Alexander PS. (1986) The base substitution fidelity of eucaryotic DNA polymerases. Mismatching frequencies, site preferences, insertion preferences, and base substitution by dislocation. *J Biol Chem* 261(1):160-6.
152. Lammerding J, Schulze PC, Takahashi T, Kozlov S, Sullivan T, Kamm RD, Stewart CL, Lee RT. (2004) Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J Clin Invest.*, 113(3):370-8.
153. Lee SSJ, Wan M, Francke U. (2001) Spectrum of MECP2 mutations in Rett syndrome. *Brain and Development* 23:S138-S143.
154. Lehrke R. (1972) A theory of X-linkage of major intellectual traits. *Am J Ment Defic* 76:611-619.
155. Lenk U, Hanke R, Kraft U, Grade K, Grunewald I, Speer A. (1993) Non-isotopic analysis of single strand conformation polymorphism (SSCP) in the exon 13 region of the human dystrophin gene. *J Med Genet.* 30: 951-954.
156. Lin CC, Draper PN, De Braekeleer M. (1985) High-resolution chromosomal localization of the beta-gene of the human beta-globin gene complex by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 39:269-274.

157. Lin F, Worman HJ. (1993) Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J Biol Chem.*, 268(22):16321-6.
158. Lossin C, Wang DW, Rhodes TH, Vanoye CG, George AL Jr. (2002) Molecular basis of an inherited epilepsy. *Neuron* 34:877–884.
159. Lossin C, Rhodes TH, Desai RR, Vanoye CG, Wang D, Carniciu S, Devinsky O, George AL Jr. (2003) Epilepsy-associated dysfunction in the voltage-gated neuronal sodium channel SCN1A. *J Neurosci.*, 23(36):11289-95.
160. Lossin CA. (2009) Catalog of SCN1A variants. *Brain Dev.*, 31(2):114-30.
161. Lubs HA. (1969) A marker X chromosome. *Am J Hum Genet* 21(3):231-44.
162. Lugtenberg D, Kleefstra T, Oudakker AR, Nillesen WM, Yntema HG, Tzschach A, Raynaud M, Rating D, Journel H, Chelly J, Goizet C, Lacombe D, Pedespan JM, Echenne B, Tariverdian G, O'Rourke D, King MD, Green A, van Kogelenberg M, Van Esch H, Gecz J, Hamel BC, van Bokhoven H, de Brouwer AP. (2009) Structural variation in Xq28: MECP2 duplications in 1% of patients with unexplained XLMR and in 2% of male patients with severe encephalopathy. *Eur J Hum Genet.*, 17(4):444-53. Erratum in: *Eur J Hum Genet.*, (2009) 17(5):697.
163. Lutz RJ1, Trujillo MA, Denham KS, Wenger L, Sinensky M. (1992) Nucleoplasmic localization of prelamin A: implications for prenylation-dependent lamin A assembly into the nuclear lamina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(7):3000-4.
164. Madia F, Striano P, Gennaro E, Malacarne M, Paravidino R, Biancheri R, Budetta M, Cilio MR, Gaggero R, Pierluigi M, Minetti C, Zara F. (2006) Cryptic chromosome deletions involving SCN1A in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Neurology* 67:1230-1235.
165. Makri S, Clarke NF, Richard P, Maugenre S, Demay L, Bonne G, Guicheney P. (2009) Germinal mosaicism for LMNA mimics autosomal recessive congenital muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.*, 19(1):26-8.
166. Malhotra SB, Hart KA, Klamut HJ, Thomas NST, Bodrug SE, Burghes AHM, Bobrow M, Harper PS, Thompson MW, Ray PN, Worton RG. (1988) Frame-shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Science.*, 242:755-759.

167. Malo MS, Blanchard BJ, Andresen JM, Srivastava K, Chen X-N, Li X, Jabs EW, Korenberg JR, Ingram VM. (1994) Localization of a putative human brain sodium channel gene (SCN1A) to chromosome band 2q24. *Cytogenet Cell Genet.*, 67: 178-186.
168. Marini C, Mei D, Cross JH, Guerrini R. (2006) Mosaic SCN1A mutation in familial severe myoclonic epilepsy of infancy. *Epilepsia* 47:1737–1740.
169. Marini C, Mei D, Temudo T, Ferrari AR, Buti D, Dravet C, Dias AI, Moreira A, Calado E, Seri S, Neville B, Narbona J, Reid E, Michelucci R, Sicca F, Cros HJ, Guerrini R. (2007) Idiopathic epilepsies with seizures precipitated by fever and SCN1A abnormalities. *Epilepsia* 48(9):1678-85.
170. Marini C, Scheffer IE, Nabbout R, Mei D, Cox K, Dibbens LM, McMahon JM, Iona X, Carpintero RS, Elia M, Cilio MR, Specchio N, Giordano L, Striano P, Gennaro E, Cross JH, Kivity S, Neufeld MY, Afawi Z, Andermann E, Keene D, Dulac O, Zara F, Berkovic SF, Guerrini R, Mulley JC. (2009) SCN1A duplications and deletions detected in Dravet syndrome: implications for molecular diagnosis. *Epilepsia* 50(7):1670-8.
171. Marini C, Mei D, Parmeggiani L, Norci V, Calado E, Ferrari A, Moreira A, Pisano T, Specchio N, Vigevano F, Battaglia D, Guerrini R. (2010) Protocadherin 19 mutations in girls with infantile-onset epilepsy. *Neurology* 75(7):646-53.
172. Mattei JF, Mattei MG, Aumeras C, Auger M, Giraud F. (1981) X-linked mental retardation with the fragile X: a study of 15 families. *Hum Genet* 59:281-289.
173. Matthews PM, Benjamin D, van Bakel I, Squier MV, Nicholson LV, Sewry C, Barnes PRJ, Hopkin J, Brown R, Hilton-Jones D, Boyd Y, Karpati G, Brown GK, Craig W. (1995) Muscle X - inactivation patterns and dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy carriers. *Neuromusc Disord*, Vol. 5, 3:209-220.
174. McKeon FD, Kirschner MW, Caput D. (1986) Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature* 319(6053):463-8.

175. Meehan RR, Lewis JD, Bird A. (1992) Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. *Nucleic Acids Res.*, 20:5085-5092.
176. Melani F, Mei D, Pisano T, Savasta S, Franzoni E, Ferrari AR, Marini C, Guerrini R. (2011) CDKL5 gene-related epileptic encephalopathy: electroclinical findings in the first year of life. *Dev Med Child Neurol.*, 53:354–360.
177. Mendell JR1, Boué DR, Martin PT. (2006) The congenital muscular dystrophies: recent advances and molecular insights. *Pediatr Dev Pathol.*, 9(6):427-43.
178. Milà M, Castellví-Bel S, Sánchez A, Lázaro C, Villa M, Estivill X. (1996) Mosaicism for the fragile X syndrome full mutation and deletions within the CGG repeat of the FMR1 gene. *J Med Genet.*, 33: 338–40.
179. Miller RG, Layzer RB, Mellenthin MA, Golabi M, Francoz RA, Mall JC. (1985) Emery-Dreifuss muscular dystrophy with autosomal dominant transmission. *Neurology* 35(8):1230-3.
180. Mingroni-Netto RC, Haddad LA, Vianna-Morgante AM. (1996) The number of CGG repeats of the FMR1 locus in premutated and fully mutated heterozygotes and their offspring: implications for the origin of mosaicism. *Am J Med Genet.*, 64: 270–3.
181. Miorin M, Todorova A, Vitiello L, Rosa M, Mostacciuolo ML, Danieli GA. (1997) Detection of heterozygotes for intragenic deletions in families with recurrence of Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Basic Appl Myol* 7(3):265-269.
182. Moldoveanu T, Hosfield CM, Lim D, Elce JS, Jia Z, Davies PL. (2002) A Ca<sup>2+</sup> switch aligns the active site of calpain. *Cell.*, 108(5):649-660.
183. Moldoveanu T, Jia Z, Davies PL. (2004) Calpain activation by cooperative Ca<sup>2+</sup> binding at two non-EF-hand sites. *J Biol Chem.*, 279(7):6106-6114.
184. Monaco AP, Bertelson CJ, Middlesworth W, Coletti C-A, Aldridge J, Fischbeck KH, Bartlett RJ, Pericak-vance MA, Roses AD, Kunkel LM. (1985) Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. *Nature.*, 316:842-845.

185. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. (1988) An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics.*, 2:90-95.
186. Morimoto M, Mazaki E, Nishimura A, Chiyonobu T, Sawai Y, Murakami A, Nakamura K, Inoue I, Ogiwara I, Sugimoto T, Yamakawa K. (2006) SCN1A mutation mosaicism in a family with severe myoclonic epilepsy in infancy. *Epilepsia* 47:1732–6.
187. Morishita H, Yagi T. (2007) Protocadherin family: diversity, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol.*, 19(5):584-92.
188. Moser SJ, Weber P, Lütschg J. (2007) Rett syndrome: clinical and electrophysiologic aspects. *Pediatr Neurol.*, 36(2):95–100.
189. Muchir A, Bonne G, van der Kooi AJ, van Meegen M, Baas F, Bolhuis PA, de Visser M, Schwartz K. (2000) Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet.*, 9(9):1453-9.
190. Mueller CR and Grimm T. (1986) Estimation of the male to female ratio of mutation rates from the segregation of X chromosomal DNA haplotypes in Duchenne muscular dystrophy families. *Hum Genet.*, 74:181-183.
191. Mulley JC, Scheffer IE, Petrou S, Dibbens LM, Berkovic SF, Harkin LA. (2005) SCN1A mutations and epilepsy. *Hum Mutat.*, 25(6):535-542.
192. Mulley JC, Nelson P, Guerrero S, Dibbens L, Iona X, McMahon JM, Harkin L, Schouten J, Yu S, Berkovic SF, Scheffer IE. (2006) A new molecular mechanism for severe myoclonic epilepsy of infancy: exonic deletions in SCN1A. *Neurology* 67(6):1094-5.
193. Nabbout R, Dulac O. (2003a) Epileptic encephalopathies: a brief overview. *J Clin Neurophysiol.*, 20(6):393-7.
194. Nabbout R, Gennaro E, Dalla Bernardina B, Dulac O, Madia F, Bertini E, Capovilla G, Chiron C, Cristofori G, Elia M. (2003b) Spectrum of SCN1A mutations in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Neurology* 60:1961–1967.

195. Neilan BA, Leigh DA, McDonald BL. (1993) The rapid analysis of dystrophin gene deletions shows variable electrophoretic mobility. *J Med Genet* 30:60-61.
196. Neul JL, Fang P, Barrish J, Lane J, Caeg EB, Smith EO, Zoghbi H, Percy A, Glaze DG. (2008) Specific mutations in methyl-CpG-binding protein 2 confer different severity in Rett syndrome. *Neurology* 70:1313–1321.
197. Neul JL, Kaufmann WE, Glaze DG, Christodoulou J, Clarke AJ, Bahi-Buisson N, Leonard H, Bailey ME, Schanen NC, Zappella M, Renieri A, Huppke P, Percy AK; RettSearch Consortium. (2010) Rett syndrome: revised diagnostic criteria and nomenclature. *Ann Neurol.*, 68(6):944-50.
198. Nigro G, Politano L, Nigro V, Petretta VR, Comi LI (1994). Mutation of dystrophin gene and cardiomyopathy. *Neuromusc Disord.*, 4:371-379.
199. Nikolova V, Leimena C, McMahon AC, Tan JC, Chandar S, Jogia D, Kesteven SH, Michalicek J, Otway R, Verheyen F, Rainer S, Stewart CL, Martin D, Feneley MP, Fatkin D. (2004) Defects in nuclear structure and function promote dilated cardiomyopathy in lamin A/C-deficient mice. *J Clin Invest.*, 113(3):357-69.
200. Nissenkorn A, Gak E, Vecsler M, Reznik H, Menascu S, Ben Zeev B. (2010) Epilepsy in Rett syndrome - the experience of a National Rett Center. *Epilepsia* 51(7):1252–8.
201. Noda M, Suzuki H, Numa S, and Stuhmer W. (1989) A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS. Lett.*, 259:213–216.
202. Nolin SL, Glicksman A, Houck GE Jr, Brown WT, Dobkin CS. (1994) Mosaicism in fragile X affected males. *Am J Med Genet.*, 51: 509–12.
203. Nolin SL, Brown WT, Glicksman A, Houck GE Jr, Gargano AD, Sullivan A, Biancalana V, Bröndum-Nielsen K, Hjalgrim H, Holinski-Feder E, Kooy F, Longshore J, Macpherson J, Mandel JL, Matthijs G, Rousseau F, Steinbach P, Väisänen ML, von Koskull H, Sherman SL. (2003) Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am J Hum Genet.*, 72(2):454-64.
204. Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, Schouten JP, Errami A. (2005) Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of

- CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res* 33(14):e128.
205. O'Connell CD, Atha DH, Jakupciak JP, Amos JA, Richie K. (2002) Standardization of PCR amplification for fragile X trinucleotide repeat measurements. *Clin Genet.*, 61(1):13-20.
  206. Ohmori I, Ouchida M, Ohtsuka Y, Oka E, Shimizu K. (2002) Significant correlation of the SCN1A mutations and severe myoclonic epilepsy in infancy. *Biochem Biophys Res Commun.*, 295:17–23.
  207. Ono Y, Kakinuma K, Torii F, Irie A, Nakagawa K, Labeit S, Abe K, Suzuki K, Sorimachi H. (2004) Possible regulation of the conventional calpain system by skeletal muscle-specific calpain, p94/calpain 3. *J Biol Chem.*, 279(4):2761-2771.
  208. Ono Y, Sorimachi H, Suzuki K. (1998a) Breakthroughs and views: structure and physiology of calpain, an enigmatic protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 245: 289-294.
  209. Ono Y, Shimada H, Sorimachi H, Richard I, Saido TC, Beckmann JS, Ishiura S, Suzuki K.(1998b) Functional defects of a muscle-specific calpain, p94, caused by mutations associated with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *J Biol Chem.*, 273(27):17073-17078.
  210. Opitz JM, Westphal JM, Daniel A. (1984) Discovery of a connective tissue dysplasia in the Martin-Bell syndrome. *Am J Med Genet* 17(1):101-9.
  211. Orrico A, Galli L, Grosso S, Buoni S, Pianigiani R, Balestri P, Sorrentino V. (2009) Mutational analysis of the SCN1A, SCN1B and GABRG2 genes in 150 Italian patients with idiopathic childhood epilepsies. *Clin Genet.*, 75(6):579-81.
  212. Oshima J, Magner DB, Lee JA, Breman AM, Schmitt ES, White LD, Crowe CA, Merrill M, Jayakar P, Rajadhyaksha A, Eng CM, del Gaudio D. (2009) Regional genomic instability predisposes to complex dystrophin gene rearrangements. *Hum Genet* 126: 411-423.

213. Ostlund C, Bonne G, Schwartz K, Worman HJ. (2001) Properties of lamin A mutants found in Emery-Dreifuss muscular dystrophy, cardiomyopathy and Dunnigan-type partial lipodystrophy. *J Cell Sci.* 114(Pt24):4435-45.
214. Oudet C, Heilig R, Mandel JL. (1990) An informative polymorphism detectable by polymerase chain reaction at the 3' end of dystrophin gene. *Hum Genet* 85(6):677.
215. Passos-Bueno MR, Bakker E, Kneppers AL, Takata RI, Rapaport D, den Dunnen JT, Zatz M, van Ommen GJ. (1992) Different mosaicism frequencies for proximal and distal Duchenne muscular dystrophy (DMD) mutations indicate difference in etiology and recurrence risk. *Am J Hum Genet.* 51(5):1150-5.
216. Passos-Bueno MR, Vainzof M, Moreira ES, Zatz M. (1999) The seven autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies in the Brazilian population: from LGMD2A to LGMD2G. *Am J Med Genet,* 82(5): 392-398.
217. Patel SD, Chen CP, Bahna F, Honig B, Shapiro L. (2003) Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family. *Curr Opin Struct Biol.,* 13(6):690-8.
218. Patel SD, Ciatto C, Chen CP, Bahna F, Rajebhosale M, Arkus N, Schieren I, Jessell TM, Honig B, Price SR, Shapiro L. (2006) Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity. *Cell* 124(6):1255-68.
219. Penrose LS. (1938) A clinical and genetic study of 1280 cases of mental defect. HMSO, London, Vol.229
220. Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, Nelson DL. (1991) Absence of expression of the FMR1 gene in fragile X syndrome. *Cell* 66:817-822.
221. Piluso G, Politano L, Aurino S, Fanin M, Ricci E, Ventriglia VM, Belsito A, Totaro A, Saccone V, Topaloglu H, Nascimbeni AC, Fulizio L, Broccolini A, Canki-Klain N, Comi LI, Nigro G, Angelini C, Nigro V. (2005) Extensive scanning of the calpain-3 gene broadens the spectrum of LGMD2A phenotypes. *J Med Genet.,* 42(9):686-93.
222. Pintaudi M, Calevo MG, Vignoli A, Parodi E, Aiello F, Baglietto MG, Hayek Y, Buoni S, Renieri A, Russo S, Cogliati F, Giordano L, Canevini M, Veneselli E. (2010) Epilepsy in Rett syndrome: Clinical and genetic features. *Epilepsy Behav.,* 19(3):296– 300.

223. Plummer NW, Meisler MH. (1999) Evolution and diversity of mammalian sodium channel genes. *Genomics* 57:323–331.
224. Pogoda TV, Krakhmaleva IN, Lipatova NA, Shakhovskaya NI, Shishkin SS, Limborska SA. (2000) High incidence of 550delA mutation of CAPN3 in LGMD2 patients from Russia. *Hum Mutat.*, 15(3):295.
225. Pyeritz RE, Stamberg J, Thomas GH, Bell BB, Zahka KG, Bernhardt BA. (1982) The marker Xq28 syndrome ("Fragile-X SYndrome") in a retarded man with mitral valve prolapse. *Johns Hopkins Med J* 151(5):231-7.
226. Raffaele Di Barletta M, Ricci E, Galluzzi G, Tonali P, Mora M, Morandi L, Romorini A, Voit T, Orstavik KH, Merlini L, Trevisan C, Biancalana V, Housmanowa-Petrusewicz I, Bione S, Ricotti R, Schwartz K, Bonne G, Toniolo D. (2000) Different mutations in the LMNA gene cause autosomal dominant and autosomal recessive Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Am J Hum Genet.*, 66(4):1407-12.
227. Raharjo WH, Enarson P, Sullivan T, Stewart CL, Burke B. (2001) Nuclear envelope defects associated with LMNA mutations cause dilated cardiomyopathy and Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *J Cell Sci.* 114(Pt24):4447-57.
228. Ravn K, Nielsen JB, Skjeldal OH, Kerr A, Hulten M, Schwartz M. (2005) Large genomic rearrangements in MECP2. *Hum Mut* 25(3):324-329.
229. Redies C, Vanhalst K, Roy F. (2005) delta-Protocadherins: unique structures and functions. *Cell Mol Life Sci.*, 62(23):2840-52.
230. Reichart B, Klafke R, Dreger C, Krüger E, Motsch I, Ewald A, Schäfer J, Reichmann H, Müller CR, Dabauvalle MC. (2004) Expression and localization of nuclear proteins in autosomal-dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy with LMNA R377H mutation. *BMC Cell Biol.*, 30;5:12.
231. Reid CA, Berkovic SF, Petrou S. (2009) Mechanisms of human inherited epilepsies. *Prog Neurobiol.*, 87(1):41-57.
232. Reiss AL, Freund L, Tseng JE, Joshi PK. (1991a) Neuroanatomy in fragile X females: the posterior fossa. *Am J Hum Genet.*, 49(2):279-88.

233. Reiss AL, Aylward E, Freund LS, Joshi PK, Bryan RN. (1991b) Neuroanatomy of fragile X syndrome: the posterior fossa. *Ann Neurol* 29(1):26-32.
234. Rett A. (1966) On a unusual brain atrophy syndrome in hyperammonemia in childhood. *Wien Med Wochenschr* 116(37):723-6.
235. Rett A. (1977) Social and preventive measures for mentally handicapped children (author's transl). *Ther Umsch* 34(1):49-51.
236. Reverter D, Strobl S, Fernandez-Catalan C, Sorimachi H, Suzuki K, Bode W. (2001) Structural basis for possible calcium-induced activation mechanisms of calpains. *Biol Chem.*, 382(5):753-766.
237. Richard I, Broux O, Allamand V, Fougerousse F, Chiannikulchai N, Bourg N, Brenguier L, Devaud C, Pasturaud P, Roudaut C, Hillarie D, Passos-Bueno MR, Zatz M, Tischfield J, Fardeau M, Jackson CE, Cohen D and Beckmann JS. (1995) Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell*, 81(1):27-40.
238. Richard I, Roudaut C, Saenz A, Pogue R, Grimbergen JE, Anderson LV, Beley C, Cobo AM, de Diego C, Eymard B, Gallano P, Ginjaar HB, Lasa A, Pollitt C, Topaloglu H, Urtizbera JA, de Visser M, van der Kooi A, Bushby K, Bakker E, Lopez de Munain A, Fardeau M, Beckmann JS. (1999) Calpainopathy-a survey of mutations and polymorphisms. *Am J Hum Genet* 64:1524-1540.
239. Richard I, Roudaut C, Marchand S, Baghdiguian S, Herasse M, Stockholm D, Ono Y, Suel L, Bourg N, Sorimachi H, Lefranc G, Fardeau M, Sebille A, Beckmann JS. (2000) Loss of calpain 3 proteolytic activity leads to muscular dystrophy and to apoptosis-associated IkappaBalpha/nuclear factor kappaB pathway perturbation in mice. *J Cell Biol.*, 151(7):1583-1590.
240. Richards RI, Holman K, Kozman H, Kremer E, Lynch M, Pritchard M, Yu S, Mulley J, Sutherland GR. (1991) Fragile X syndrome: genetic localisation by linkage mapping of two microsatellite repeats FRAXAC1 and FRAXAC2 which immediately flank the fragile site. *J Med Genet* 28: 818-823.

241. Raharjo WH, Enarson P, Sullivan T, Stewart CL, Burke B. (2001) Nuclear envelope defects associated with LMNA mutations cause dilated cardiomyopathy and Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *J Cell Sci.*, 114(Pt24):4447-57.
242. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui L-C. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245:1066-1073.
243. Roberts RG, Coffey AJ, Bobrow M, Bentley DR (1993). Exon structure of the human dystrophin gene. *Genomics.*, 16:536-538.
244. Rosales-Reynoso MA, Vilatela EA, Ojeda RM, Arce-Rivas A, Sandoval L, Troyo-Sanromán R, Barros-Núñez P. (2007) PCR approach for detection of Fragile X syndrome and Huntington disease based on modified DNA: limits and utility. *Genet Test* 11(2):153-9.
245. Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, Blumenfeld S, Kretz C, Boué J, Tommerup N, Van Der Hagen C, DeLozier-Blanchet C, Croquette MF, et al. (1991) Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N Engl J Med.*, 325(24):1673-81.
246. Rousseau F, Rouillard P, Morel M-L, Khandjian EW, Morgan K. (1995) Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMRI gene – and implications for the population genetics of the Fragile X syndrome. *Am J Hum Genet* 57:1006-1018.
247. Ryan SG, Chance PF, Zou CH, Spinner NB, Golden JA, Smietana S. (1997) Epilepsy and mental retardation limited to females: an X-linked dominant disorder with male sparing. *Nat Genet.*, 17(1):92-5.
248. Saad FA, Vita G, Toffolatti L, Danieli GA. (1994) A possible missense mutation detected in the dystrophin gene by double strand conformation analysis (DSCA). *Neuromusc. Disord.* 4: 335-341.
249. Saenz A, Leturcq F, Cobo AM, Poza JJ, Ferrer X, Otaegui D, Camano P, Urtasun M, Vilchez J, Gutierrez-Rivas E, Emparanza J, Merlini L, Paisan C, Goicoechea M, Blazquez L, Eymard B, Lochmuller H, Walter M, Bonnemann C, Figarella-Branger D,

- Kaplan JC, Urtizberea JA, Marti-Masso JF, Lopez de Munain A. (2005) LGMD2A: genotype-phenotype correlations based on a large mutational survey on the calpain 3 gene. *Brain.*, 128(Pt 4):732-742.
250. Sanger F (1981). Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science.*, 214(4526):1205-10.
251. Sato C, Ueno Y, Asai K, Takahashi K, Sato M, Engel A, Fujiyoshi Y. (2001) The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities. *Nature (Lond)* 409:1047–1051.
252. Scala E, Ariani F, Mari F, Caselli R, Pescucci C, Longo I, Meloni I, Giachino D, Bruttini M, Hayek G, Zappella M, Renieri A. (2005) CDKL5/STK9 is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms. *J Med Genet.*, 42:103-107.
253. Scheffer IE, Harkin LA, Dibbens LM, Mulley JC, Berkovic SF. (2005) Neonatal epilepsy syndromes and generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+). *Epilepsia* 46 Suppl 10:41-7.
254. Scheffer IE, Zhang YH, Jansen FE, Dibbens L. (2009) Dravet syndrome or genetic (generalized) epilepsy with febrile seizures plus? *Brain Dev.*, 31(5):394-400.
255. Schmucker B, Seidel J. (1999) Mosaicism for a full mutation and a normal size allele in two fragile X males. *Am J Med Genet.*, 84:221–5.
256. Shapiro MB, Senapathy P. (1987) RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res.*, 15(17):7155-74.
257. Sherman SL, Marsteller F, Abramowitz AJ, Scott E, Leslie M, Bregman J. (2002) Cognitive and behavioral performance among FMR1 high-repeat allele carriers surveyed from special education classes. *Am J Med Genet.*, 114(4):458-65.
258. Sinensky M1, Fantle K, Trujillo M, McLain T, Kupfer A, Dalton M. (1994) The processing pathway of prelamin A. *J Cell Sci.*, 107(Pt1):61-7.

259. Singh R, Andermann E, Whitehouse WPA, Harvey S, Keene DL, Seni M-H, Crossland KM, Andermann F, Berkovic SF, Scheffer IE. (2001) Severe myoclonic epilepsy of infancy: extended spectrum of GEFS+? *Epilepsia* 42:837-44.
260. Sorimachi H, Ohmi S, Emori Y, Kawasaki H, Saido TC, Ohno S, Minami Y, Suzuki K. (1990) A novel member of the calcium-dependent cysteine protease family. *Biol Chem Hoppe Seyler.*, 371: 171-176.
261. Sorimachi H, Toyama-Sorimachi N, Saido TC, Kawasaki H, Sugita H, Miyasaka M, Arahata K, Ishiura S, Suzuki K. (1993) Muscle-specific calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation, resulting in disappearance from muscle. *J Biol Chem.*, 268(14):10593-10605.
262. Sorimachi H, Kinbara K, Kimura S, Takanashi M, Ishiura S, Sasagawa N, Sorimachi N, Shimada H, Tagawa K, Maruyama K, Suzuki K. (1995) Muscle specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence. *J Biol Chem*, 270: 31155-31162.
263. Sorimachi H, Kimura S, Kinbara K, Kazama J, Takanashi M, Yajima H, Ishiura S, Sasagawa N, Nonaka I, Sugita H, Maruyama K, Suzuki K. (1996) Structure and physiological function of ubiquitous and tissue-specific calpain species. Muscle-specific calpain, p94, interacts with connectin/titin. *Adv. Biophys.*, 33:101-122.
264. Sorimachi H, Imajoh-Ohmi S, Emori Y, Kawasaki H, Ohno S, Minami Y, Suzuki K. (1998) Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J Biol Chem.*, 264(33): 20106-20111.
265. Specchio N, Marini C, Terracciano A, Mei D, Trivisano M, Sicca F, Fusco L, Cusmai R, Darra F, Bernardina BD, Bertini E, Guerrini R, Vigeveno F. (2011) Spectrum of phenotypes in female patients with epilepsy due to protocadherin 19 mutations. *Epilepsia* 52(7):1251-7.
266. Speckman RA, Garg A, Du F, Bennett L, Veile R, Arioglu E, Taylor SI, Lovett M, Bowcock AM. (2000) Mutational and haplotype analyses of families with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety) reveal recurrent missense mutations in the globular C-terminal domain of lamin A/C. *Am J Hum Genet.*, 66(4):1192-8.

267. Starling A, de Paula, Silva H, Vainzof M, Zatz M. (2003) Calpainopathy: how broad is the spectrum of clinical variability? *J Mol Neurosci.*, 21(3):233-236.
268. Steffenburg U, Hagberg G, Hagberg B. (2001) Epilepsy in a representative series of Rett syndrome. *Acta Paediatr.*, 90:34–9.
269. Stuurman N, Heins S, Aebi U. (1998) Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol.*, 122(1-2):42-66.
270. Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, Fukushima K, Shimomura J, Fujiwara T, Hamano S, Inoue Y, Yamakawa K. (2002) Frequent mutations of SCN1A in severe myoclonic epilepsy in infancy. *Neurology* 58(7):1122-4.
271. Sullivan AK, Crawford DC, Scott EH, Leslie ML, Sherman SL. (2002) Paternally transmitted FMR1 alleles are less stable than maternally transmitted alleles in the common and intermediate size range. *Am J Hum Genet.*, 70(6):1532-44.
272. Suls A, Claeys KG, Goossens D, Harding B, Van Luijk R, Scheers S, Deprez L, Audenaert D, Van Dyck T, Beeckmans S, Smouts I, Ceulemans B, Lagae L, Buyse G, Barisic N, Misson JP, Wauters J, Del-Favero J, De Jonghe P, Claes LR. (2006) Microdeletions involving the SCN1A gene may be common in SCN1A-mutation-negative SMEI patients. *Hum Mutat.*, 27(9):914-20.
273. Szabo P, Purrello M, Rocchi M, Archidiacono N, Alhadeff B, Filippi G, Toniolo D, Martini G, Luzzatto L, Siniscalco M. (1984) Cytological mapping of the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene distal to the fragile-X site suggests a high rate of meiotic recombination across this site. *Proc Nat Acad Sci* 81: 7855-7859.
274. Tabolacci E, Pomponi MG, Pietrobono R, Chiurazzi P, Neri G. (2007) A unique case of reversion to normal size of a maternal premutation FMR1 allele in a normal boy. *Eur J Hum Genet* 16: 209–14.
275. Tagawa K, Taya C, Hayashi Y, Nakagawa M, Ono Y, Fukuda R, Karasuyama H, Toyama-Sorimachi N, Katsui Y, Hata S, Ishiura S, Nonaka I, Seyama Y, Arahata K, Yonekawa H, Sorimachi H, Suzuki K. (2000) Myopathy phenotype of transgenic mice expressing active site-mutated inactive p94 skeletal muscle-specific calpain, the gene product

- responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A. *Hum Mol Genet.*, 9(9):1393-1402.
276. Tai K, Kubota M, Shiono K, Tokutsu H, Suzuki ST. (2010) Adhesion properties and retinofugal expression of chicken protocadherin-19. *Brain Res.*, 1344:13-24.
277. Taniura H, Glass C, Gerace L. (1995) A chromatin binding site in the tail domain of nuclear lamins that interacts with core histones. *J Cell Biol.*, 131(1):33-44.
278. Tassone F, Pan R, Amiri K, Taylor AK, Hagerman PJ. (2008) A rapid polymerase chain reaction-based screening method for identification of all expanded alleles of the fragile X (FMR1) gene in newborn and high-risk populations. *J Mol Diagn.*, 10:43-49.
279. Tazir M, Azzedine H, Assami S, Sindou P, Nouioua S, Zemmouri R, Hamadouche T, Chaouch M, Feingold J, Vallat JM, Leguern E, Grid D. (2004) Phenotypic variability in autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease due to the R298C mutation in lamin A/C. *Brain* 127(Pt1):154-63.
280. Todorov T, Todorova A, Kirov A, Dimitrov B, Carvalho R, Nygren AOH, Boneva I, Mitev V. (2009) Fragile X mosaic male full mutation/normal allele detected by PCR/MS-MLPA. *BMJ Case Reports* [doi:10.1136/bcr.06.2008.0139].
281. Todorov T, Todorova A, Avdjieva D, Dimova P, Angelova L, Tincheva R, Mitev V. (2010a) Molecular basis of mental retardation in a sample from Bulgaria. *Genet Counseling* 21(2): 257-262.
282. Todorov T, Todorova A, Avdjieva D, Dimova P, Angelova L, Tincheva R, Mitev V. (2010b) Clinical and molecular data on mental retardation in Bulgaria. *Balkan J Med Genet* 13(2): 11-25.
283. Todorov T, Todorova A, Georgieva B, Mitev V. (2010c) A unified rapid PCR method for detection of normal and expanded trinucleotide alleles of CAG repeats in Huntington chorea and CGG repeats in Fragile X syndrome. *Mol Biotechnol.*, 45:150-154.
284. Todorov T, Todorova A, Motoescu C, Dimova P, Iancu D, Craiu D, Stoian D, Barbarii L, Bojinova V, Mitev V. (2012) Spontaneous recurrent mutations and a complex rearrangement in the MECP2 gene in the light of current models of mutagenesis. *Mutat Res.* 734(1-2):69-72.

285. Todorova A, Bronzova J, Miorin M, Rosa M, Kremensky I, Danieli GA. (1996) Mutation analysis in Duchenne and Becker muscular dystrophy patients from Bulgaria shows a peculiar distribution of breakpoints by intron. *Am J Med Genet.*, 65:40-43.
286. Todorova A and Danieli GA. (1997) Large majority of single nucleotide mutations along the dystrophin gene can be explained by more than one mechanism of mutagenesis. *Hum Mutat.*, 9:537-547.
287. Todorova A, Fracasso C, Kremensky I, Danieli GA. (1999) Single-nucleotide mutations in the human dystrophin gene. The possible role of sequence motifs and repeated elements in mutagenesis. *Balkan J of Med Genet* 2(4):13-20.
288. Todorova A, Constantinova D, Kremensky I. (2003a) Dilated cardiomyopathy and new 16bp deletion in exon 44 of the dystrophin gene: The possible role of repeated motifs in mutation generation.
289. Todorova A, Halliger-Keller B, Walter MC, Dabauvalle MC, Lochmüller H, Müller CR. (2003b) A synonymous codon change in the LMNA gene alters mRNA splicing and causes limb girdle muscular dystrophy type 1B. *J Med Genet.* 40(10):e115.
290. Todorova A, Kress W, Mueller CR. (2005) Novel mutations in calpain 3 gene in Germany. *Clin Genet* 67:356-358.
291. Todorova A, Halliger-Keller B, Kress W, Tournev I, Dabauvalle MC, Kremensky I, Mueller CR. The mutation spectrum of the lamin A/C gene (LMNA): A single gene-multiple diseases. Chapter X in the book "Progress in Medical Genetics", published by Nova Science Publishers, Inc. 2006, pp.229-257.
292. Todorova A, Georgieva B, Tournev I, Todorov T, Bogdanova N, Mitev V, Mueller CR, Kremensky I, Horst J. (2007) A large deletion and novel point mutations in the calpain 3 gene (CAPN3) in Bulgarian LGMD2A patients. *Neurogenetics* 8:225-229.
293. Todorova A, Todorov T, Georgieva B, Lukova M, Guergueltcheva V, Kremensky I, Mitev V. (2008) MLPA analysis/complete sequencing of the DMD gene in a group of Bulgarian Duchenne/Becker muscular dystrophy patients. *Neuromusc Disorders* 18(8):667-670.

294. Todorova A, Guerguelcheva V, Genova J, Mihaylova V, Todorov T, Tchamova T, Georgieva B, Kremensky I, Tournev I, Mitev V. (2009) Molecular diagnostics of Duchenne/Becker muscular dystrophy patients by multiplex ligation-dependent probe amplification analysis and direct sequencing. *Balkan Journal of Medical Genetics* 12(2):3-9.
295. Todorova A, Litvinenko I, Todorov T, Tincheva R, Avdjieva D, Tincheva S, Mitev V. (2013) A family with fragile X syndrome, Duchenne muscular dystrophy and ichthyosis transmitted by an asymptomatic carrier. *Clin Genet.*, 85(3):286-9.
296. Turner G, Webb T, Wake S, Robinson H. (1996) The prevalence of the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 64:196-197.
297. Urtasun M, Saenz A, Roudaut C, Poza JJ, Urtizbera JA, Cobo AM, Richard I, Garcia Bragado F, Leturcq F, Kaplan JC, Marti Masso JF, Beckmann JS, Lopez de Munain A. (1998) Limb-girdle muscular dystrophy in Guipuzcoa (Basque Country, Spain). *Brain* 121:1735-47.
298. Vainzof M, Anderson LVB, Moreira ES, Paula F, Pavanello RCM, Passos-Bueno MR, Zatz M. (2000) Calpain 3: Characterization of the primary defect in LGMD2A and analysis of its secondary effect in other LGMDs. *Neurology*, 54:A436 (abstract).
299. van den Ouweland AM, de Vries BB, Bakker PL, Deelen WH, de Graaff E, van Hemel JO, Oostra BA, Niermeijer MF, Halley DJ. (1994) DNA diagnosis of the fragile X syndrome in a series of 236 mentally retarded subjects and evidence for a reversal mutation in the FMR1 gene. *Am J Med Genet.*, 51: 482-5.
300. van der Kooi AJ, Barth PG, Busch HF, de Haan R, Ginjaar HB, van Essen AJ, van Hooff LJ, Howeler CJ, Jennekens FG, Jongen P, Oosterhuis HJ, Padberg GW, Spaans F, Wintzen AR, Wokke JH, Bakker E, van Ommen GJ, Bolhuis PA, de Visser M. (1996a) The clinical spectrum of limb girdle muscular dystrophy. A survey in The Netherlands. *Brain*, 119:1471-1480.
301. van der Kooi AJ, Ledderhof TM, de Voogt WG, Res CJ, Bouwsma G, Troost D, Busch HF, Becker AE, de Visser M. (1996b) A newly recognized autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with cardiac involvement. *Ann Neurol.*, 39(5):636-42.

302. van Deutekom JC, Bremmer-Bout M, Janson AA, Ginjaar IB, Baas F, den Dunnen JT, van Ommen GJ. (2001) Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum Mol Genet.* 10(15):1547-54.
303. Van Ommen GJB, Verkerk JMH, Hofker MH, Monaco AP, Kunkel LM, Ray P, Worton RG, Wieringa B, Bakker E, Pearson PL. (1986) A physical map of 4 million base pairs around the Duchenne muscular dystrophy gene on the human X-chromosome. *Cell.*, 47:499-504.
304. Van Ommen GJB, Bertelson CJ, Ginjaar HB, Den Dunnen JT, Bakker E, Chelly J, Matton M, Van Essen AJ, Bartley JA, Kunkel LM, Pearson PL. (1987) Long-range genomic map of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: Isolation and use of J66 (DXS268), a distal intragenic marker. *Genomics.*, 1:329-336.
305. Vanhalst K, Kools P, Staes K, van Roy F, Redies C. (2005) delta-Protocadherins: a gene family expressed differentially in the mouse brain. *Cell Mol Life Sci.*, 62(11):1247-59.
306. Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP. (1991) Identification of a gene (FMR1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 65:905-914.
307. Vilain A, Apiou F, Vogt N, Dutrillaux B, Malfoy B. (1996) Assignment of the gene for methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2) to human chromosome band Xq28 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.*, 74(4):293-4.
308. Wallace RH, Scheffer IE, Barnett S, Richards M, Dibbens L, Desai RR, Lerman-Sagie T, Lev D, Mazarib A, Brand N, Ben-Zeev B, Goikhman I, Singh R, Kremmidiotis G, Gardner A, Sutherland GR, George AL Jr, Mulley JC, Berkovic SF. (2001) Neuronal sodium-channel alpha1-subunit mutations in generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Am J Hum Genet.*, 68(4):859-865.
309. Wallace RH, Hodgson BL, Grinton BE, Gardiner RM, Robinson R, Rodriguez-Casero V, Sadleir L, Morgan J, Harkin LA, Dibbens LM, Yamamoto T, Andermann E, Mulley JC, Berkovic SF, Scheffer IE. (2003) Sodium channel alpha1-subunit mutations in severe myoclonic epilepsy of infancy and infantile spasms. *Neurology* 61:765-9.

310. Wan M, Lee SSJ, Zhang X, Houwink-Manville I, Song HR, Amir RE, Budden S, Naidu S, Pereira JL, Lo IF, Zoghbi HY, Schanen NC, Francke U. (1999) Rett syndrome and beyond: recurrent spontaneous and familial MECP2 mutations at CpG hotspots. *Am J Hum Genet* 65:1520-1529.
311. Wang JW, Kurahashi H, Ishii A, Kojima T, Ohfu M, Inoue T, Ogawa A, Yasumoto S, Oguni H, Kure S, Fujii T, Ito M, Okuno T, Shirasaka Y, Natsume J, Hasegawa A, Konagaya A, Kaneko S, Hirose S. (2008) Microchromosomal deletions involving SCN1A and adjacent genes in severe myoclonic epilepsy in infancy. *Epilepsia* 49:1528-34.
312. Wang KK. (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.*, 23(2):59, pp 20-26.
313. Weber K1, Plessmann U, Traub P. (1989) Maturation of nuclear lamin A involves a specific carboxy-terminal trimming, which removes the polyisoprenylation site from the precursor; implications for the structure of the nuclear lamina. *FEBS Lett.* 257(2):411-4.
314. White SJ, Aartsma-Rus A, Flanigan KM, Weiss RB, Kneppers ALJ, Lalic T, Janson AAM, Ginjaar HB, Breuning MH, den Dunnen JT. (2006) Duplications in the DMD gene. *Hum Mutat* 27:938-945.
315. Wieland I, Jakubiczka S, Muschke P, Cohen M, Thiele H, Gerlach KL, Adams RH, Wieacker P. (2004) Mutations of the ephrin-B1 gene cause craniofrontonasal syndrome. *Am J Hum Genet.*, 74(6):1209-15.
316. Wydner KL, McNeil JA, Lin F, Worman HJ, Lawrence JB. (1996) Chromosomal assignment of human nuclear envelope protein genes LMNA, LMNB1, and LBR by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 32(3):474-8.
317. Yagi T, Takeichi M. (2000) Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev* 14(10):1169-80.
318. Yates JR. (1991) European workshop on Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.*, (6):393-6.

319. Yates JR. (1997) 43rd ENMC International Workshop on Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy, 22 June 1996, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.*, 7(1):67-9.
320. Yim SY, Jeon BH, Yang JA, Kim HJ. (2008) Fragile X syndrome in Korea: a case series and a review of the literature. *J Korean Med Sci.*, 23(3):470-6.
321. Yordanova I, Todorov T, Dimova P, Hristova D, Tincheva R, Litvinenko I, Yotovska O, Kremensky I, Todorova A (2011) One novel Dravet syndrome causing mutation and one recurrent MAE causing mutation in SCN1A gene. *Neurosci Lett.* 494(2):180-3.
322. Yu FH and Catterall WA. (2004) The VGL chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Science STKE* 253:re15.
323. Yu FH, Yarov-Yarovoy V, Gutman GA, Catterall WA. (2005) Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol Rev.*, 57(4):387-95.
324. Yu F, Zingler N, Schumann G, Strätling WH. (2001) Methyl-CpG-binding protein 2 represses LINE-1 expression and retrotransposition but not Alu transcription. *Nucleic Acids Research* 29(21):4493-4501.
325. Zacharias AS, Wagener ME, Warren ST, Hopkins LC. (1999) Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Semin Neurol.*, 19(1):67-79.
326. Zatz M, Vainzof M, Passos-Bueno MR. (2000) Limb-girdle muscular dystrophy: one gene with different phenotypes, one phenotype with different genes. *Current Opinion in Neurology*, 13:511-517.
327. Zatz M, de Paula F, Starling A, Vainzof M. (2003) The 10 autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord.*, 13: 532-544.
328. Zhou, Y, Law, HY, Boehm, CD, et al. (2004) Robust fragile X (CGG)<sub>n</sub> genotype classification using a methylation specific triple PCR assay. *J Med Genet.*, 41: e45.

## Електронни източници

1. <http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/FMR1.jpeg>
2. <http://www.cardiovascularultrasound.com>
3. <http://www.dmd.nl>
4. <http://www.dmd.nl/LMNA>
5. <http://www.dxline.info/diseases/becker-muscular-dystrophy>
6. <http://www.genecards.org>
7. <http://www.genome.ucsc.edu>
8. <http://www.ghr.nlm.nih.gov>
9. <http://www.ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/cdk15.jpeg>
10. <http://www.ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/mecp2.jpeg>
11. <http://www.ghr.nlm.nih.gov/gene/SCN1A>
12. <http://www.ghr.nlm.nih.gov/gene=foxg1>
13. <http://www.hindawi.com>
14. <http://www.humgen.nl>
15. <http://www.mecp2.chw.edu.au>
16. [http://www.medscape.com/viewarticle/758553\\_7](http://www.medscape.com/viewarticle/758553_7)
17. <http://www.mlpa.com>
18. <http://www.mmcneuro.wordpress.com>
19. <http://www.molgen.ua.ac.be/SCN1AMutations/>
20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=309550>
21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=309550>
22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>

23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM/LMNA>
24. <http://www.neurology.org>
25. <http://www.neuromuscular.wustl.edu/musdist/dag2/htm>
26. <http://www.prescottgenomics.wikispaces.com>
27. <http://www.protein.bio.unipd.it/research/disease.html>
28. <http://www.quest.mda.org>
29. <http://www.zorknot.com/tag/fragile-x/>

## ИЗВОДИ

1. Познанията ни за човешкия геном, за взаимодействието между генетични и епигенетични фактори, за това как да интерпретираме всеки резултат и да анализираме генотип-фенотипните корелации, търпят динамично ежедневно развитие.
2. Възможностите на съвременните технологии за генетична диагностика са огромни и се развиват с бързи темпове, което изисква постоянно обучени и квалифициране от страна на специалистите.
3. Бурното развитие на технологиите увеличи значително нашите възможности за мутационен скрининг и изясняване на носителски статус в засегнатите семейства.
4. Навлизането на биоинформатиката в молекулярно-генетичната диагностика представлява мощно средство за *in silico* оценка на патогенния ефект на мутациите.
5. Мозаечен генотип по отношение на някои мутации в изследваните гени е причина за разлики във фенотипната изява на заболяванията.
6. Провеждането на генетични изследвания при пациента, без участие на неговите родители или други ключови родственици, би могло да доведе до грешна интерпретация на получените резултати и оценка на патогенния ефект на откритите генетични изменения.
7. Генотип-фенотипните интерпретации при някои от описаните заболявания, въпреки моногенното унаследяване, противоречат на стандартните разбирания за връзка между генетичен дефект и фенотипна изява на заболяването. Установени са значителни вътрефамилни разлики в клиничната симптоматика при носителите на мутации и вариации от асимптоматично носителство до тежка клинична симптоматика. Възможна е намесата на други генетични и епигенетични фактори.
8. В някои гени възникват *de novo* мутации, причинени от независими мутационни събития, но често засягат едни и същи нуклеотиди или генни региони. При различни пациенти и популации се откриват едни и същи мутации, което предполага прякото участие на околната секвенция и архитектура във възникването на мутационните събития.
9. Комплексни мутационни събития върху един алел биха могли да се обяснят с геномната архитектура на региона и наличието на повторени елементи, чието присъствие може да генерира нестабилни ДНК структури, едноверижни нарушения

и прекръстосвания в ДНК, колапс на репликационната вилка и приплъзване на полимеразата.

10. Няма единен механизъм на мутагенеза, който да бъде приложим при всички мутационни събития. Вероятността за възникване на мутация в дадена позиция на гена се увеличава при положение, че независими механизми на мутагенеза могат да я провокират точно в тази позиция; водеща роля изглежда че има околната секвенция и нейната архитектура.
11. Синонимни замени в човешкия геном не могат да се приемат директно като непатогенни, необходими са доказателства за това.
12. Най-важният урок в ежедневната диагностична практика е интерпретирането на резултатите от генетичните изследвания. Всеки конкретен резултат, колкото и убедително да изглежда на пръв поглед като патогенен или непатогенен трябва да се интерпретира с повишено внимание.
13. Необходим е интердисциплинарен подход за правилното интерпретиране на резултатите от генетичните и геномни изследвания.

## **ПРИНОСИ**

### **МЕТОДИЧНИ:**

Бяха разработени собствени методики за:

1. директна детекция на делеции в *DMD* гена;
2. полуколичествена детекция на дупликации в *DMD* гена;
3. полуколичествено доказване на хетерозиготно носителство на делеции в *DMD* гена;
4. амплификация и оразмеряване на CG-богати експанзии.

### **НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧНИ:**

1. Бяха проведени изследвания върху механизмите на мутагенеза в човешкия геном и участието на околната секвенция и 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 двойноспирални вторични структури.
3. Бяха представени убедителни доказателства не само за експандирането, но и за контрахирането на динамични CGG експанзии в човешкия геном.

### **ПРИЛОЖНО-ДИАГНОСТИЧНИ:**

1. Беше доказана първата дупликация в *DMD* гена при български пациент.
2. Беше доказана първата точкова мутация в *DMD* гена при български пациент.
3. За пръв път беше изяснен носителски статус в българско ДМД семейство с липсващ индексен пациент.
4. Беше доказан на молекулно ниво първия случай на калпаинопатия в България.
5. Беше доказана първата голяма делеция в *CAPN3* гена при български пациент.
6. Беше доказан на молекулно ниво първия случай на мускулна дистрофия Emery-Dreifuss в България.
7. Беше доказана синонимна замяна, която има патогенен сплайсинг ефект. Това е един от малкото известни случаи от този тип в литературата.
8. Беше оразмерена първата CGG експанзия в *FMRI* гена при български пациент.
9. Беше проследен за пръв път при български пациенти феномена на мозаицизъм, породен от експандиране и контрахиране на CGG повтор.
10. Беше доказан на молекулно ниво първия случай на епилептична енцефалопатия тип 9 в България.

11. Беше доказан на молекулно ниво първия случай на епилептична енцефалопатия тип 2 в България.

12. Разработих съвременни диагностични алгоритми, съобразени с наличните технологии, които доведоха до следната успеваемост на молекулярно-генетичната диагностика у нас:

Мускулна дистрофия тип Duchenne/Becker - близка до 100% (около ~67% при семействата с липсващ индексен пациент);

Мускулна дистрофия пояс-крайник тип 2А - близка до 85%;

Ламинопатии - 71%.

Синдром на чуплива X хромозома – 11% (процентът е нисък поради смесения характер на изследваната група, тук попадат всякакви синдроми с интелектуален дефицит и аутизъм);

Синдром на Rett – 36%;

Епилептични енцефалопатии с ранно начало – 36%;

Dravet синдром – 31%.

#### **ПРИНОСИ ЗА СВЕТОВНИТЕ БАЗИ ДАННИ:**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>

Leiden Muscular dystrophy pages: <http://www.dmd.nl>

LOVD, Leiden Open Variation Database: <http://www.humgenprojects.lumc.nl/LOVD/>

## ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

№	Публикация в международни списания	IF	Индивидуален IF	Цитирания
1	Bronzova J, <b>Todorova A</b> , Kalaydjieva L. (1994) Detection of carriers of deletions in the dystrophin gene in Bulgarian DMD-BMD families. Hum Genet. 93(2):170-4.	<b>2.758</b>	<b>0.919</b>	<b>5</b>
2	<b>Todorova A</b> , Constantinoва D, Kremensky I. (2003a) Dilated cardiomyopathy and new 16bp deletion in exon 44 of the dystrophin gene: The possible role of repeated motifs in mutation generation.	<b>2.603</b>	<b>0.868</b>	<b>6</b>
3	<b>Todorova A</b> , Halliger-Keller B, Walter MC, Dabauvalle MC, Lochmüller H, Müller CR. (2003b) A synonymous codon change in the LMNA gene alters mRNA splicing and causes limb girdle muscular dystrophy type 1B. J Med Genet. 40(10):e115.	<b>6.368</b>	<b>1.061</b>	<b>15</b>
4	<b>Todorova A</b> , Kress W, Mueller CR. (2005) Novel mutations in calpain 3 gene in Germany. Clin Genet 67:356-358.	<b>3.276</b>	<b>1.092</b>	<b>7</b>
5	(Georgieva B, <b>Todorova A</b> ), equal contribution Tournev I, Mitev V, Plageras P, Kremensky I. (2005) 550delA mutation in calpain 3 (CAPN3) gene: DMD/BMD, SMA, or LGMD2A – clinically misdiagnosed cases. Am J Med Genet 136A:399-400.	<b>1.913</b>	<b>0.319</b>	<b>3</b>
6	<b>Todorova A</b> , Georgieva B, Tournev I, Todorov T, Bogdanova N, Mitev V, Mueller CR, Kremensky I, Horst J. (2007) A large deletion and novel point mutations in the calpain 3 gene (CAPN3) in Bulgarian LGMD2A patients. Neurogenetics 8:225-229.	<b>4.281</b>	<b>0.476</b>	<b>7</b>
7	<b>Todorova A</b> , Todorov T, Georgieva B, Lukova M, Guerguelcheva V, Kremensky I, Mitev V. (2008) MLPA analysis/complete sequencing of the DMD gene in a group of Bulgarian Duchenne/Becker muscular dystrophy patients. Neuromusc Disorders 18(8):667-670.	<b>2.932</b>	<b>0.419</b>	<b>6</b>
8	(Todorov T, <b>Todorova A</b> ), equal contribution Kirov A, Dimitrov B, Carvalho R, Nygren AOH,	---	---	<b>5</b>

	Boneva I, Mitev V. (2009) Fragile X mosaic male full mutation/normal allele detected by PCR/MS-MLPA. <i>BMJ Case Reports</i> [doi:10.1136/bcr.06.2008.0139].			
9	(Todorov T, <b><u>Todorova A</u></b> ), equal contribution Avdjieva D, Dimova P, Angelova L, Tincheva R, Mitev V. (2010) Molecular Basis of mental retardation in a sample from Bulgaria. <i>Genetic Counseling</i> 21(2):257-262.	<b>0.395</b>	<b>0.056</b>	<b>1</b>
10	(Todorov T, <b><u>Todorova A</u></b> ), equal contribution Georgieva B, Mitev V. (2010) A unified rapid PCR method for detection of normal and expanded trinucleotide alleles of CAG repeats in Huntington chorea and CGG repeats in Fragile X syndrome. <i>Mol Biotechnol.</i> , 45:150-154.	<b>2.091</b>	<b>0.523</b>	<b>5</b>
11	Yordanova I, Todorov T, Dimova P, Hristova D, Tincheva R, Litvinenko I, Yotovska O, Kremensky I, <b><u>Todorova A</u></b> (2011) One novel Dravet syndrome causing mutation and one recurrent MAE causing mutation in SCN1A gene. <i>Neurosci Lett.</i> 494(2):180-3.	<b>2.105</b>	<b>0.234</b>	<b>5</b>
12	(Todorov T, <b><u>Todorova A</u></b> ), equal contribution Motoescu C, Dimova P, Iancu D, Craiu D, Stoian D, Barbarii L, Bojinova V, Mitev V. (2012) Spontaneous recurrent mutations and a complex rearrangement in the MECP2 gene in the light of current models of mutagenesis. <i>Mutat Res.</i> 734(1-2):69-72.	<b>3.902</b>	<b>0.390</b>	<b>1</b>
13	Dimova PS, Kirov A, <b><u>Todorova A</u></b> , Todorov T, Mitev V. (2012) A novel PCDH19 mutation inherited from an unaffected mother. <i>Pediatr Neurol.</i> , 46(6):397-400.	<b>1.416</b>	<b>0.283</b>	<b>5</b>
14	<b><u>Todorova A</u></b> , Litvinenko I, Todorov T, Tincheva R, Avdjieva D, Tincheva S, Mitev V. (2013) A family with fragile X syndrome, Duchenne muscular dystrophy and ichthyosis transmitted by an asymptomatic carrier. <i>Clin Genet.</i> , 85(3):286-9.	<b>3.931</b>	<b>0.562</b>	<b>0</b>
	<b>Монографии и книги</b>			
1	<b><u>Todorova A</u></b> , Halliger-Keller B, Kress W, Tournev I, Dabauvalle MC, Kremensky I, Mueller CR. The mutation spectrum of the lamin A/C			

	gene (LMNA): A single gene-multiple diseases. Chapter X in the book “Progress in Medical Genetics”, published by Nova Science Publishers, Inc. 2006, pp.229-257.			
2	Chamova T, Tournev T, <b><u>Todorova A.</u></b> Approaches in diagnostic & care of Duchenne/Becker muscular dystrophy. Genotype-phenotype correlations in Duchenne/Becker muscular dystrophy patients. (2011). Lambert Academic Publishing. ISBN:978-3-8473-1737-1.			
	<b>ОБЩО:</b>	<b>37.971</b>	<b>7.202</b>	<b>71</b>