

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

МАРИЯ ЦАНЕВА ГЛУШКОВА

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

АВТОРЕФЕРАТ

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

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

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

София, 2018

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

Цитирани са 193 литературни източника и 15 електронни източника.

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

Включените в дисертацията изследвания са извършени в:

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

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

Дисертационният труд е представен на заседание на катедрен съвет на Катедра „Медицинска Химия и Биохимия“, Медицински Университет - София, на 29.01.2018 г. и насрочен за защита към 14.05.2018 г.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 14.05.2018 г. в Катедра Медицинска Химия и Биохимия, Медицински Университет София, ул. Здраве 2, гр. София, пред научно жури в състав:

1. Акад. проф. Иван Георгиев Иванов, дбн (рецензент)
2. Доц. Теодора Кънчева Чамова, дм (рецензент)
3. Акад. проф. д-р Ваньо Иванов Митев, дм, дбн
4. Доц. д-р Венета Любомирова Георгиева-Абаджиева, дм
5. Проф. д-р Людмила Бончева Ангелова, дм

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

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения	3
Резюме	4
Summary	5
Въведение.....	6
Цел и Задачи	9
Материали и методи.....	10
Резултати и обсъждане	11
Заключение	47
Изводи	49
Библиография	50
Публикации и научни прояви	52
Приноси.....	54

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ЦНС - централна нервна система
NF1 - Неврофиброматоза тип 1
NF2 - Неврофиброматоза тип 2
TSC - Tuberosus sclerosis complex (Комплекс туберкулозна склероза)
VHL - синдром на von Hippel-Lindau
NF - Неврофиброматози
SNF - сегментна NF
CAL - café-au-lait („кафе с мляко“)
ПНС - периферната нервна система
ПН - плексиформен неврофибром
г.в. - годишна възраст
ГТКП - генерализирани тонично-клонични пристъпи
ГТФ/GTP - гуанозин трифосфат/guanosine triphosphate
CSRД - cysteine/serine rich domain (цистеин/серин богат домен)
ТВД - tubulin binding domain (тубулин свързващ домен)
GRD - GTPase-activating protein (GAP)-related domain или Ras/GAP домен (домен за свързване с RAS и ГТФ)
ФАК - focal adhesion kinase-interacting domain (домен отговорен за свързване с кинази)
цАМФ - цикличен Аденозин монофосфат
МАРК - RAS/mitogen-activated protein kinase (сигналият път на митоген-активирана протеин киназа)
PI3K - фосфатидилинозитол 3-киназа
PCR/ПВР - Polymerase Chain Reaction (Полимеразна верижна реакция)
MLPA - Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
БВШ - билатерални вестибуларни шваноми
ч.м.н. - черепномозъчен нерв
ERM - ezrin-radixin-moesin (езрин-радиксин-моезин)
mTOR - mammalian target of rapamycin/ mechanistic target of rapamycin
ХП - хипопигментни петна
СЕГА - Субепендимен гигантоклетъчен астроцитом
ЛАМ - Лимфангиоматоза
ФЕ - фокална епилепсия
ССД - coiled-coil домен
mTORC1 - mammalian target of rapamycin complex 1/mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTOR комплекс 1)
ХБ - хемангиобластом; цХБ – ХБ на ЦНС; рХБ – ХБ на ретината
БКК - бъбречен клетъчен карцином
Фео - феохромоцитом
HIF-1 α - Hypoxia-inducible factor 1-alpha (Хипоксия-индуцируем фактор 1-алфа)
VEGFA - Vascular endothelial growth factor A (васкуларен ендотелен фактор А)
ДНК - Дезоксирибонуклеинова киселина

РЕЗЮМЕ

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

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

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

Настоящото проучване представлява и първата стъпка по посока на молекулярно-генетично охарактеризиране на Комплекс туберозна склероза при български пациенти. Диагнозата беше потвърдена при 94% от анализиранията прицелна група. При четирима пациенти бяха открити нови непубликувани *TSC2* мутации в световната литература, от които две *frameshift*, една *nonsense* и една голяма делеция на 16 екзона. В *TSC1* гена бяха открити две непубликувани мутации, една *nonsense* и една *frameshift*. В допълнение, бяха открити и 13 описани в литературата, патогенни варианти в двата гена, от които седем в *TSC2* гена и шест в *TSC1* гена.

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

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

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

SUMMARY

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

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

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

The present study was the first one focused on the molecular-genetic characterization of Complex Tuberculous Sclerosis in Bulgarian patients. The diagnosis was confirmed in 94% of the patients from the analyzed group. In four patients novel *TSC2* mutations were found: two frameshift, one nonsense mutation and one large deletion of exons 1-16. Two novel mutations were found in the *TSC1* gene: one nonsense and one frameshift. In addition, 13 pathogenic variants were found in both genes, seven in the *TSC2* gene and six in the *TSC1* gene, all of them are known in the literature.

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

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

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

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

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

Стивън Хокинг

ВЪВЕДЕНИЕ

Съществуват повече от сто различни заболявания, които засягат растежа на различни тъкани и са асоциирани с динамична променлива прогноза, което ги отнася към така наречените ракови заболявания. Преди появата на съвременната молекулярна биология общото между тези заболявания е било нарушената регулация на тъканен растеж, водеща до образуване на тумори и последващото им разпространение в други тъкани [Vogelstein and Kinzler, 1993; Bishop, 1995; Weinberg, 1996]. Клетъчният растеж в раковите клетки включва не само по-бързото им делене в сравнение с нормалните клетки, но и нарушена регулация в растежа на засегнатия тъкан. Вече е известно, че процесът на образуване на тумор започва в резултат на нарушена регулация на единична прогениторна клетка. Туморите биха били клонални ако не е тенденцията да се различават генетично, поради високата скорост на мутиране на ДНК и склонност за генериране на големи хромозомни реанжировки. Различните ракови заболявания се характеризират с огромно многообразие, което е свързано с разнообразни причини за нарушена регулация на клетъчния цикъл. От друга страна се установява общ набор от генетични промени, които са в основата на почти всички известни ракови заболявания. Тези изменения включват два големи класа от гени: единият включва гени, кодиращи молекули, които участват и стимулират клетката към растеж, докато другият клас включва гени кодиращи белтъци, които инхибират клетъчния растеж. Въпреки че туморния растеж зависи от натрупването на мутации в много гени, промените в тези два класа гени е необходимо и важно условие за туморогенеза [Vogelstein and Kinzler, 1993; Bishop, 1995; Weinberg, 1996]. В контекста на човешката, и по-специално на медицинската онкогенетика, разпространението и честотата на мутации в различните гени водещи до развитието на туморни образувания сред деца и възрастни все още обаче не са напълно изяснени на молекулярно ниво. Познаването на такива мутации може да подобри разбирането на процеса туморогенеза, да даде възможност за правилна генетична консултация на пациентите и техните семейства, както и преценка за индивидуална терапия. В бъдеще се очаква и все по-широко приложение на гenna терапия, при която лечението да се насочва индивидуално към инсуфициентните гени.

След проучване от месец ноември 2015 година като част от проект на St. Jude–Washington University Pediatric Cancer Genome Project (PCGP; www.ebi.ac.uk/ega/search/site/PCGP) става ясна и честотата на типовете туморни образувания сред деца до 20 годишна възраст. От тях 21,9% засягат централната нервна система (ЦНС) [Zhang J *et al.*, 2015].

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

Исторически NF1, NF2 и шваноматози се означават с общия термин – Неврофиброматози. Това е група от заболявания, които предразполагат към развитие на тумори в ЦНС и абнормална кожна пигментация. Всеки тип се определя от наличие/отсъствие на петна „кафе с мляко“, лунички, от типа на развитие на тумор по периферните нерви (неврофибром или шваном) и други специфични характеристики засягащи очите. Неврофиброматозите предразполагат към образуване на множество тумори и по периферната нервна система (ПНС) и често се считат за класически тумор-супресорни заболявания. Молекулярният механизъм на тези заболявания не е напълно изяснен, но през последните десетилетия на миналия век, съвременните молекулярно-генетични анализи показваха, че NF имат различни клинични и генетични характеристики [Yohay, 2006]. Тип 1 NF се причинява от мутации в *NF1* гена, с честота 1:4000, докато тип 2 NF се причинява от мутации в *NF2* гена и се среща много рядко, с честота 1:40 000.

TSC е едно от най-често срещаните генетични заболявания с честота приблизително 1:6000 [Roach *et al.*, 1998]. Дефект в един от двата тумор-супресорни гени *TSC2* или *TSC1* причинява заболяването. Основна черта е развитието на доброкачествени тумори (хамартоми) локализирани в различни тъкани. Основата на наименованието туберозна склероза се дава от наличието на кортикални тубери, открити в мозъка. Други типични прояви включват пигментни нарушения по кожата,

лицеви ангиофиброми, бъбречни ангиомиолипоми и кисти, сърдечни рабдомиоми и други. Тежестта на изява на заболяването е изключително променлива в зависимост от тъканите, които са засегнати. Скалата варира от кожно засягане до тежки симптоми включващи епилепсия, поведенчески разстройства и умствено изоставане, както и множество бъбречни лезии водещи до тежка бъбречна недостатъчност [Roach *et al.*, 1998].

Синдромът на von Hippel-Lindau е пример за заболяване развиващо се в резултат на инактивиране на *VHL* гена, което причинява невъзможност за инхибиране на клетъчния растеж [Maher *et al.*, 1990]. При него се наблюдава развитие на множество тумори и кисти в различни органи на човешкото тяло, които могат да бъдат доброкачествени и/или злокачествени. *VHL* се характеризира с развитие на хемангиобластоми в мозъка, костния мозък и ретината, бъбречни кисти и бъбречен клетъчен карцином (хипернефрома), феохромоцитом и параганглиом, панкреатични кисти и панкреатични невроендокринни тумори, тумори на ендолимфатичния сак, цистаденоми на надсеменника [Maher *et al.*, 2011]. Честота на заболяването е 1:36 000. Инактивирането на *VHL* гена, както и фактът, че са необходими още допълнителни проучвания по отношение на биохимията на белтъка, го прави интересен за бъдещи структурни проучвания.

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

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ

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

ЗАДАЧИ

1. Въвеждане и оптимизиране на молекулно-генетичен подход за идентификация на патологични замени в гените *NF1*, *NF2*, *TSC2*, *TSC1* и *VHL*.
2. Приложение на разработения подход върху подбрана група пациенти с клинична диагноза:
 - Неврофиброматоза тип 1
 - Неврофиброматоза тип 2
 - Комплекс туберозна склероза
 - Синдром на von Hippel-Lindau
3. Сравняване на откритите генетични варианти в изследваните гени: *NF1*, *NF2*, *TSC2*, *TSC1* и *VHL* с публикуваните в световните бази данни.
4. Опит за установяване на генотип-фенотипни корелации с цел прогнозиране хода на развитие на заболяванията.
5. Обобщение на получените резултати и сравнение с литературни данни.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ

В рамките на настоящия дисертационен труд бяха проведени молекулно-генетични изследвания върху общо 146 лица. На база клинична диагноза, пациентите са обособени в групи, представени в Таблица 1:

Таблица 1. Брой изследвани лица в зависимост от разпределението им в четирите групи заболявания

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

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

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

БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ

За целите на молекулярно генетичните изследвания беше изолирана ДНК от левкоцити: от венозна или капилярна кръв и ДНК изолирана от биопсичен материал и хорионни вѐси.

МЕТОДИ

1. Преданалитична обработка на материала
 - Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв по солеви метод
 - Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна, капилярна кръв и от биопсичен материал и хорионни вѐси по фенол-хлороформен метод
2. Аналитична обработка на материала
 - Полимеразна верижна реакция (ПВР; Polymerase chain Reaction; PCR) на следните гени: *NF1*, *NF2*, *TSC2*, *TSC1* и *VHL*, 20 дълбоко интронни варианти в *NF1* ген, екзон 4 на *CCND1* ген.
 - Електрофореза в агарозен гел
 - Директно секвениране по Sanger с флуоресцентно белязани дидезокси нуклеотиди
 - Мултиплексна лигазно зависима амплификация (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification, MLPA).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

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

Неврофиброматоза

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

НЕВРОФИБРОМАТОЗА ТИП 1 (NF1)

Изследвана група пациенти

В рамките на настоящия труд бяха изследвани 35 пациента с клинична диагноза NF1 от общо 35 семейства. В анализираната група бяха открити общо 25 мутации в *NF1* гена, като 5 от тях са нови за световната литература: 4 в кодиращите участъци на *NF1* гена: две мутации засягащи сплайсинга, малка делеция на пет нуклеотида и дупликация на един нуклеотид, всички находки са описани в Таблица 2 (в червен цвят) и един вариант в не кодиращия участък на *NF1* гена представляващ дълбоко интронен вариант описан в Таблица 3 (Пациент 34) (в зелен цвят). По-голяма част от откритите мутации при изследваните български пациенти са добре известни и описани в световната литература, свързани с типичната клинична картина на NF1. Клиничните характеристики на 23-те генетично верифицирани случая с открити мутации в кодиращите последователности на *NF1* гена са представени в Таблица 2.

Таблица 2. Клинични и молекулно-генетични данни на пациентите с диагноза NF1, с открити мутации в кодиращите последователности на NF1 гена.

№	Клинични характеристики	Локализация	Тип замяна	Мутации в NF1 гена	Фамилност	Възраст/Пол
1	три/четири CALs	Екзон 5	frameshift (инсерция)	c.540insA, p.Leu180fs	De novo	3 м./ Ж
2	шест CALs >15mm/dm; множество лунички; 1 ПН; сколиоза; 2 Lisch нодула; изоставане в нервно-психичното развитие	Екзон 30	nonsense	c.4084C>T, p.Arg1362*	De novo	19 г./ М
3	множество CALs; Н на дясното рамо; две неврофиброми на врата и две на гърба	Интрон 35	Splice site	c.4725-1G>A #	Засегнат брат и майка (неналични)	33 г./ Ж
4	три CALs >2cm/dm, лунички; сколиоза	Екзон 18	nonsense	c.2041C>T, p.Arg681*	De novo	18 г./ Ж
5	множество CALs >5mm; 1 ПН; хипоплазия на малкото крило на сфеноидната кост в дясно (sphenoid wing dysplasia); атрофия на оптичен нерв; птоза	Екзон 29	nonsense	c.3916C>T, p.Arg1306*	Майка негативна, баща неналичен	13 г./ Ж
6	CALs	Екзон 50	nonsense	c.7348C>T, p.Arg2450*	Родители неналични, сестра носителка	29 г./ Ж
7	множество CALs; изоставане в нервно-психичното развитие; ГТКП	Екзон 13	missense	c.1466A>G, p.Tyr489Cys	неналични родители	3 г./ Ж
8	CALs; ПН на кръста; Lisch нодули; остеоартроза	Екзони 37-58	Герминативна делеция	Герминативна делеция на екзони 37-58	неналични родители; негативен фетус	26 г./ Ж
9	множество Ни в дясна тенарна област, 1-ви и 3-ти пръст на дясната ръка; следоперативни cicatricex на дясната ръка; ограничени движения на метакарпалните и интерфалангеалната става; хипестезия на 2ри и 3ти пръст на дясната ръка	Екзони 1-12	Соматична делеция	Соматична делеция на екзони 1-12		50 г./ Ж
10	множество CALs; Н на гърба (4 г.в.), през пубертета множество Ни; хамартоми в малък мозък (14 г.в.); две лезии в шийния, торакалния и лумбалния отдел на гръбначния стълб по хода на нервите (13 and 9mm) и подобна зона и в ляво (10mm), на ниво Tx7 и Tx9 лезии в ляво в паравертебралната мускулатура (15 and 11mm), множество лезии в лумбалната област и в илеопсоас (от 8 мм до 28 мм)	Екзон 14	frameshift (делеция)	c.1541_1542delAG, p.Gln514Argfs*43	Фамилен случай, но роднините не са налични	16г./ М
11	множество CALs на врата, раменете, гърба и корема, на бедрото 1 CAL; ГТКП ; глиоза в десния хипокампус	Екзон 16	frameshift (делеция)	c.1756_1759delACTA, p.Thr586Valfs*17	De novo	24 г./ Ж
12	множество CALs; ПН на дясната ръка; параганглиом; десен оптичен глиом	Екзон 38	missense Splicing ефект	c.5270T>A, p.Val1757Asp	2 дъщери носителки	41 г./ Ж
13	множество CALs; ГТКП (1 г. 2м.); мигрена	Екзон 8	frameshift (делеция)	c.823delATCTT, p.(Leu275Valfs*14) #	Негативна майка	17г./ Ж

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

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

Пациентите с диагноза NF1, които бяха негативни за мутации в *NF1* гена след секвениране по Sanger на всички 58 екзона на гена, бяха подложени на MLPA анализ за големи делеции и дупликации, който доведе до откриване на две големи делеции. Едната е герминативна делеция на екзони 37-58 в ДНК изолирана от венозна кръв. В същото семейство беше проведена и пренатална диагностика, която завърши с резултат за здрав фетус. Другата делеция е соматична на екзони 1-12 в ДНК изолирана от свежа биопсия от неврофибром. Тази соматична делеция на екзони от 1-ви до 12-ти отговаря на клинична картина описана при пациенти със сегментна неврофиброматоза (SNF1) [Ruggieri and Praticò, 2015], а в нашия случай клиниката включва наличие само на ПНИ, ограничени в един участък (сегмент) на тялото (Таблица 2, Пациент 9) (в син цвят). Случаят е интересен тъй като е единствен по рода си за България и е с генетично верифицирана SNF1 в хода на настоящия дисертационен труд.

При 12 от всички изследвани случаи след молекулно-генетичен анализ чрез секвениране по Sanger и MLPA анализ не бяха открити генетични изменения в *NF1* гена. При всички негативни случаи беше проведена следваща стъпка, включваща секвениране по Sanger на 20 дълбоко интронни варианти, намиращи се в некодиращите участъци на *NF1* гена [Svaasand *et al.*, 2015]. При двама от негативните пациенти бяха открити два различни дълбоко интронни варианти, които са описани в Таблица 3.

Таблица 3. Позитивни случаи за дълбоко интронни вариант в *NF1* гена.

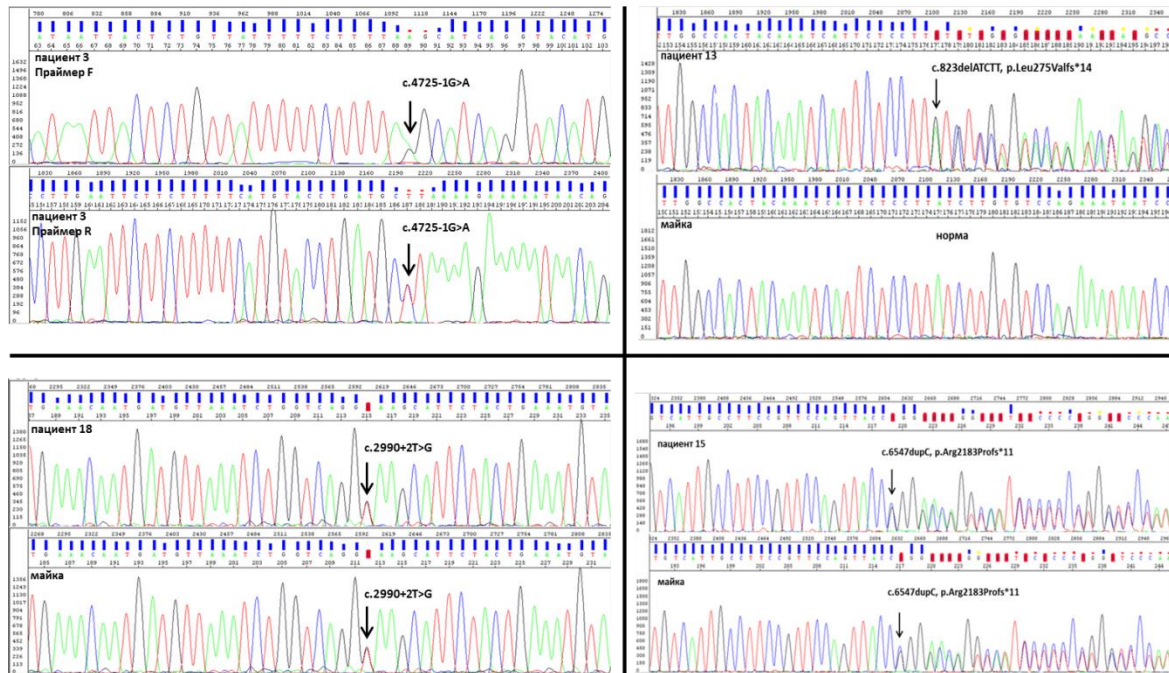
№	Диагноза	Клинични характеристики	Deep intronic варианти в <i>NF1</i> гена	Фамилност	Възраст/ Пол
30	NF1	CALs; сколиоза на дистална трета на лява тибия	c.5749+332A>G	De novo	3 г./ Ж
34	NF1	множество неврофиброми по цялото тяло, след 35 години броят им се увеличил, вероятен плексиформен неврофибром на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

Единият от вариантите c.889-948T>G (маркиран в зелено в Таблица 3) е небулкикуван в световната литература.

При един от негативните случаи за NF1, след като всички проведени генетични изследвания не доведоха до идентифициране на генетичен дефект и след преразглеждане на клиничната симптоматика, диагнозата беше ревизирана на TSC и беше генетично верифицирана с детектиран вариант в *TSC2* гена (виж по-долу). Това доказва важността на клиничните критерии за поставяне на диагноза NF1 и нуждата пациентите да покриват тези критерии. В този случай, който се оказа с диагноза TSC налице бяха само CALs.

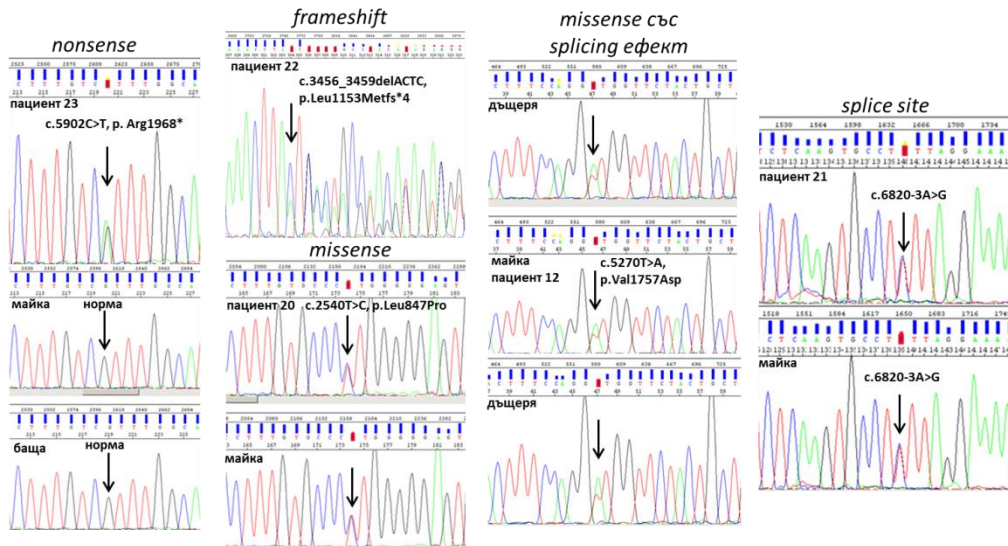
Резултати от молекулно-генетичен анализ

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



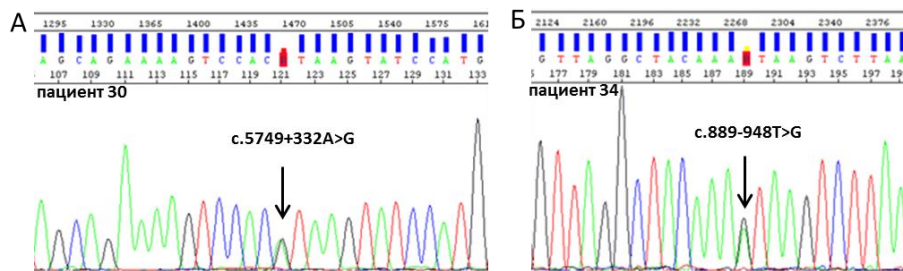
Фигура 1. Секвенционни профили на четирите непубликувани мутации в *NF1* гена.

На Фигура 2 са представени секвенционните профили на част от детектираните патологични варианти в *NF1* гена, като в зависимост от типа на мутацията те попадат в различни групи (Таблица 2). Всички са известни и описани в световната литература като патогенни [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=NF1%5Bgene%5D>].



Фигура 2. Секвенционни профили на различни типове мутации открити в *NF1* гена.

Резултатите на двамата пациенти с дълбоко интронни варианти са представени на Фигура 3.



Фигура 3. Секвенционни профили: А) вариант c.5749+332A>G; Б) нов, неописван вариант c.889-948T>G.

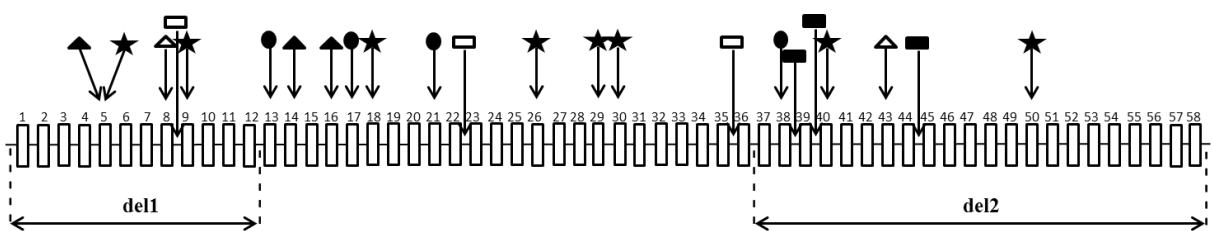
Дискусия

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

По литературни данни разпределението на мутации в *NF1* гена е както следва: 5-10% от случаите са големи делеции, а 85-90% са точкови мутации включващи *missense*, *nonsense*, *splice site* и *frameshift* мутации [Sabbagh *et. al*, 2013]. В изследваната прицелна група от български пациенти с диагноза NF1, освен промени в кожната пигментация, най-често CALs и наличие на неврофиброми, се откриват и случаи със засягане на костите, като развитие на сколиоза и костни деформации (*sphenoid wing dysplasia*), резултат от наличие на *nonsense* мутации, които водят до скъсен или липсващ белтък. При други пациенти се наблюдават неспецифични за клиничната картина на NF1 изяви, като генерализирани тонично-клонични пристъпи (ГТКП)(Таблица 2, Пациенти 11, 17) и тежка умствена изостаналост с аутизъм (Таблица 2, Пациент 20)

В сравнение с *missense* мутациите, тези които предизвикват промяна в рамката на четене или така наречените *frameshift* мутации, водещи до преждевременно прекратяване на белтъчния синтез се асоциират с по-тежка клиника и съответно с по-голям брой CALs, развитие на Lisch нодули, засягане на костите, развитие на неврофиброми в различни части на тялото, ГТКП, мозъчни лезии и др. (Таблица 2).

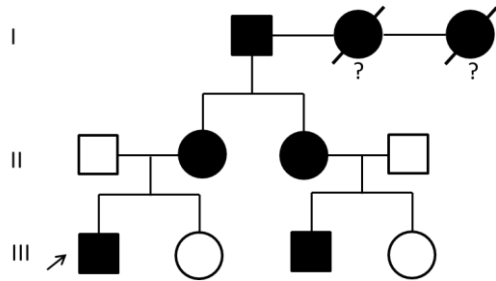
По-голямата част от откритите генетични варианти в *NF1* гена при изследваните български пациенти са *nonsense* (8/25 или 32%) и *frameshift* (6/25 или 24%), като повечето са концентрирани в началната част на *NF1* гена, в първата половина (до 30-ти екзон). На Фигура 4 е представено разпределение на откритите мутации в *NF1* гена при прицелната група пациенти.



Фигура 4. Графично представяне на откритите мутации в *NF1* гена. Запълнена звезда *nonsense* мутация, запълнен кръг *missense* мутация, запълнен триъгълник *frameshift* мутация, правоъгълник *splice site* мутация, празни символи нови, непубликувани до момента мутации. Хоризонталните линии показват двете големи делеции – del1 – соматична делеция на екзони 1-12; del2 – герминативна делеция на екзони 37-58.

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

[Sabbagh *et al.*, 2013]. Интерес представлява родословието на пациента с генетично верифицирана *splice site* мутация с.2990+2T>G (Таблица 2, Пациент 18). Родословно дърво е представено на Фигура 5.



Фигура 5. Родословие при пациент с мутация с.2990+2T>G.

Използвани са следните символи: квадрат - индивид от мъжки пол, кръг - индивид от женски пол, запълнен символ - засегнат индивид, незапълнен символ - здрав индивид, ? - неясен генотип, / - починал индивид. Индексният пациент е посочен със стрелка.

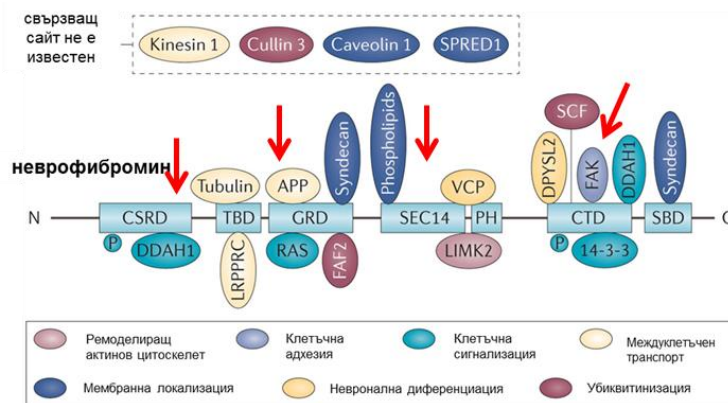
Тази мутация нарушаваща сплайсинга се свързва с изключително тежка клинична картина при прицелния пациент, включваща кожно засягане и засягане на ПНС и ЦНС, (Таблица 2, Пациент 18). На Фигура 6 са представени снимки на клиничните изяви при засегнатите роднини. В сравнение, майката и лелята на прицелния пациент са с тежко кожно засягане, с множество неврофиброми и ПНи, които се увеличават след бременност и с напредване на годините (засягане на ПНС), но без наличие на туморни формации в ЦНС, поради което може да се заключи, че в това родословие налице е тежка антисипация.



Фигура 6. Клинична картина наблюдавана при роднини на Пациент 18.

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

Четвъртата нова мутация представлява дупликация на един нуклеотид с.6547dupC, р.(Arg2183Profs*11) и е локализирана в CTD домена, който участва в свързването с друг белтък наречен фокална адхезионна киназа (focal adhesion kinase, ФАК) и вероятно засяга клетъчната адхезия, растеж, междуклетъчното сигнализиране и карциногенеза [Kweh *et al.*, 2009]. На Фигура 7 е представена схема на домените на белтъка неврофибромин, като на нея е отбелязано в кои от домените попадат четирите новооткрити мутации.



Фигура 7. Схематично представяне на домените на белтъка неврофибромин. С червени стрелки са показани домените, в които попадат четирите новооткрити мутации [Ratner *et al.*, 2015]

Обикновено мутациите причиняващи делеции на един или повече екзони от *NF1* гена са свързани с ранно начало, по-тежък фенотип и доживотен риск за злокачествена трансформация [Abramowicz and Gos 2014]. Откритата герминативна делеция на екзони 37-58 (Таблица 2, Пациент 8) засяга С-терминалния хеликазен домен на белтъка и е свързана с кожна пигментация, ПН на кръста и остеоартрит, сходна клинична картина на друга съобщавана в литературата при този тип мутации [Tronó-Marquí and Tajara, 2006]. След потвърждаване на поставената диагноза NF1 и откриване на патологичен генетичен дефект, пациентката беше генетично консултирана за пренатална диагностика при бъдещи бременности. Такава беше осъществена при установяване на бременност. В материал изолиран от хорионни вѐси на плода беше осъществен MLPA анализ на *NF1* гена за изясняване на носителския статус на фѐтуса по отношение на откритата делецията при неговата майка. Такава не беше намерена при плода.

Един от изследваните пациенти (Таблица 2, Пациент 9) беше с клинична картина, включваща множество неврофиброми, появяващи се на дясната ръка и датиращи от ранна възраст, които са били многократно отстранявани. Проведеният ДНК анализ във венозна кръв (секвениране по Sanger и MLPA анализ) не доведе до откриване на генетични изменения. На базата на локализиращия характер на

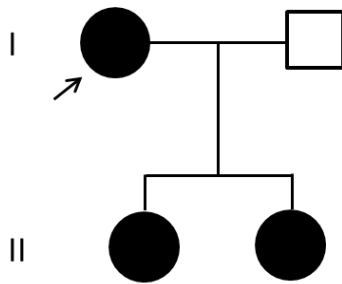
неврофибромите и негативния резултат от генетичното изследване във венозна кръв, се насочихме към диагноза SNF1. При този вид NF клиничната изява е локализирана само в един сегмент на тялото и се очаква наличие на соматична мутация, възникнала в областта на формиране на неврофиброма. В последствие беше проведен анализ върху ДНК изолирана от свежа биопсия от неврофиброма. Беше установена соматична делеция на екзони 1-12 от *NF1* гена. Мутацията беше проверена отново във венозна кръв и резултатът беше негативен, което потвърждава соматичния ѝ произход. Тази соматична мутация представлява *in-frame* делеция на екзони 1-12, локализирана преди CSRD домена. Същата делеция е съобщавана само веднъж в литературата от Laczmańska и сътр., но е открита в ДНК изолирана от венозна кръв, при 10 годишно момче, с лицев дисморфизъм и умствено изоставане, клинични характеристики не толкова типични за NF1 [Laczmańska *et al.*, 2014]. Доказаният от нас случай на SNF1 спада към случаите с клиничната категория "само неврофиброми", които представляват 52% от докладваните случаи [García-Romero *et al.*, 2016].

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

В прицелната група български пациенти бяха открити четири *missense* мутации, което представлява 16% (4/25). Първата от тях с.1466A>G, p.Tyr489Cys е открита при пациент, който покрива само един от критериите за NF, а именно наличие на CALs. Този тип мутации се свързват с относително лека клинична изява в сравнение с мутациите водещи до скъсен белтък [Sabbagh *et al.*, 2013], но при нашия пациент фенотипната изява включва и изоставане в нервно-психичното развитие и ГТКП, порядко срещани при NF1 (виж Таблица 2, Пациент 7). При останалите три *missense* мутации с.5270T>A, p.Val1757Asp, с.1885G>A, p.Gly629Arg и с.2540T>C, p.Leu847Pro се вижда, че клиниката на пациентите е свързана с тежка фенотипна изява, която покрива повече от един критерии необходим за поставяне на диагнозата (Таблица 2).

Възможно обяснение за вариант p.Val1757Asp може да е предполагаемият сплайсинг ефект на този вариант, тъй като замяната засяга втория нуклеотид на екзон 38 след акцепторното сплайс място и се очаква да оказва ефект върху сплайсинга [<http://www.ensembl.org>]. В това семейство, индексната пациентка (Пациент 12, Таблица 2) предава мутацията на двете си дъщери, които към момента на генетичното изследване са на възраст 15 и 14 години, съответно. По-голямата дъщеря има същата

клинична изява като майка си, докато по-малката за момента има само CALs. На Фигура 8 е представено родословно дърво на това семейство.



Фигура 8. Родословно дърво на семейство с мутация с.5270Т>А, р.Val1757Asp

Оценката на патогенния ефект на *missense* мутацията с.5270Т>А (р.Val1757Asp) е представена на Фигура 9, като е използван софтуер за математическа обработка (PolyPhen-2 (v2.2.2r398) prediction of functional effects of human nsSNPs). Изчисленият коефициент на патогенност за варианта с.5270Т>А е 1.000, което съответства на висока вероятност за патогенност (Фигура 9).



Фигура 9. Резултат от онлайн предиктор, който използва два различни модела за предсказване. [<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>]

Интересно е да се отбележи, че *missense* мутацията с.2540Т>С, р.Leu847Pro разположена в екзон 21 попада в CSRD домена, който е вторият по важност функционален домен след GAP домена. При този тип мутация аминокиселината левцин (Leu) е заменена с аминокиселината пролин (Pro), различаващи се по физико-химичните си характеристики, което не води до изместване рамката на четене, но вероятно променя структурата на белтъка и повлиява неговата функция. Единствено при този изследван пациент от прицелната група, фенотипната изява включва тежко умствено изоставане с аутизъм, както и това, че е един от пациентите с епилепсия и глиом на ляв оптичен нерв (Таблица 2, Пациент 20). CSRD е домен, който включва

свързващи места за цАМФ, което предполага възможната му роля в цАМФ сигнализация. По литературни данни в Швановите клетки при липса на NF1 може да се индуцира количеството на цАМФ, инхибирайки ГТФазен протеин участващ в клетъчната адхезия и синаптогенеза [Kim *et al.*, 2001]. Други проучвания показват, че инхибирането на цАМФ/ГТФазния път чрез Rho-RAC и абнормната организация на цитоскелета са в основата на неврокогнитивните проблеми при пациенти с NF1, което би обяснило фенотипната изява при Пациент 20 (Таблица 2) [Dasgupta *et al.*, 2003].

Общият брой генетично верифицирани случаи с клинична диагноза NF1 е 71% (25/35). Два от случаите се изясняват след секвениране по Sanger на 20-те дълбоко интронни варианти. При първия случай се наблюдава *de novo* възникнал дълбоко интронен, патогенен вариант с.5749+332A>G, с клинична изява включваща CALs и сколиоза на дистална трета на лява тибия (Пациент 33), публикуван в световната литература като патогенен [Svaasand *et al.*, 2015]. Във втория случай се открива нов, неописван в световната литература дълбоко интронен вариант означен като с.889-948T>G (маркиран в зелено в Таблица 3), който е в близост до един от 20-те публикувани варианти с.889-942G>T в интрон 8 на *NF1* гена. След анализ със софтуер за математическа обработка Human Splicing Finder (Version 3.0) най-близките места за възникване на ново splice site място са дадени в Таблица 4.

Таблица 4. Резултат от онлайн предиктор Human Splicing Finder (Version 3.0)

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

От таблицата се вижда, че откритият генетичен вариант създава ново splice site място с вероятност 68% и 64%. Предполага се, че при наблюдаваните проценти съществува голяма вероятност за фенотипна изява. За да се потвърди патогенният ефект на открития вариант е необходимо допълнително извършване на сегрегационен анализ в семейството и функционални изследвания. По данни на пациента случаят е фамилен със засягане в три поколения, но останалите засегнати роднини не са налични за генетичен анализ. Интересно е да се отбележи, че фенотипните изяви при тези два случая са съществено различни и в клиничен и във възрастов аспект (Таблица 3, Пациент 33 и 34).

Генотип-фенотипни корелации

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

Frameshift мутациите се откриват при пациенти на възраст между 3 месеца и 24 години и представляват 24% (6/25). При 3 от случаите мутациите са *de novo*. Мутацията в екзон 5 е открита при пациент на 3 месечна възраст с клиника включваща само CALs, докато тази в екзон 8 е доказана при пациент на 17 г.в., с тежка клинична изява, а мутацията в екзон 14 е намерена при пациент на 16 г.в. и е асоциирана с изключително тежка фенотипна изява (Таблица 2). Мутацията в екзон 16 от CSRD домена, както и тези в екзон 26 от TBD домена и екзон 43 от FAK домена са свързани с по-тежка клинична изява (Таблица 2). При Пациент 22 с мутация в 26 екзон от TBD домена, вероятната причина за тежката фенотипната изява е липсата на функционално място в TBD домена на белтъка, което нарушава свързването на тубулин и по този начин повлиява регулацията на Ras сигналния път и клетъчната организация, функция и растеж [Bollag *et al.*, 1993]. При този пациент още на 3 г.в., в момента на генетичното изследване, клиничната изява е изключително тежка, включваща билатерални оптични глиоми, туморна формация дясно темпорално и супратенториално, две лезии и задръжка в речта. Мутацията открита при него е *de novo* възникнала.

Missense мутациите се откриват при пациенти на възраст между 3 и 41 години и представляват 16% (4/25). Нито една от откритите мутации не е *de novo*. Мутацията с.1466A>G, р.Тур489Cys в екзон 13 е открита при пациент на 3 г.в. като в момента на извършване на генетичното изследване се покрива единствено клиничен критерии за CALs, вероятно поради ранната възраст на пациентката, като е възможно останалите характерни симптоми на заболяването да се развият в по-напреднала възраст или да бъдат открити след провеждане на ЯМР. Налице обаче са изоставане в нервно-психично развитите и ГТКП, поради което при този пациент би било подходящо извършване на образна диагностика, с цел проследяване на ЦНС. Мутациите в екзон 17 и 21 попадат в CSRD домена и са свързани с относително тежка фенотипна изява (Таблица 2, Пациенти 16 и 20). Откритата мутация в 38 екзон не е известно кой домен

засяга, но се вижда, че е свързана с тежка фенотипна изява и се предава от майка на дъщери (Таблица 2, Пациент 12). Три от петте пациенти с нервно-психично разстройство било то в по-лека или по-тежка форма, с или без аутизъм са с генетично верифицирани мутации от типа *missense* (Таблица 21, Пациенти 7, 16 и 20).

Splice site мутациите се откриват при пациенти на възраст между 2 и 35 години и представляват 12% (3/25). И трите детектирани мутации са свързани с тежка фенотипна изява предаваща се в поколенията. Новооткритата *splice site* мутация с.2990+2Т>G е фамилна, засягаща три поколения, като фенотипната изявата при прицелния пациент е с изключително ранно начало, още на 2 г.в. (Таблица 2, Пациент 18). Допълнително доказаните два случая след анализ на 20-те дълбоко интронни варианти допълнително увеличават процента на *splice site* мутациите, при което той става общо 20% (5/25) (Таблица 3, Пациент 30 и 34).

НЕВРОФИБРОМАТОЗА ТИП 2 (NF2)

Изследвана група пациенти

В рамките на настоящия труд бяха изследвани 6 неродствени пациента с клинична диагноза NF2 от 6 семейства. В анализираната група бяха открити 3 мутации в *NF2* гена, едната *in-frame* делеция открита за първи път от нашия екип и две добре известни в световната литература *nonsense* мутации, описвани като патогенни. Клиничните характеристики на 3-те генетично верифицирани случая с открити мутации в кодиращите последователности на *NF2* гена са представени в Таблица 5.

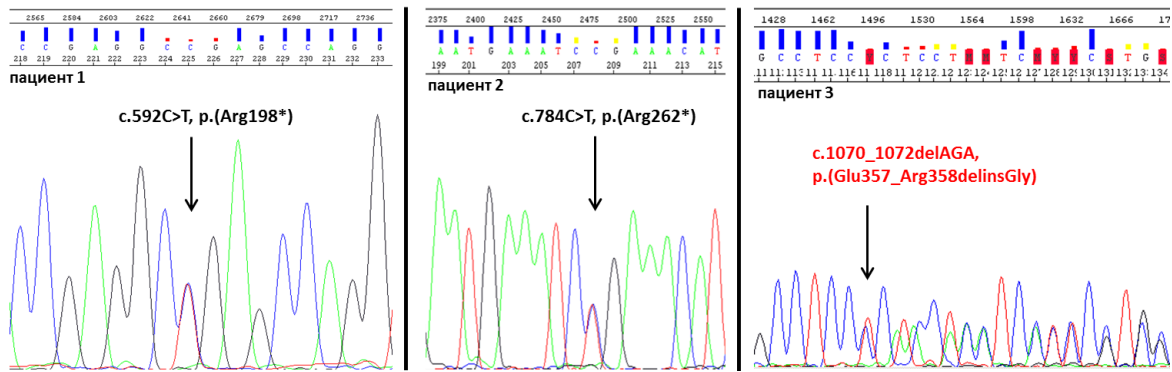
Таблица 5. Клинични и молекулно-генетични данни на пациентите с диагноза NF2, с открити мутации в кодиращите последователности на NF2 гена.

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

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

Резултати от молекулно-генетичния анализ

Мутацията c.1070_1072delAGA, p.(Glu357_Arg358delinsGly) е открита за първи път от нашия екип, докато другите две мутации c.592C>T, p.(Arg198*) и c.784C>T, p.(Arg262*) в *NF2* гена са откривани и от други изследователски групи и описвани като патологични в световната литература [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>]. Секвенционните профили на трите мутации в *NF2* гена са представени на Фигура 10.



Фигура 10. Секвенционни профили на трите мутации открити в *NF2* гена. Новооткритата мутация е отбелязана в червено.

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

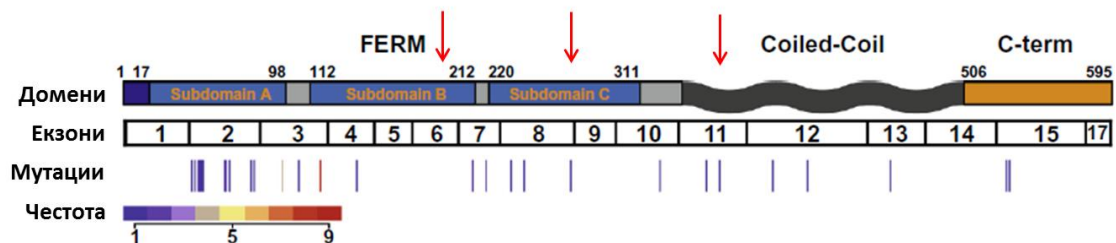
Третата мутация, която беше открита от нашия екип при Пациент 3 на 45 г.в. представлява *in-frame* делеция на три бази, която предизвиква загуба на аминокиселината аргинин (Arg) в позиция 358 като на нейно място се инсерира аминокиселината глицин (Gly). В този смисъл, тази *in-frame* делеция има ефект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

Дискусия

В прицелната група от 6 пациенти с предполагаема клинична диагноза NF2, при трима от тях бяха открити две *nonsense* и една *in-frame* делеция (Таблица 5). За *nonsense* мутациите се знае, че водят до продукцията на нестабилен мерлин [Evans, 2009]. Пациенти носещи мутации, които водят до нарушаване рамката на четене на генетичната информация и предизвикват преждевременно прекратяване на белтъчния

синтез, като *nonsense* или *frameshift*, обикновено се характеризират с ранна клинична изява, развитие на по-голям брой менингиоми и спинални тумори. Такава е и наблюдаваната фенотипна изява при Пациенти 1 и 2 (Таблица 5). Развититето на туморни формации преди 20 г.в., каквито се наблюдават при двамата пациенти с *nonsense* мутации, ги отнася към така наречения тежък тип (Wishart тип), при който заболяването е с ранна изява и множество тумори, повече от 3 [Ruggieri and Praticò, 2015]. Наличието на повече от един тип тумори при пациенти с NF2 се свързва с агресивна изява на заболяването [Slattery, 2015].

Известно е, че биохимичната функция на белтъка мерлин се регулира по 3 механизма – посттранслационна модификация, по локализация на белтъка и по взаимодействия с ефектори, разположени надолу в сигналната верига (downstream). Мерлин е съставен от глобуларен аминок-терминален FERM-домен и карбокси-терминална хидрофилна опашка, свързани посредством флексибилен coiled-coil сегмент. Този FERM-домен е структурен аналог на ERM протеините, тъй като съдържа ERM последователност. На Фигура 11 са представени домените на белтъка мерлин, като на нея е отбелязано домена и екзона в който попадат трите открити мутации.



Фигура 11. Графично представяне на откритите мутации (маркирани с червени стрелки) в трите домена на белтъка мерлин и честота на откриваните мутации по литературни данни в екзоните на *NF2* гена [Cooper and Giancotti, 2014].

Мутации във FERM-домена на мерлин се срещат по-често, докато мутациите в карбокси-терминалния край на мерлин значително намаляват по брой, а в хеликазния са още по-редки, което показва, че FERM-домена играе основна роля в туморната супресия [Cooper and Giancotti, 2014]. Известно е също, че FERM-домена е отговорен за инхибиторния ефект върху клетъчния растеж. Двете *nonsense* мутации попадат именно във FERM-домена на белтъка мерлин и са свързани с по-тежка фенотипна изява при засегнатите пациенти, докато *in-frame* мутацията при Пациент 3 е локализирана в α -хеликазния домен на мерлин, където попадат значително по-малък брой мутации [Baser *et al.*, 2005]. *Nonsense* мутациите и в двата случая водят до стоп кодони съответно в

позиции 198 и 262, което се свързва със синтез на скъсен или липсващ нестабилен белтък. Той се разпознава от системите за протеазомна деградация и се разгражда. Клетките дефицитни на мерлин биха били с нарушена функция на инхибиране на клетъчния растеж [Cooper and Giancotti, 2014].

Откритата от нашия екип *in-frame* мутация е локализирана в екзон 11 на *NF2* гена, който попада в α -хеликазния домен. Мутацията е делеция на три бази, която води до загуба на аминокиселината Arg в позиция 358, като на нейно място се inserира аминокиселината Gly. Тъй като аминокиселината Gly има по-проста структура (водороден атом) в сравнение с Arg (допълнителна базична група), тази драстична разлика в аминокиселинната композиция вероятно повлиява физикохимичните свойства на белтъка. Тъй като мутацията е локализирана в домен, който участва в свързването на N- и C-терминалните домени, бихме могли да спекулираме, че се повлиява конформацията на белтъка. Като фенотипна изява при изследвания пациент налице е типичната клиника за *NF2*, включваща БВШи (Таблица 5, Пациент 3).

Генотип-фенотипни корелации

Честотата на *NF2* е около 1:33/40 000 индивида, а в някои държави тя е още по-ниска. Това го прави много по-рядко в сравнение с *NF1* [Evans, 2009], което обеснява и малкия брой засегнати български пациенти, в резултат на което само три генетично верифицирани случая бяха докладвани от нашия екип. При 100% (3/3) от тези български случаи мутациите са *de novo* възникнали и не са унаследени от родителите. Известно от литературата е, че герминативни мутации възникват обикновено в първите 15 екзона на *NF2* гена и много по-рядко, почти никога в екзон 16 и 17. Най-често срещаните мутации са *nonsense* в CpG острови, което се наблюдава и при двата случая с *nonsense* мутации (2/3 или 67%), където заменена е именно азотната база цитозин (C – азотна база). Съществува и относително строга генотип-фенотипна корелация в зависимост от типа и позицията на *NF2* мутацията [Baser *et al.*, 2005; Hexter *et al.*, 2015]. Известно е, че тези мутации намиращи се в началните екзони на гена се свързват с по-тежка клинична изява, както се наблюдава и при Пациент 1 с мутация в екзон 6 и при Пациент 2 с мутация в екзон 8 на *NF2* гена (Таблица 5, Фигура 11) [Cooper and Giancotti, 2014]. В сравнение с тези два случая непубликуваната *in-frame* делеция в екзон 11 беше открита при Пациент на 45 г.в. с по-лека клинична изява включваща само БВШи (Пациент 3, Таблица 5).

КОМПЛЕКС ТУБЕРОЗНА СКЛЕРОЗА

Изследвана група пациенти

В рамките на настоящия труд бяха изследвани 21 пациенти с клинична диагноза TSC от общо 21 семейства. В анализираната група бяха открити общо 19 мутации: 11 в *TSC2* гена и 8 в *TSC1* гена. Четири от 11-те мутации в *TSC2* гена са нови за литературата и само две от 8-те в *TSC1* гена също са нови мутации. От общо 21 пациента в *TSC2* гена бяха открити общо 11 различни генетични варианти, представени в Таблица 6.

Таблица 6. Клинични и молекулно-генетични данни на пациентите с диагноза TSC, с открити мутации в кодиращите последователности на *TSC2* гена.

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

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

От всички 21 пациенти, 11 се изясняват на молекулно ниво след секвениране по Sanger и MPLA анализ на *TSC2* гена. Останалите 10 негативни пациента за *TSC2* са подложени на скрининг за мутации в *TSC1* гена. След секвениране по Sanger на *TSC1* гена бяха открити 8 различни генетични варианти, представени в Таблица 7.

Таблица 7. Клинични и молекулно-генетични данни на пациентите с диагноза TSC, с открити мутации в кодиращите последователности на *TSC1* гена.

№	Клинични характеристики	Локализация	Тип замяна	Мутации в <i>TSC1</i> гена	Фамилност	Възраст/ пол
12	ХПа; КД; субependимни нодули; терапевтично резистентна епилепсия – West синдром; интелектуален дефицит	Екзон 15	nonsense	c.1966G>T, p.(Gly656*)	Засегната майка (неналична)	5 г.в./ Ж
13	ХПа; множество субкортикални тубери; субependимни нодули с калцификация; терапевтично резистентна епилепсия; интелектуален дефицит с аутизъм	Екзон 5	nonsense	c.325C>T, p.Gln109*	Майка носителка	15 г.в./ М
14	ХПа; ЛАи; сърдечен рабдомиом; симптоматична епилепсия	Екзон 22	frameshift (делеция)	c.2698_2699delCA, p.(Gln900Glnfs*2)	Майка носителка	8 г.в./Ж
15	5 ХПа; ЛАи; субependимни нодули; кортикална дисплазия; ГТКП	Екзон 15	nonsense	c. 1525C>T, p.Arg509*	неналични родители	10 г.в./ М
16	ХПа; перивентрикуларни калцификати (КТ); West синдром; интелектуален дефицит	Екзон 15	nonsense	c. 1453G>T, p.Glu485*	Засегнати роднини (неналични)	7 г.в./ Ж
17	ХПа; субependимни нодули с калцификация; КД; епилепсия	Екзон 15	frameshift (делеция)	c.1888_1891delAAAAG, p.Lys630Glnfs*22	De novo	2 г.в./ Ж
18	ХПа; ЛАи; субependимни нодули с калцификация; радиална миграционна линия в бялото мозъчно вещество; ГТКП	Екзон 9	nonsense	c.772G>T, p.Glu258*	неналични родители	11 г.в./ Ж
19	румънски произход ХПа; ЛАи; IШП; IСAL; перивентрикуларни калцификати (КТ)	Екзон 6	frameshift (делеция)	c.433_434delCA, p.Gln145Valfs7*	Има дете с TSC: ХПа; ЛАи; ШП; множество тубери; перивентрикуларни и калцификати; АМЛи; фокална епилепсия (неналично)	36 г.в./ М

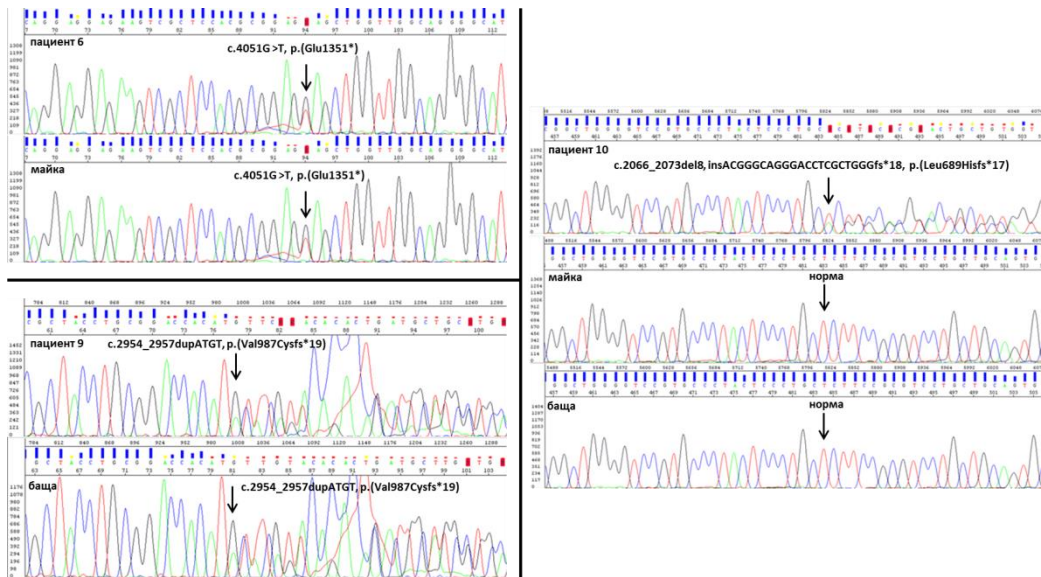
Легенда: ХП(а) – хипопигментно(и) петно(а); ЛА(и) – лицев(и) амгиофибром(и); УФ – унгален фибром; ШП – Шагренови петна; СЕГА – субependимален гигантоклетъчен астроцитом; КД – кортикална дисплазия (включва кортикални тубери и радиерно разположени миграционни линии в бяло мозъчно вещество); ФЕ – фокална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

В случаите, в които не се откриха мутации в двата гена се премина към трета стъпка – MLPA анализ за големи делеции и дупликации. След извършването на MLPA анализ беше открита делеция на 16 екзона (от 1-ви до 16-ти) в *TSC2* гена, която не е описвана в световната литература (Таблица 6, Пациент 11).

При двама от изследваните пациенти (10% или 6% от български произход) не бяха открити генетични изменения в двата гена, както и по-големи реанжировки, включващи делеции и дупликации.

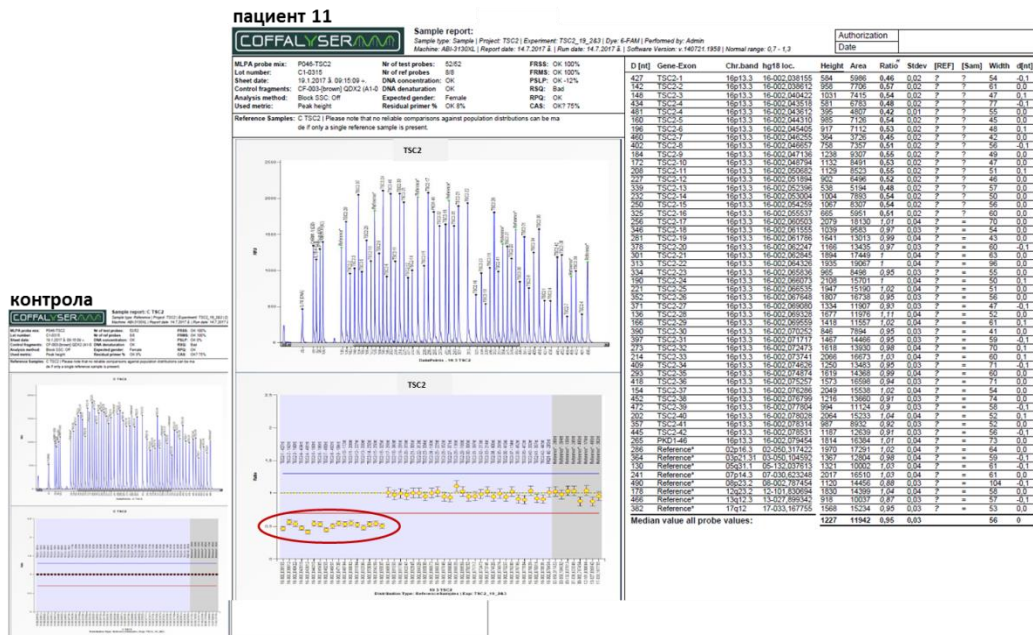
Резултати от молекулно-генетичен анализ

Мутациите c.4051G>T, p.(Glu1351*), c.2954_2957dupATGT, p.(Val987Cysfs*19), c.2066_2073del8, insACGGGCAGGGACCTCGCTGGGfs*18, p.(Leu689Hisfs*17) и делеция от 1 до 16 екзон открити в *TSC2* гена бяха докладвани за пръв път от нашия екип. Секвенционни профили на три от новооткритите мутации в *TSC2* гена са представени на Фигура 12.



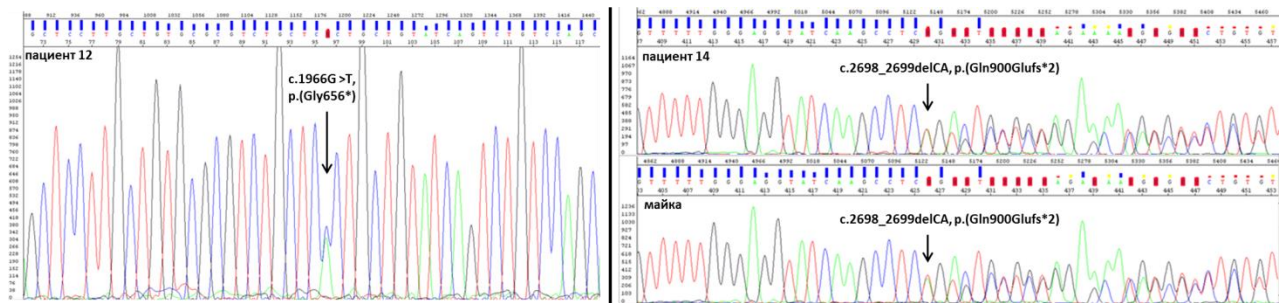
Фигура 12. Секвенционни профили на трите непубликувани мутации в *TSC2* гена.

Резултат на делеция на екзони от 1-ви до 16-ти, както и математически изчисления към тази мутация, в табличен вид са представени на Фигура 13.



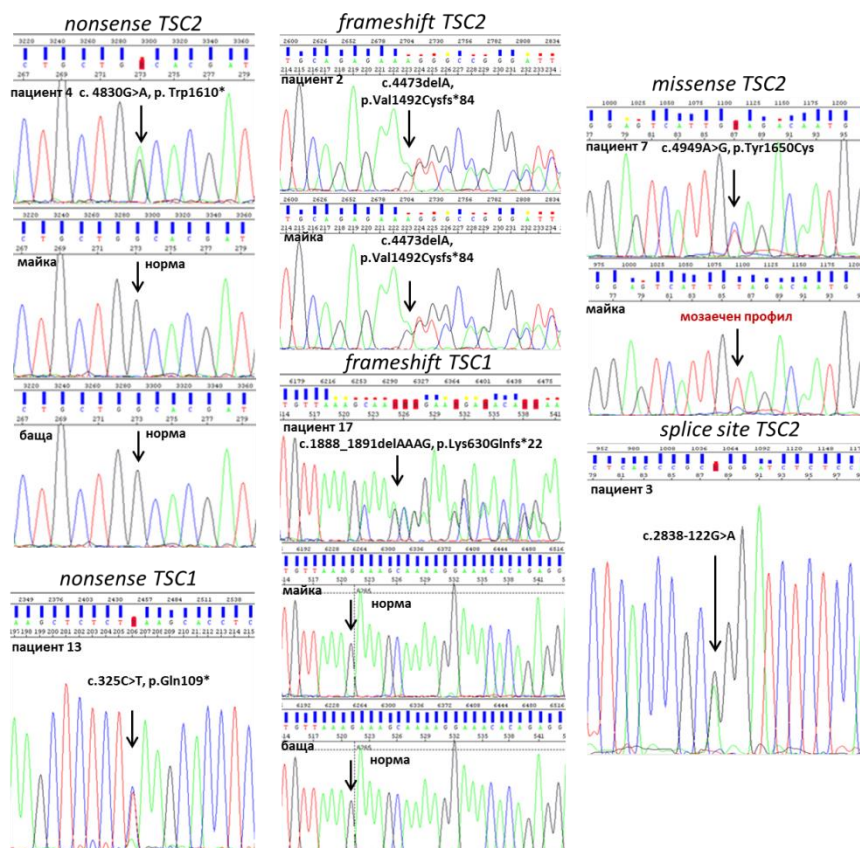
Фигура 13. MLPA профил на делеция del[1-16] в *TSC2* гена.

Двете мутации в *TSC1* гена c.1966G>T, p.(Gly656*) и c.2698_2699delCA, p.(Gln900Glnfs*2) бяха докладвани за пръв път от нашия екип. До момента няма данни в световната литература тези замени да са откривани от други изследователски групи. Секвенционните профили на новооткритите мутации в *TSC1* гена са представени на Фигура 14.



Фигура 14. Секвенционни профили на двете непубликувани мутации в *TSC1* гена.

На Фигура 15 са представени секвенционните профили на част от детектираните патологични варианти в двата гена. В зависимост от типа на мутацията те попадат в различни групи (Таблица 6 и 7). Всички тези генетични варианти са известни и описани в световната литература като патогенни [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>].



Фигура 15. Секвенционни профили на различни типове мутации открити в *TSC2* и *TSC1* гените.

Дискусия

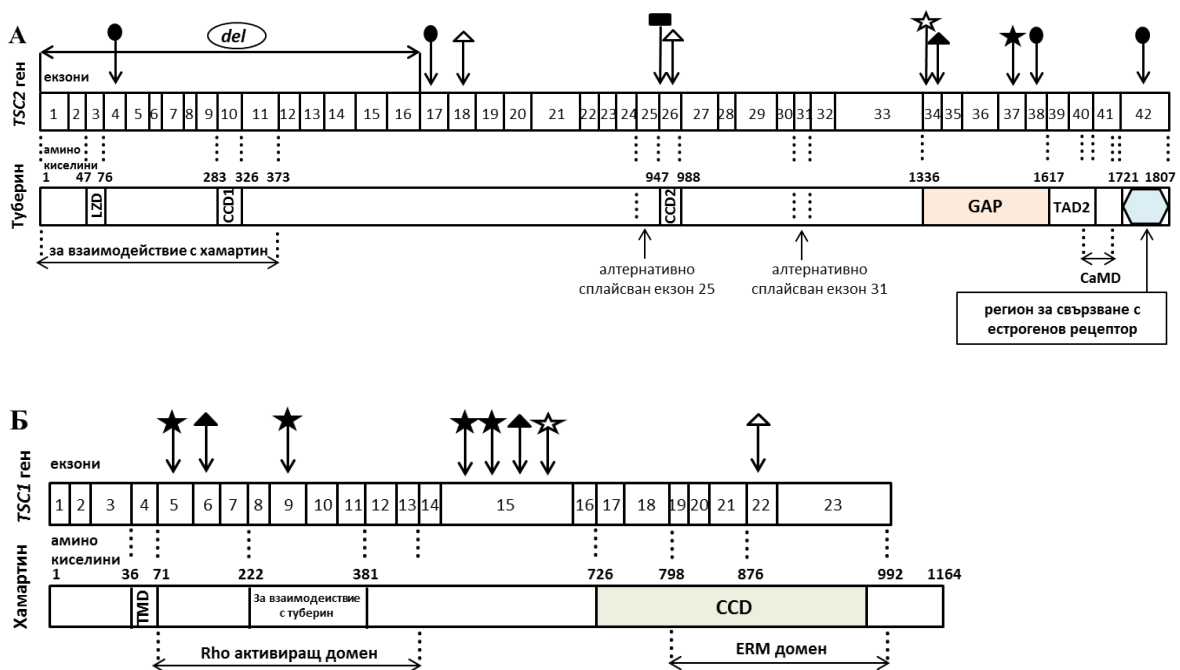
До момента са открити и описани повече от 1700 мутации в *TSC2* и *TSC1* гените [http://www.lovd.nl.]. Големи "геномни" реанжировки като големи делеции са много редки при *TSC1* гена и по-чести в *TSC2* гена, като възникват при около 6% от всички пациенти с TSC [Kozłowski *et al.*, 2007]. Мутациите в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

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

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

След провеждане на молекулно-генетичен анализ в прицелната група с TSC бяха генетично верифицирани 90% (19/21) или 94% (18/19) с български произход. Проучването представлява първото по рода си молекулно-генетично изследване на двата гена в България. Откритите варианти в *TSC2* гена в нашата група са *missense* (36% при 4/11), *frameshift* (27% при 3/11), *nonsense* (18% при 2/11) мутации, една *splice site* мутация (10%) и една голяма делеция (10%), докато повечето от мутациите в *TSC1* гена са *nonsense* мутации (63% при 5/8) (Таблица 6 и 7), както е съобщавано преди в

световната литература [Astrinidis and Henske, 2005]. Бяха открити и три *frameshift* мутации, една от които е при пациент от румънски произход, като общият процент е по-малък в сравнение с този на *nonsense* мутациите (38% при 3/8 или 29% при 2/7 с български произход) (Таблица 7). Мутациите в *TSC2* гена са разпръснати в екзоните на гена, като четири от тях – две *nonsense*, една *frameshift* и една *missense* бяха открити в GAP-домена на туберин (Фигура 16А), докато четири от мутациите в *TSC1* гена - три *nonsense* и една *frameshift* са локализирани в екзон 15, един от най-големите екзони в гена (Фигура 16Б). Разпределението на откритите мутации в двата гена е представено на Фигура 16А и 16Б.



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

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

TSC1-TSC2 комплексът функционира в няколко пътища за клетъчна сигнализация като път за регулация на растежа и транслацията (PI3K/PKB път), път за клетъчна адхезия/миграция/белтъчен транспорт (GSK3/FAK/Rho път) и път за клетъчен растеж и пролиферация (MAPK път). Установено е, че TSC1-TSC2 комплексът действа в сигнализацията преди mTORC1 (upstream). Той е критичен негативен регулатор на активацията на mTORC1 и при загуба на TSC тумор-супресорната функция води до абнормно увеличаване на mTORC1 медирана транслация, за която е описвано, че е отговорна за фенотипната изява корелираща със симптоматика от аутистичния спектър, като интелектуален дефицит и аутизъм. Такъв тип фенотипна изява се наблюдава при 7 от случаите с генетично верифицирана диагноза TSC (Таблица 6, 7; Пациенти 5, 7, 8, 10, 12, 13 и 16). Дефекти в регулацията на TSC1-TSC2 комплекса допринасят и за туморогенеза [Costa-Mattioli and Monteggia, 2013].

Герминативни мутации в *TSC2* и *TSC1* гените често причиняват съществени изменения в кодираните от тях протеини. Продуктът на *TSC2* гена, туберин, включва 7 домена (Фигура 16А). Четири от откритите мутации са локализирани в GAP-домена, (аминокиселинните остатъци от 1336 до 1617 на туберин), като всеки един от тези пациенти е с фенотипна изява включваща типичните клинични симптоми на TSC (Таблица 6, Фигура 16А, Пациенти 2, 5, 6 и 7). Единствено при Пациент 2 налице са само 2 ХПа и ФЕ, тъй като пациентката е само на 2 г.в., но се очаква прогресия в заболяването поради типа мутация, която е *frameshift* и поради нейната локализация, а именно GAP-домена.

Първата нова мутация в *TSC2* гена, открита от нашия екип е *nonsense* мутация с.4051G>T, p.(Glu1351*) при Пациент 6, който е единствен от нашата група с билатерални ретинални хамартоми (Таблица 6, Фигура 16А). Мутацията е унаследена от неговата майка, която клинично покрива критериите за TSC, като фенотипната изява при нея включва и бъбречен ангиомиолипом. От литературата е известно, че пациенти с мутации в GAP-домена на туберин имат ниска GAP активност и невъзможност за инхибиране на Rheb, причиняващи високи нива на mTORC1 сигнализация, което би обяснило тежката клиника в това семейство [Costa-Mattioli and Monteggia, 2013].

Втората нова мутация в *TSC2* гена е с.2954_2957dupATGT, p.(Val987Cysfs*19), открита при Пациент 13. Това е *frameshift* мутация локализирана в екзон 26, който попада в CCD2 домена (947-988 аминокиселинни остатъци) на туберин (Таблица 6, Фигура 16А). Мутацията е унаследена от бащата на пациентката, който също покрива клиничните критерии за TSC. Известно е, че при *frameshift* мутациите се очаква синтез

на скъсен или липсващ белтък, резултат от функционирането на път наречен nonsense-mediated mRNA decay (NMD), който селективно разгражда mRNAs, съдържащи преждевременно терминиращи кодони (ПТКи) [Hug *et al.*, 2016]. Тази генетична промяна най-вероятно води до неконтролируем клетъчен растеж и туморогенеза, които се наблюдават и във фенотипната изява на нашия пациент с множество субependимни нодули с калцификация (Таблица 6, Пациент 13).

Третата нова мутация в *TSC2* гена е c.2066_2073del8, insACGGGCAGGGACCTCGCTGGGfs*18, p.(Leu689Hisfs*17), открита в екзон 18 (Таблица 7, Пациент 10). Мутацията е *de novo*. За момента няма информация в литературата в кой домен попада екзон 18 на *TSC2* гена, но е очевидно, че такива сложни реанжировки като тази мутация представляващи *indel* - делеция на 8 бази и инсерция на 21 бази водят до преждевременно прекратяване на белтъчния синтез 18 аминокиселини след замяната и получаване на скъсен продукт, който вероятно се разгражда. Също така, мутации нарушаващи взаимодействието между туберин и хамартин намаляват GAP активността, което показва, че връзката между двата белтъка е от изключително значение за GAP активността на туберин и неговата туморна супресия [Astrinidis and Henske, 2005]. Фенотипната изява при този пациент е изключително тежка, включваща освен кожно засягане и засягане на ЦНС с развитие на СЕГА, субependимни нодули и субкортикални тубери, интелектуален дефицит и ГТКП (Таблица 6, Пациент 10).

Четвъртата нова мутация е голяма делеция на екзони от 1 до 16 на *TSC2* гена при Пациент 11 с изключително тежка клинична симптоматика (Таблица 6, Пациент 11). Първите екзони на туберин са важни за взаимодействието на туберин с хамартин (Фигура 16А). Мутацията е *de novo*. Добре известно в литературата е, че *de novo* мутациите в *TSC2* гена са открити в голям процент от пациентите с тежка клинична картина в сравнение с *de novo* мутациите в *TSC1* гена [Astrinidis and Henske, 2005].

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

При Пациент 12 беше открита нова *nonsense* мутация: c.1966G>T, p.(Gly656*) в екзон 15. *Nonsense* мутациите водят до синтез на скъсен белтък. Загубата на С-терминалната част на хамартин, където е локализиран ERM-доменът вероятно нарушава връзката на важни мембранни белтъци с цитоскелетни белтъци. Нарушаването на това взаимодействие предполага клетките да загубят способността си за адхезия към извънклетъчния матрикс, което да доведе до абнормна клетъчна

миграция и формиране на хамартомни формации както се наблюдава и при нашия Пациент 4, при който клиничната картина включва кортикална дисплазия и субependимни нодули (Таблица 7, Пациент 12) [Astrinidis *et al.*, 2002].

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

При 19 от изследваните пациенти (90% при 19/21 или 95% при 18/20 български пациенти) диагнозата TSC беше генетично верифицирана и само при двама от всички изследвани не беше намерен патологичен вариант в двата анализирани гени.

Генотип-фенотипни корелации

Най-често откриваният тип мутации в *TSC2* гена при български пациенти са *missense* замените, които представляват 36% от всички мутации в този ген. Този тип мутация се открива при пациенти на възраст от 1 година до 35 години с разнообразна фенотипна изява, покриваща клиничните критерии. Вторият тип най-чести мутации в *TSC2* гена в нашата група са *frameshift* мутациите, които представляват 27%. Този тип мутации се откриват при пациенти на възраст от 2 години до 16 години. Една от откритите мутации е *de novo* (Таблица 6, Пациент 10), докато другите две са унаследени в единия случай от майката на пациента, която има единствено 2 XPa (Таблица 6, Пациент 2), а в другия от бащата на пациента, който има XPa и LAи (Таблица 6, Пациент 9). *Nonsense* мутациите в *TSC2* гена се откриват при двама пациенти, единият на възраст 4 месеца, а другият на 15 години и представляват 18% от всички мутации в този ген. При пациента на 3 месечна възраст клиниката е изключително тежка, а мутацията е *de novo* (Таблица 6, Пациент 4). Втората *nonsense* мутация е открита за първи път от нашия екип и е унаследена от майката на пациента,

която е с бъбречно засягане (Таблица 6, Пациент 6). И двете мутации са локализиращи в GAP-домена на туберин, което би могло да обясни тежката фенотипна изява при тях.

Беше открита дълбоко-интронна, патогенна *splice site* мутация в *TSC2* гена представляваща 10% от всички открити мутации в гена. Клиниката на пациента датира от раждането му, а към момента на генетичното изследване той е на 43 г.в. (Таблица 6, Пациент 3). Беше открита една голяма делеция на екзони от 1-ви до 16-ти, при пациент на 15 г.в., която представлява 10% от всички открити мутации. Това е единственият пациент от прицелната група с фенотипна изява включваща бъбречни ангиомиолиптоми. Мутацията е *de novo*.

В *TSC1* гена 63% (5/8) или 71% (5/7 от български произход) от мутациите са *nonsense* мутации, които се откриват при пациенти на възраст от 5 години до 15 години. Три от тези 5 мутации са локализиращи в екзон 15, докато останалите две в Rho-активиращия домен. Останалите 35% (3/8) или 29% (2/7 от български произход) представляват *frameshift* мутации, открити при пациенти на възраст от 2 години до 36 години. Едната мутация при Пациент 17 е *de novo*, при който се наблюдава изключително тежка клиника за възрастта (2 г.в.) (Таблица 7, Пациент 17). При 88% (7/8) или 100% (7/7 от български произход) от пациентите с мутации в *TSC1* гена фенотипната изява включва епилепсия, докато интелектуален дефицит с или без аутизъм е налице при 38% (3/8) или 43% (3/7 от български произход) от изследваните пациенти.

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

При получените резултати е изключително трудно да бъдат направени генотип-фенотипни корелации, тъй като при всеки един от пациентите е налице тежка фенотипна изява, независимо от типа на откритата мутация и от локализацията ѝ. В литературата е съобщавано, че герминативните мутации не повлияват фенотипната изява, което се наблюдава и в нашата извадка от пациенти с TSC. Би било интересно в бъдеще да се проследи възможна корелация между типа мутация, нейната локализация и засегнат ген (*TSC2* или *TSC1*) и резултатите от провежданата терапия, включваща прилагането на mTOR инхибитори. Отново се наблюдава, че при част от родословията

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

СИНДРОМ НА VON HIPPEL-LINDAU

Изследвана група пациенти

В рамките на настоящия труд бяха изследвани 12 пациента с клинична диагноза VHL, като бяха открити 5 мутации във *VHL* гена. Една от тях е нова за световната литература, представляваща първото комплексно мутационно събитие (КМС) във *VHL* гена описано от нашия екип. Останалите четири мутации са добре известни и описани в световната литературата, свързани с типичната клинична картина на VHL. Клиничните характеристики на 5-те генетично верифицирани случая са представени в Таблица 8.

Таблица 8. Клинични и молекулно-генетични данни на пациентите с диагноза VHL, с открити мутации в кодиращите последователности на *VHL* гена.

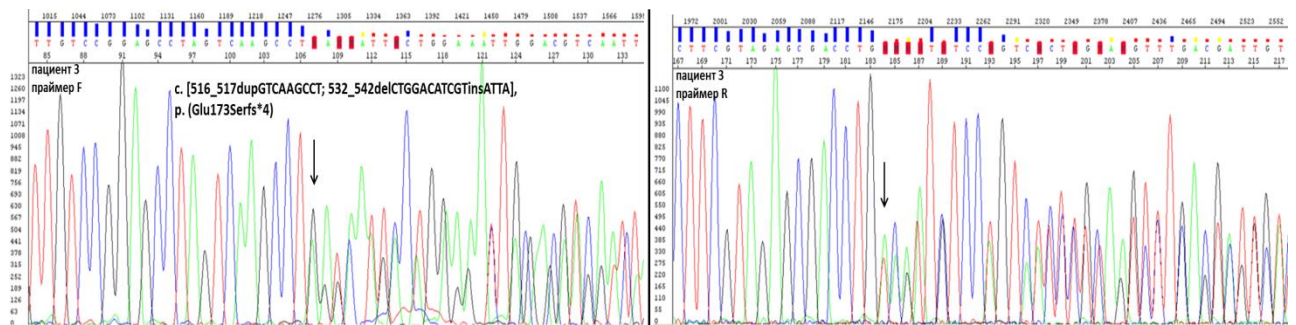
№	Клинични характеристики	Мутации във <i>VHL</i> гена / локализация	Фамилност/история на заболяването	VHL тип	Възраст/пол
1	рХБ + единичен ХБ на С6 прешлен	с.254_283del30, p.Leu85_Glu94del екзон 1	липсва фамилност; билатерални рХБ (оперирани), ХБ на С6 прешлен	1	14 г.в./ Ж
2	Фео + рХБ	с.500G>A, p.Arg167Gln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

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

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

Резултати от молекулно-генетичен анализ

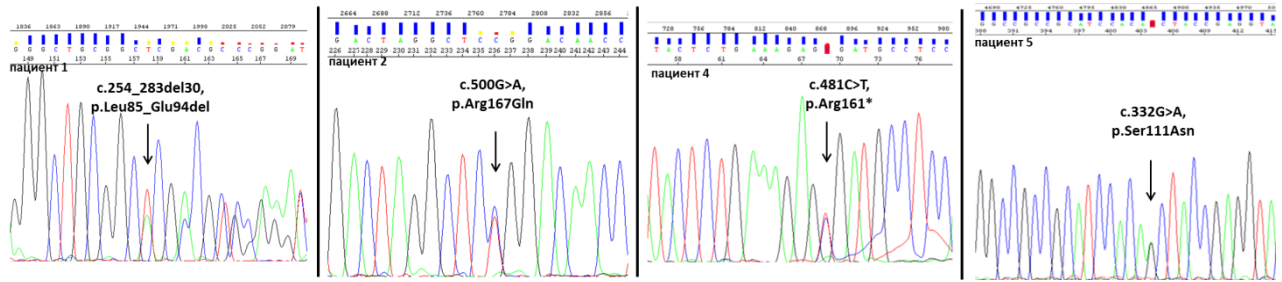
Мутацията с.[516_517dupGTCAAGCCT; 532_542delCTGGACATCGTinsATTA], р.(Glu173Serfs*4) открита във *VHL* гена е докладвана за първи път от нашия екип и представлява първото КМС в този ген (Таблица 8, Пациент 3). Секвенционен профил на КМС във *VHL* гена е представен на Фигура 17.



Фигура 17. Секвенционен профил на новооткритата мутация във *VHL* гена.

Откритото от нашия екип КМС комбинира дупликация и *indel*, и представлява мутация водеща до реанжировка на екзон 3 на *VHL* гена - с.[516_517dupGTCAAGCCT; 532_542delCTGGACATCGTinsATTA], р.(Glu173Serfs*4). Мутацията е открита при 27-годишна жена (Таблица 8, Пациент 3) с инфратенториален тумор, първоначално считан за епендимом или хемахиоперицитом след провеждане на ЯМР, но с типичните характеристики на цХБ. След операция на туморната формация, намираща се в малкия мозък предполагаемият цХБ е бил хистологично доказан. По данни на лекуващите лекари семейната история включва засегнат баща с цХБ и рХБ, но за съжаление семейството му никога не е било информирано, че неговото заболяване е *VHL* и че това е наследствено заболяване, при което поколението има 50% риск да бъде засегнато. Бащата не е достъпен за молекулно-генетично изследване тъй като е починал на ранна възраст. Индексният пациент се класифицира като *VHL* тип 1, с фенотипна изява включваща рХБ и цХБ, но с нисък риск за развитие на БКК, който се свързва с типа открита мутация, причиняваща делеция на целия или част от *VHL* гена [Maher *et al.*, 2011].

На Фигура 18 са представени секвенционните профили на останалите патологични варианти [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>].



Фигура 18. Секвенционни профили на четирите открити мутации във *VHL* гена известни в литературата.

Делецията на 30 базови двойки в екзон 1 c.254_283del30, p.Leu85_Glu94del беше открита при момиче на 14 г.в. с клинична картина включваща билатерални рХБ и единичен ХБ на С6 прешлен, което я причислява към *VHL* тип 1b (Таблица 8, Пациент 1). Missense мутацията p.Arg167Gln в екзон 3 беше открита при жена на 31 г.в. и нейната майка (Таблица 8, Пациент 2), и двете са развили Фео и рХБ, което ги причислява към *VHL* тип 2a. Стоп кодон мутацията c.481C>T, p.Arg161* (известна още като: c.694C>T, p.Arg232* по стара номенклатура), локализирана в екзон 3, беше открита при мъж на 46 г.в. (Таблица 8, Пациент 4), чиято фенотипна изява включва два БКК и два ЦХБ. Фамилната история е положителна, тъй като бащата на пациента е бил опериран от множество големи по размер цХБ, но не е наличен за извършване на генетично изследване. Братът на пациента също е бил опериран от множество цХБ и е починал от БКК. Племенникът на индексния пациент също е опериран от голям цХБ. Missense мутацията c.332G>A, p.Ser111Asn, локализирана в екзон 1 на *VHL* гена беше открита при жена на 60 г.в. (Таблица 8, Пациент 5). Клиничната картина включва цХБ, панкреатични и бъбречни кисти и БКК.

Полиморфизмът c.870A>G в екзон 4 на *CCND1* ген, по литературни данни се приема като модификатор на *VHL* заболяването: била е открита асоциация между G-алел и рискът за развитие на ренални ангиоми и цХБ при пациенти с *VHL* [Zatyka *et al.*, 2002b] [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/13755/>]. Всички наши пациенти с генетично верифицирана диагноза *VHL* бяха скринирани за този полиморфизъм в *CCND1* гена. Резултатите показват наличие на високо рисковия G-алел в хомозиготно (2-ма пациента) или в хетерозиготно състояние (3-ма пациента) при всички пациенти с генетично верифициран *VHL* (Таблица 9). Необходимо е обаче извършване на бъдещо асоциативно проучване върху по-голяма бройка засегнати пациенти и сравнение с контролна група. Резултатите от изследването на полиморфизма c.870A>G са представени в Таблица 9.

Таблица 9. Резултати от генетичен анализ на полиморфизма с.870А>G в екзон 4 на *CCND1* гена.

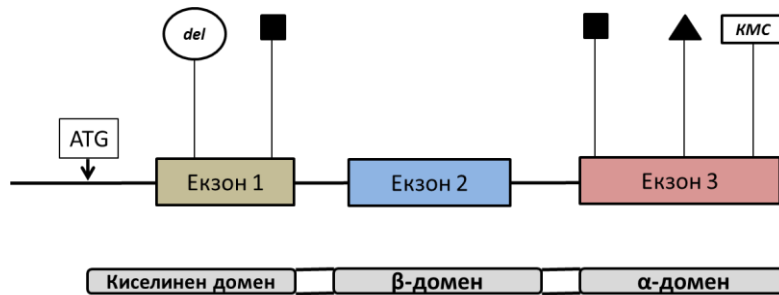
№	Клинични характеристики	Мутации във <i>VHL</i> гена	с.870А>G в <i>CCND1</i> ген
1	рХБ + единичен ХБ на С6 прешлен	c.254_283del30, p.Leu85_Glu94del	A/G
2	ФЕО + рХБ	c.500G>A, p.Arg167Gln	A/G
3	цХБ	c. [516_517dupGTCAAGCCT; 532_542delCTGGACATCGTinsATTA], p. (Glu173Serfs*4)	A/G
4	2 БКК + 2 цХБ	c.481C>T,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

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

Дискусия

Позовавайки се на световни бази данни установихме, че в световен мащаб са описани повече от 500 герминативни мутации във *VHL* гена [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>; <http://www.hgmd.org>]. Най-често срещаните мутации са *missense* замените (52%), следвани от *frameshift* мутациите (13%), *nonsense* замените (11%), докато делеции на целия ген се откриват в около 10%, *splice site* мутациите са 7% и най-редки са *in-frame* делеции/инсерции (6%). По отношение на разпределението на мутациите в екзоните на *VHL* гена, честотата на мутациите в екзон 1 е 43,2%, като екзон 1 попада в аминокиселинен терминален домен на белтъка, честотата в екзон 2 е 17%, който попада в β -домена и 39,8% е честотата на мутации в екзон 3, който попада в α -домена на белтъка [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010; Ong *et al.*, 2007]. До момента е съобщаван един случай на български пациент с генетично верифициран *VHL*, при който клиничната картина е изключително тежка включваща летален миокарден инфаркт поради наличие на билатерален Фео/интраадrenalен параганглиом. Първоначално пациентът е бил изследван за мутации в *SDHB*, *SDHD* и *RET* гените, но не са били открити такива, а в последствие е била открита мутация с.499C>T, p.Arg167Trp във *VHL* гена [Bachurska *et al.*, 2014].

В прицелната група от български пациенти две от детектираните мутации попадат в аминокиселинен терминален домен (Пациент 1 и 5), докато останалите три попадат в α -домена на белтъка. Разпределението на детектираните мутации е представено на Фигура 19.



Фигура 19. Разпределение на детектираните мутации в екзоните на *VHL* гена.

Легенда:

del (делеция с.254_283del30, p.Leu85_Glu94del)

■ с.500G>A, p.Arg167Gln

■ с.332G>A, p.Ser111Asn

▲ с.481C>T, p.Arg161*

КМС с.[516_517dupGTCAAGCCT;532_542delCTGGACATCGTinsATTA], p. (Glu173Serfs*4), първото КМС във *VHL* гена

Макар, че прицелната група е малка, резултатите от молекулно-генетичния анализ показват разпределение, според което три от детектираните мутации попадат в екзон 3, което го прави “hot spot” в нашата извадка от български пациенти (Таблица 8, Фигура 19).

Известно е, че в дивия тип белтък, фосфорилирането на киселинния домен е важно за тумор-супресорната функция на белтъка, докато α -хеликазният домен е важен за свързването на Елонгин В и С [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010]. Следователно, тези функции на белтъка най-вероятно са засегнати от мутациите, открити при нашите пациенти.

Missense замените във *VHL* гена са най-чести, около 50%. Като най-често засяган и описван като “hot spot” кодон е кодон 167, в който аминокиселината аргини (Arg) е заменена с глутамин (Gln), както се наблюдава при Пациент 2 от настоящото изследване. Съществува и друг вариант на замяна, при която Arg може да бъде заменена с триптофан (Trp). В проучване на Nordstrom и сътрудници, се установява, че при пациенти носещи *missense* замяна в този кодон съществува 63% риск за развитие на Фео [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010]. Мутацията с.500G>A (p.Arg167Gln) възниква в 35,3% от семействата с *VHL* тип 2 и при 9,5% от всички семейства с *VHL*. Като вероятно обяснение за високата мутационна честота в този кодон се предполага наличието на CpG острови в близките и заобикалящи кодона райони [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010]. Обикновено *missense* мутациите се асоциират с риск за развитие на Фео или *VHL* тип 2 [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010], както се наблюдава и при нашия Пациент 2, носител на мутацията с.500G>A, p.Arg167Gln, чиито фенотип включва Фео и рХБ. Идентична

фенотипна изява е наблюдавана в две поредни поколения на това семейство, което на базата на клиничната картина се причислява към VHL тип 2a (Таблица 8, Пациент 2).

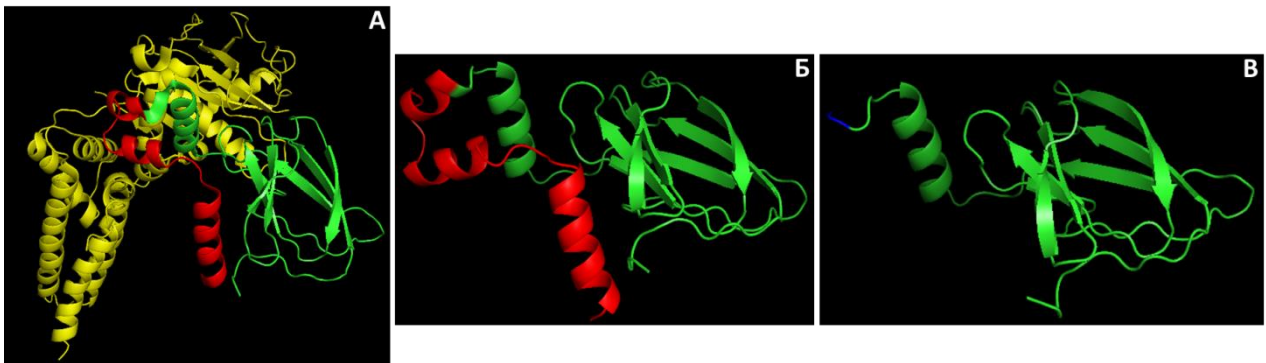
Втората *missense* мутация с.332G>A, p.Ser111Asn във *VHL* гена беше открита при Пациент 5 на 60 г.в., чиято клиника включва БКК и цХБ. Тази мутация е свързана с развитието на VHL тип 1, без наличие на Фео. Мутацията е добре известна и описвана в световната литература [Ruiz-Llorente *et al.*, 2004]. Ser111 попада в рамките на β -домена на pVHL и участва във формирането на убиквитиниращ комплекс [Maher *et al.*, 2011].

Мутациите водещи до преждевременно спиране на белтъчния синтез като *frameshift* и *nonsense* са свързани с развитие на VHL тип 1 [Zhang *et al.*, 2015]. Те са асоциирани с по-висок риск за развитието на цХБ в сравнение с *missense* мутациите [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010]. Герминативни мутации, водещи до скъсен pVHL се асоциират с 40% по-висок риск за развитие на БКК в сравнение с пациенти носещи герминативни *missense* мутации [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010]. При нашия Пациент 1 с делеция на 30 базови двойки в екзон 1 на *VHL* гена, фенотипната изява включва билатерални рХБ и единичен ХБ на С6 прешлен в ранна тинейджърска възраст, което го отнася към VHL тип 1. В допълнение, според типа на откритата мутация при този пациент предполагаме по-висок риск за развитие на допълнителни неоплазми с напредване на възрастта (Таблица 8, Пациент 1) [Lonser *et al.*, 2014].

Откритата *nonsense* мутация с.481C>T, p.Arg161* в екзон 3 на *VHL* гена, при Пациент 4 предполага загуба на функционален pVHL. Това би довело до високи нива на неразграден HIF, което ще увеличи транскрипционната активност на VEGF, PDGF и TGF- α и ще предизвика последващо развитие на микроваскуларни съдове и ускорен клетъчен растеж в ХБи, БКК и други тумори свързани с VHL [Shuin *et al.*, 2006]. Клиничната картина на Пациент 4 включва именно такива туморни образувания: два цХБ и два БКК. Според литературните данни се предполага, че мъжете имат по-висок риск за развитие на цХБ и по-тежка клинична картина, най-вероятно поради хормонално влияние върху развитието и растежа на този тип тумори [Lonser *et al.*, 2014], което е още едно обяснение за тежката клинична симптоматика при този пациент. По данни на лекуващия лекар, случаят е фамилен и в семейството има още засегнати членове от мъжки пол, което подкрепя гореизложената хипотеза. Членовете на семейството обаче са недостъпни, за да бъде извършено молекулно-генетично изследване и при тях.

Първото КМС във *VHL* гена беше съобщено в световната литература от нашия екип. Предполагаме, че КМС p.(Glu173Serfs*4) води до скъсен белтък. Мутацията е

локализирана в α -хеликазния домен на pVHL, включващ аминокиселинни остатъци от 155 до 192. Този домен е отговорен за свързването на Елонгин В и С [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010]. Като резултат от замяната на аминокиселината глутамин (Glu) в позиция 173 следва реанжировка на разположените след нея аминокиселини, при което се засягат именно местата за свързване на Елонгин В и С, причиняващо невъзможност за формиране на pVHL-ЕлонгинВ-С тумор-супресорен комплекс. Мутациите, които нарушават функцията на pVHL се очаква да са асоциирани със сериозен патогенен ефект поради загубата на α -домена, който е изключително важен за формиране и стабилизиране на 3D конформацията на белтъка в този комплекс. 3D белтъчна структура на нормален pVHL и мутантен pVHL в резултат на мутацията p.(Glu173Serfs*4) е представена на Фигура 20.



Фигура 20. 3D белтъчни структури:

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

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

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

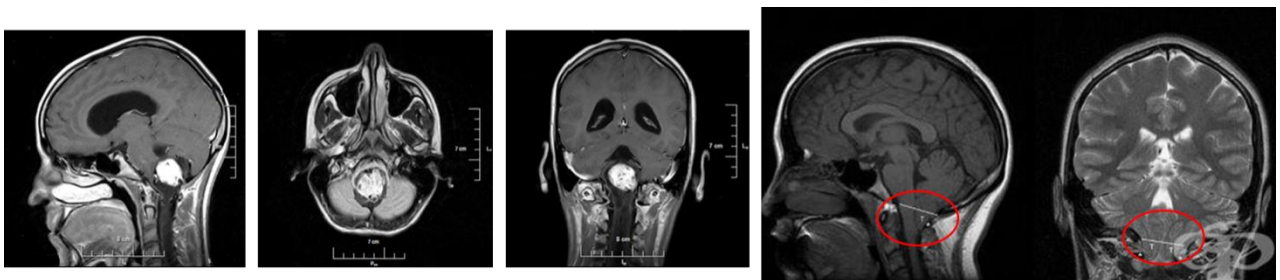
На генетично ниво КМС с.[516_517dupGTCAAGCCT; 532_542delCTGGACATCGTinsATTA] включва дупликация на 9 нуклеотида и *indel* 15 нуклеотида след нея (downstream), включваща делеция на 11 базови двойки и инсерция на 4 базови двойки. На Фигура 21 е представена схема на описаната реанжировка.



Фигура 21. Схематично представяне на новооткритото КМС във *VHL* гена.

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

Тази комплексна нуклеотидна реанжировка е интересна и от хромозомна гледна точка. Сравнихме региона, който е засегнат от КМС като използваме базата данни на Genome Browser и опцията „Blat“, където въведохме 20 базови двойки от региона на мутацията и получихме съвпадение от 100% с регион от хромозома 21 (21q21.1), използвайки за референтна геномна секвенция GRCh37/hg19 [<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>]. Идентичният регион включващ 20-те базови двойки се разполага между четвърти и пети екзон на *MIR99AHG* гена. Като възможен механизъм за възникване на това сложно мутационно събитие предполагахме протичането на кросингоувър между хромозоми 21 и хромозома 3, където е локализиран генът *VHL*. Както беше споменато по-горе *frameshift* мутациите, към които се причислява и откритото от нашия екип КМС при Пациент 3 предизвиква промяна в рамката на четене на генетичната информация и е асоциирано с тежка клинична симптоматика, включваща цХБ. Интересно е да се отбележи, че възрастта на поява на цХБ е около 29 години (± 10 години) [Maher *et al.*, 1990], докато при нашия Пациент 3 след провеждането на образна диагностика, когато се открива туморното образуване, пациентката е на 27 г.в., когато става ясно, че образуването е с изключително големи размери за тази възраст. На Фигура 22 е представен резултат от ЯМР на Пациент 3 (Таблица 8).



Фигура 22. Гадолинно-белязан Т1-засилен аксиален ЯМР при Пациент 3. Подчертан хиперинтензивен лобуларен тумор с микрокистозни компоненти, който се вижда в долната четвърта камера. Налице е перифокален едем в продълговатия мозък и в церебралния вермис.

Генотип-фенотипни корелации

В прицелната група от български пациенти бяха открити общо 5 различни генетични варианти, два от които са *missense* мутации, докато останалите 3 са от различен тип – една *nonsense*, една делеция на 30 нуклеотида и едно КМС, включващо делеция и *indel*. Малката бройка от изследвани и верифицирани случаи затруднява извършването на ясни генотип-фенотипни корелации. От литературата е известно, че мутациите водещи до преждевременно спиране на белтъчния синтез като *frameshift* и *nonsense* са свързани с развитие на VHL тип 1 [Zhang *et al.*, 2015]. Четири от петте генетично верифицирани случаи се отнасят към VHL тип 1 (без Фео) (Таблица 8), като детектираните мутации покриват пълния мутационен спектър включващ *missense* мутация, *nonsense* мутация, голяма делеция и КМС, нарушаващо рамката на четене на генетичната информация. По литературни данни е известно, че *frameshift* и *nonsense* мутациите са асоциирани с по-висок риск за развитие на цХБ в сравнение с *missense* мутациите [Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010]. При двама от нашите пациенти откриваме *missense* мутации, само единият от които обаче освен цХБ има и БКК (Таблица 8, Пациент 5), докато другият се отнася към VHL тип 2а, тъй като фенотипната изява включва рХБ и Фео (Таблица 8, Пациент 2). Герминативни мутации, водещи до скъсен рVHL се асоциират с 40% по-висок риск за развитие на БКК в сравнение с пациенти носещи герминативни *missense* мутации, което се наблюдава при нашия пациент с *nonsense* мутация. БКК обаче както стана ясно има и при единия от пациентите с *missense* мутация, жена на 60 г.в (Таблица 8, Пациент 5). Известно е, че БКК се развива на възраст около 44 години ($\pm 10,9$ години) [Maher *et al.*, 1990], както е и при двамата наши пациенти с БКК. Те към датата на генетичното изследване са били на възраст 46 и 60 години, респективно. Необходимо е увеличаване на групата генетично-верифицирани случаи, за да могат да бъдат интерпретирани по-детайлно генотип-фенотипните корелации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

При извършване на молекулно-генетичния анализ чрез секвениране по Sanger и MLPA анализ на *NF1* гена клинично поставената диагноза беше потвърдена при двадесет и пет от тридесет и пет изследвани семейства или общо при 71% от прицелната група. Пет от откритите 25 генетични варианти в *NF1* гена са нови за световната литература: две мутации засягащи сплайсинга, малка делеция на пет нуклеотида и дупликация на един нуклеотид. Петият нов вариант беше открит след провеждането на допълнителен анализ на 20 дълбоко интронни варианти в *NF1* гена. Идентифицирането на мутацията, причиняваща характерната фенотипната изява, позволява проследяване на дефекта в семейството, дори и пренатално, както беше направено в едно от засегнатите семейства. Като най-чести типове генетични дефекти в изследваната прицелна група се наблюдават *nonsense* мутациите (32%), след тях са *frameshift* мутациите (24%), следвани от *splice site* мутации (20%) и *missense* мутации (16%). Точковите мутации представляват 92% от генетично верифицираните български случаи, докато 8% от мутациите са големи делеции, което съответства на литературните данни за разпределение на мутациите в *NF1* гена. Генотип-фенотипните корелации при пациенти с *NF1* са трудни за интерпретиране, поради изключително комплексния фенотип на засегнатите пациенти, представляващ комбинация от много типични клинични характеристики, различна възраст на поява на различните симптоми и огромна генетична хетерогенност по отношение на патогенните мутации.

При извършване на молекулно-генетичен анализ чрез секвениране по Sanger и MLPA анализ на *NF2* гена клинично поставената диагноза беше потвърдена при трима от шест изследвани пациенти или общо 50%. За България това е първото по рода си проучване на това заболяване. Една от откритите мутации е нова за световната литература представляваща *in-frame* делеция локализирана в α -хеликазния домен на мерлин, мутации в които са изключително редки. Като най-чести типове генетични дефекти в изследваната група се наблюдават *nonsense* мутациите 67% (2/3), следвани от *in-frame* мутациите 33% (1/3). Съществува относително строга генотип-фенотипна корелация при клиничната изява на *NF2* в зависимост от типа и позицията на мутацията. Мутации, засягащи началните екзони на гена се свързват с по-тежка клинична изява. Също така най-често срещаните мутации са *nonsense* в CpG острови, което се вижда при два от нашите генетично верифицирани случаи, при които бяха детектирани *nonsense* мутации със заменена азотна база цитозин.

Настоящото проучване представлява и първата стъпка по посока на молекулно-генетично охарактеризиране на Комплекс туберозна склероза при български пациенти. При извършване на генетичен анализ чрез секвениране по Sanger и MLPA анализ първо на *TSC2* гена и след това на *TSC1* гена диагнозата беше потвърдена при 90% (19/21) или 94% (18/19 от български произход) от анализиранията прицелна група включваща общо 21 индексни пациенти (двама от румънски произход). Бяха открити общо 19 мутации: 11 в *TSC2* гена и 8 в *TSC1* гена. Четири от 11-те мутации в *TSC2* гена са нови, от които 2 са *nonsense*, 1 *frameshift* и 1 голяма делеция, а останалите 7 са известни и описвани в световната литература. Две от 8-те мутации в *TSC1* гена са нови мутации, от които 1 е *nonsense* и 1 е *frameshift*, останалите 6 са известни и описвани в световната литература. Детектираните варианти в *TSC2* гена в нашата група са *missense* (36% при 4/11), *frameshift* (27% при 3/11), *nonsense* (18% при 2/11) мутации, една *splice site* мутация (10%) и една голяма делеция (10%), докато повечето от мутациите в *TSC1* гена са *nonsense* мутации (63% при 5/8) и *frameshift* мутации, една от които е при пациент от румънски произход, като общият процент е по-малък в сравнение с този при *nonsense* мутациите (38% при 3/8 или 29% при 2/7 от български произход). Не беше направена ясна генотип-фенотипна корелация поради изключително хетерогенната клинична изява на това заболяване в изследваната прицелна група.

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

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

ИЗВОДИ

- Въведените молекулно-генетични подходи за идентификация на патологични варианти в *NF1*, *NF2*, *TSC2*, *TSC1* и *VHL* гените са подходящи за генетично верифициране на пациенти с Неврофиброматоза тип 1, тип 2, Комплекс туберозна склероза и синдром на von Hippel-Lindau тъй като доведоха до изясняване на:
 - 71% от пациентите в групата с Неврофиброматоза тип 1 (NF1)
 - 50% от пациентите в групата с Неврофиброматоза тип 2 (NF2)
 - 94% от пациентите в групата с Комплекс туберозна склероза (TSC)
 - 42% от пациентите в групата със синдром на von Hippel-Lindau (VHL)
 Тези данни предполагат много прецизно клинично подбрани пациентски групи.
- Изследваните български NF1, NF2, TSC и VHL групи се характеризират с уникални генетични характеристики, за което свидетелстват новооткритите мутации в петте анализирани гени:
 - *NF1* ген: 5 мутации, от които 2 засягащи сплайсинга; делеция на пет нуклеотида; дупликация на един нуклеотид и един дълбоко интронен вариант.
 - *NF2* ген: *in-frame* делеция
 - *TSC2* ген: 4 мутации, от които 2 *nonsense*, 1 *frameshift* и 1 голяма делеция
 - *TSC1* ген: 2 мутации, от които 1 *nonsense* и 1 *frameshift*
 - *VHL* ген: първото комплексно мутационно събитие (КМС) във *VHL* гена
- Най-честите генетични дефекти в NF1 прицелната група са: *nonsense* мутациите (32%), след тях са *frameshift* мутациите (24%), следвани от *splice site* мутациите (20%) и *missense* мутациите (16%). Точковите мутации представляват 92% от генетично верифицираните български случаи, докато 8% от мутациите са големи делеции, което съответства с литературните данни за разпределение на мутации в *NF1* гена.
- Най-честите генетични дефекти в NF2 прицелната група са: *nonsense* мутации (67%), следвани от *in-frame* мутации (33%).
- Най-честите генетични дефекти в TSC прицелната група, в *TSC2* гена са: *missense* мутации (36%), следвани от *frameshift* мутации (27%), *nonsense* мутации (18%), и порядко само в един случай *splice site* мутация (10%) и една голяма делеция (10%). За разлика от *TSC2*, повечето от детектираните варианти в *TSC1* гена са: *nonsense* мутации (63%), следвани от *frameshift* мутации, една от които е открита при пациент от румънски произход, като общият им процент е по-малък (38% или 29% при пациентите от български произход).
- В прицелната група от VHL пациенти бяха открити общо 5 различни генетични варианти: две *missense* мутации, докато останалите 3 са от различен тип – една *nonsense*, една 30 базова делеция и едно КМС, включващо делеция и *indel*.
- Генотип-фенотипните корелации при пациенти с NF1 са трудни за интерпретиране, поради изключително комплексния фенотип на засегнатите пациенти, различна възраст на поява на клиничните симптоми и огромна генетична хетерогенност по отношение на типа и локализацията на патогенните мутации. В част от родословията обаче се наблюдава тежка антисипация при предаването на една и съща мутация в поколението.
- Съществува относително строга генотип-фенотипна корелация при клиничната изява на NF2 в зависимост от типа и локализацията на мутацията по дължината на гена.
- В изследваната прицелна група с Комплекс туберозна склероза клиничната изява е изключително хетерогенна, което не даде възможност да се извлече ясна генотип-фенотипна корелация. Констатирана беше тежка антисипация в част от засегнатите семейства.
- Поради малкия брой изследвани пациенти със синдром на von Hippel-Lindau не бяха забелязани ясни генотип-фенотипни корелации.

БИБЛИОГРАФИЯ

Чуждоезична литература

1. Abramowicz A and Gos M. (2014) *Dev Period Med.* 18(3):297-306.
2. Astrinidis A and Henske EP. (2005) *Oncogene.* 24(50):7475-81.
3. Astrinidis A et al. (2002) *Oncogene.* 21:8470–8476.
4. Bachurska S et al. (2014) *Pol J Pathol.* 65 (1): 78-82.
5. Baser ME et al. (2005) *J Med Genet.* 42(7):540-6.
6. Bishop JM. (1995) *Genes and Development.* 9(11):1309-1315.
7. Bollag G, McCormick F and Clark R. (1993) *EMBO J.* 12(5):1923-7.
8. Chong-Kopera H et al. (2006) *J Biol Chem.* 281:8313-8316.
9. Cooper J and Giancotti FG. (2014) *588(16):2743-52.*
10. Costa-Mattiolli M and Monteggia LM. (2013) *16(11):1537-43.*
11. Dasgupta B et al. (2003) *J Neurosci.* 23(26):8949-54.
12. Dimitrova V et al. (2008) *Journal of IMAB - Annual Proceeding (Scientific Papers), vol. 14, book 1.*
13. Evans DG. (2009) *Orphanet J Rare Dis.* 19:4-16.
14. Ferner RE and Gutmann DH. (2013) *115:939-55.*
15. García-Romero MT et al. (2016) *Pediatr Dermatol.* 33(1): 9-17.
16. Henske EP et al. (1996) *Am J Hum Genet.* 59, pp. 400-406.
17. Hexter A et al. (2015) *J Med Genet* 52:699-705.
18. Hug N et al. (2016) *Nucleic Acids Res.* 44:1483-95.
19. Jülich K, Sahin M. (2014) *Pediatr Neurol.* 50(4):290-6.
20. Kim HA et al. (2001) *J Neurosci.* 21(4):1110-6.
21. Kozłowski P et al. (2007) *Hum Genet* 121:389-400.
22. Kweh F et al. (2009) *Mol Carcinog.* 48(11):1005-17.
23. Kwiatkowski DJ et al. (2010) *Wiley-Blackwell.* pp 29-31.
24. Laczmańska I et al. 2014. *Adv Clin Exp Med.* 23(4):517-21.
25. Latif F et al. (1993) *Science.* 260:1317-1320.
26. Lonser RR et al. (2014) *J Neurosurg.* 120(5):1055-62.
27. Maher ER et al. (1991) *J Med Genet.* 28(7):443-7.
28. Maher ER, Neumann HP, Richard S. (2011) *Eur J Hum Genet.* 19:617–23.
29. Maher ER, Neumann HP, Richard S. (2011) *Eur J Hum Genet.* 19:617–23.
30. Nellist M et al. (2001) *Hum Mol Genet.* 10:2889-2898.
31. Nordstrom-O'Brien M et al. (2010) *Hum Mutat.* 31(5):521-37.
32. Qin J et al. (2016) *J Biol Chem.* 291:8591-601.
33. Rouleau GA et al. (1993) *Nature* 363:515-21.
34. Ruggieri M and Praticò AD. (2015) *Semin Pediatr Neurol.* 22(4):207-33.
35. Ruiz-Llorente S et al. (2004) *Hum Mutat.* 23(2):160-9.
36. Sabbagh A, et al. (2013) *Hum Mutat.* 34(11):1510-8.
37. Sancak O et al. (2005) *Eur J Hum Genet.* 13(6):731-41.
38. Santiago Lima AJ et al. (2014) *PLoS One* 9. doi: 10.1371/journal.pone.0093940.
39. Slattery WH. (2015) *Otolaryngol Clin North Am.* 48(3):443-60.
40. Slegtenhorst M et al. (1997) *Science.* 277(5327):805-8.
41. Svaasand EK et al. (2015) *Hereditary Genet.* Doi: 10.4172/2161-1041.1000152.
42. Troffater JA et al. (1993) *Cell.* 75(4):826.
43. Trovó-Marqui AB and Tajara EH. (2006) *Clin Genet.* 70(1):1-13.
44. Vogelstein B and Kinzler KW. (1993) *Trends in Genetics.* 9(4):138-141.
45. Weinberg RA. (1996) *Scientific American.* 62-70.
46. Yohay KH. (2006) *Semin Pediatr Neurol.* 13(1):21–26.
47. Zatyka M et al. (2002b) *Cancer Res.* 62(13):3803-11.
48. Zhang J et al. (2015) *N Engl J Med.* 373(24):2336-2346.

Българска литература

1. Божинова В. (2015) Педиатрия. брой 1/2015, стр. 26-30.

Електронни източници

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

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

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

ОБЩ ИМПАКТ ФАКТОР: 3.295

• НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

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

ПРИНОСИ

Методични приноси:

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

Приложно-диагностични приноси:

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

Научни приноси към световните бази данни:

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

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