

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**

**КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ**

\*\*\*\*\*

# **АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертация за присъждане на научна степен

„ДОКТОР НА НАУКИТЕ“

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

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

**ДОЦ. АЛБЕНА ТОДОРОВА, ДБ**

**Научно жури:**

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

\*\*\*\*\*

**София, 2016**

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

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

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

**Публичната защита ще се състои на 03.02.2016 г.**

## ВЪВЕДЕНИЕ

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

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

Понастоящем класифицирането на заболяванията е сериозно предизвикателство, поради наличието на редица заболявания с близка, припокриваща се клинична картина, както и едно и също заболяване може да се прояви с широк спектър от клинични вариации (дори в рамките на едно семейство). Клиничните критерии (основни и допълнителни), на базата на които се цели максимално точно класифициране и субкласифициране на заболяванията, непрекъснато се променят и актуализират, позовавайки се на нарастващата информация и познания за заболяванията, произхождащи най-вече от задълбочени проучвания на молекулярно ниво. Постоянно се налагат промени в класификациите на заболяванията с цел да се отразят най-новите постижения по отношение на засегнатия ген или гени, на типа дефект, на типа

мутации, епигенетични) изменения и т.н. Изясняването на молекулните характеристики на дадено заболяване има значение не само аз адекватна диагностика и профилактика на пациента и неговото семейство, но и в ерата на геномиката придобива все по-голямо значение за генна терапия и индивидуализиран терапевтичен подход. Медицината днес се намира в преходен етап и от ерата на Хипократ, основана на наблюдение на клиничните симптоми, преминава в геномната ера, превръщайки се в молекулна медицина.

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

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

## **1. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

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

**Изследвани гени:** DMD, CAPN3, LMNA, FMR1, MECР2, FOXG1, CDKL5, PCDH19, SCN1A.

### **ЗАДАЧИ:**

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

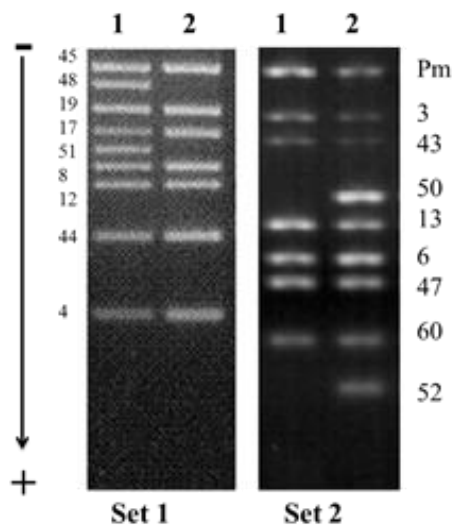
## 2. РЕЗУЛТАТИ

### 2.1. НЕВРОМУСКУЛНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

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

##### Делеции в DMD гена

Благодарение на високата честота на делециите (~65%) и преимущественото им разположение в делеционни горещи точки по дължината на гена, диагностичните лаборатории в цял свят разполагахме с праймери за 18 екзона, които се анализираха в две мултиплексни реакции от по девет екзона, съгласно оригиналните протоколи на Chamberlain et al., [1989] и Beggs et al., [1990]. Съчетаното използване на двата набора от праймери, позволяваше откриване на 98% от делециите при индексните пациенти. При момчета, липсата на PCR продукт за даден екзон показва, че този екзон(и) липсва(т) в генома на пациента (Фигура 1). За да се постигне добро разделяне на 9 PCR фрагмента в една реакция и да може да се даде категоричен диагностичен резултат, разделянето се извършваше чрез 3% NuSieve агарозна електрофореза, след продължителна 4-5 часова битка за стапяне на агарозата и приготвяне на този висок процент гел (Фигура 1). Същата методика се използваше и за целите на пренаталната диагностика в засегнатите семейства, при установяване на фетус от мъжки пол.



**Фигура 1.** Агарозна гел електрофореза на мултиплексен PCR; Set 1 Chamberlain; Set 2 Beggs.

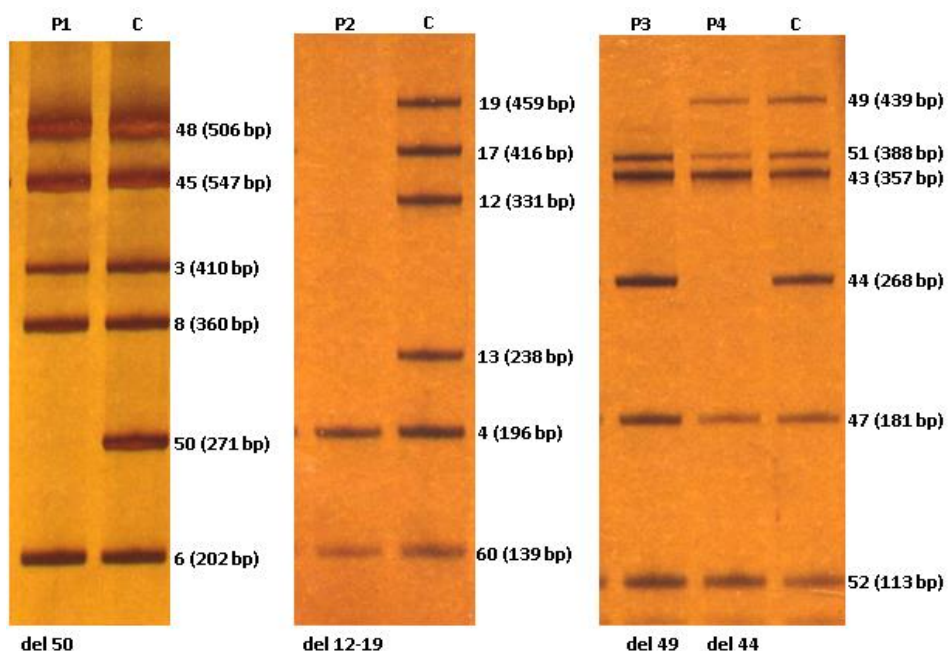
Set 1 проба 2 – делеция на екзони 48-51;

Set 2 проба 1 – делеция на екзони 50-52.

В последствие, тази трудоемка методика, водеща до редица проблемни при интерпретиране на резултатите беше модифицирана в колаборация с екипа на проф. Gian-Antonio Danieli, University of Padua, Italy. Изследваните 18 екзона, бяха разделени в 3 реакции по 6 екзона (вместо 2 по 9 екзона), като разделянето се извършваше посредством акриламидна вертикална електрофореза и фрагментите се отчитаха след оцветяване със сребърен нитрат (Фигура 2) [Todorova et al., 1996]. По този начин интерпретацията на получените резултати беше недвусмислена и категорична.

С помощта на мултиплексна амплификация на 18 екзона от *DMD* гена успяхме да изясним около 65-68% от случаите с ДМД/БМД. Откритите делеции при български пациенти

са съобщавани многократно в литературата [Bronzova et al., 1994; Todorova et al., 1996; Todorova, 1999, дисертационен труд].



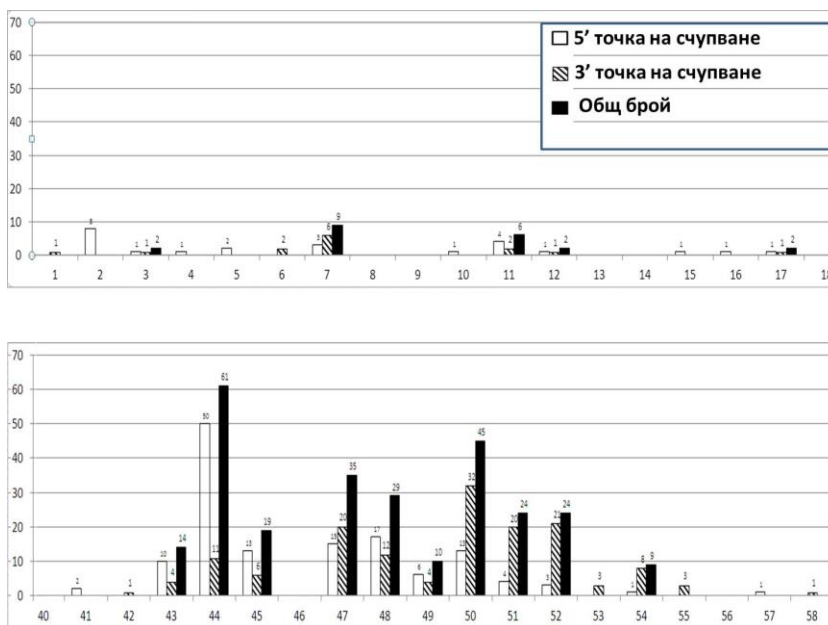
**Фигура 2.** Мултиплексен PCR в акриламидна електрофореза, оцветяване със сребърен нитрат. P1-4 – пациент, C – контрола; P1 – делеция на екзон 50; P2 – делеция на екзони 12-19; P3 – делеция на екзон 49; P4 – делеция на екзон 44. Амплифицираните екзони и техният размер в базови двойки (bp) са представени в дясно. Делетираните екзони са показани отдолу. Екзони 45 и 48 в акриламиден гел не мигрират по размер, а по конформация.

От научна гледна точка търсенията ни бяха фокусирани върху разпределение на делеционните точки на разкъсване по дължината на *DMD* гена [Danieli et al., 1993]. Резултатите показаха, че има популационни разлики, като най-богат на точки на разкъсване се явяваше интрон 44 от *DMD* гена, наречен „класическа“ гореща точка [Danieli et al., 1993]. Изследването при български пациенти отново показва уникални генетични характеристики за нашата популация. При изследването на сравнително малка група български пациенти по онова време (84 пациента) най-богат на точки на разкъсване се оказа интрон 50 (16%), а в региона 45-51 интрон бяха позиционирани повече от 54% от делеционните граници [Todorova et al., 1996]. Към 2015 година броят на изследваните ДМД/БМД пациенти е 260, от които 147 (73%) ДМД; 57 (22%) БМД и 13 (5%) с междинен фенотип. Цялата група пациенти е скринирана за делеции по дължината на *DMD* гена. Откритите делеции са 174 ( $174/260=67\%$ ). Този процент отговаря на очаквания по литературни данни.

При 153 от откритите делеции беше възможно да се оцени ефекта на делецията върху рамката на четене на генетичната информация и в 102 от случаите ( $102/153=67\%$ ) делецията нарушава рамката на четене (out-of-frame), докато в останалите 51 случая ( $51/153=33\%$ ) рамката на четене се запазва (in-frame). При 18 пациента с ДМД фенотип делецията е in-frame и при 6 пациента с БМД фенотип делецията е frameshift. Това са около 16%, които

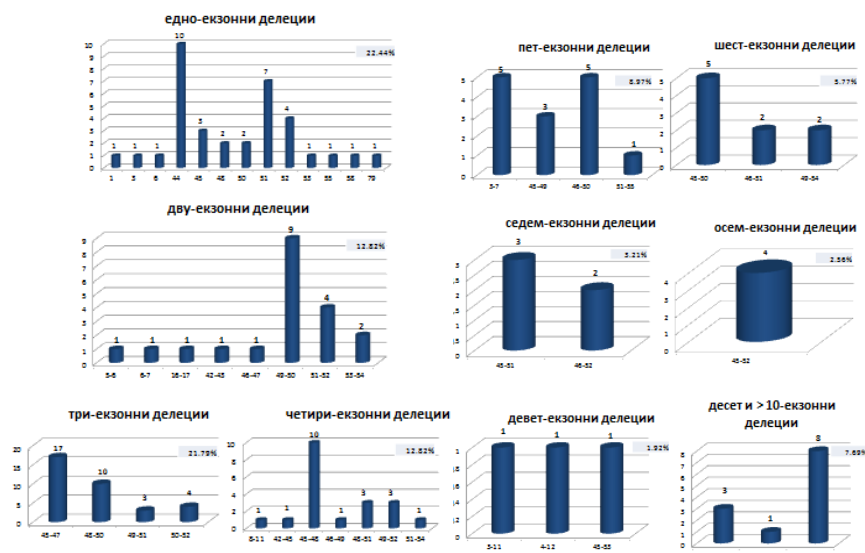
противоречат на хипотезата на Мопасо и сътр. [1988] за връзка между нарушена рамка на четене на генетичната информация и тежестта на клинична изява на заболяването.

Прецизно бяха позиционирани по интрони 321 делеционни точки на разкъсване (deletion breakpoints). Разпределението им по интрони е представено схематично на Фигура 3. Най-голям брой точки на разкъсване 19% попадат в 44 интрон (61/321), следван от 50 интрон 14% (45/321), който остава като специфична характеристика на делециите при български ДМД/БМД пациенти (виж Фигура 3). В региона 40-ти-55-ти интрон бяха позиционирани 87% от делеционните граници (Фигура 3).



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

По отношение на броя делетиранни екзони най-чести са делециите на един и три екзона, следвани от делеции на два и четири екзона (Фигура 4). Големи делеции на 6 и повече екзона са сравнително рядко срещани (Фигура 4).

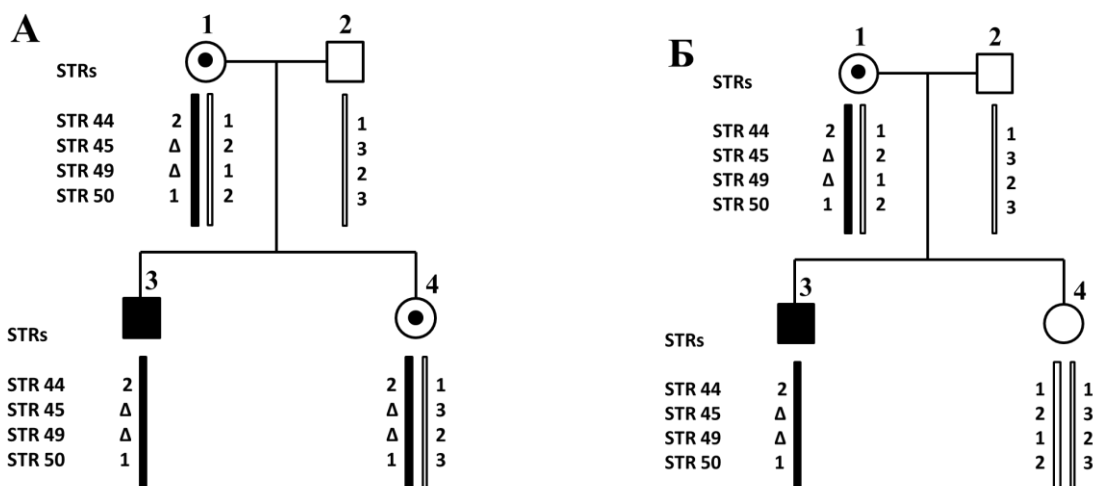


**Фигура 4.** Големина на делециите в *DMD* гена при български пациенти. Делетираните екзони са представени с цифри под всеки бар. Броят пациенти, носещи една и съща делеция е представен над всеки бар. Честотата на всяка група делеции е представена в проценти в горния десен ъгъл.

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

За изясняване на носителския статус на жените от рисковите фамилии, както и за целите на пренаталната диагностика, прилагаме индиректен анализ за проследяване унаследяването на засегнатия ген във фамилията. В индиректния анализ на семействата с ДМД/БМД се използва главно полиморфни (CA)<sub>n</sub> динуклеотидни повтори, които бяха добре охарактеризирани като брой алели, честота и процент хетерозиготност за българската популация [Bronzova, Todorova et al., 1995]. Поради това, тези маркери продължават да се използват и днес, но само като потвърдителен тест в диагностиката на ДМД/БМД, както и за целите на популационната генетика и тестове за идентификация на индивида.

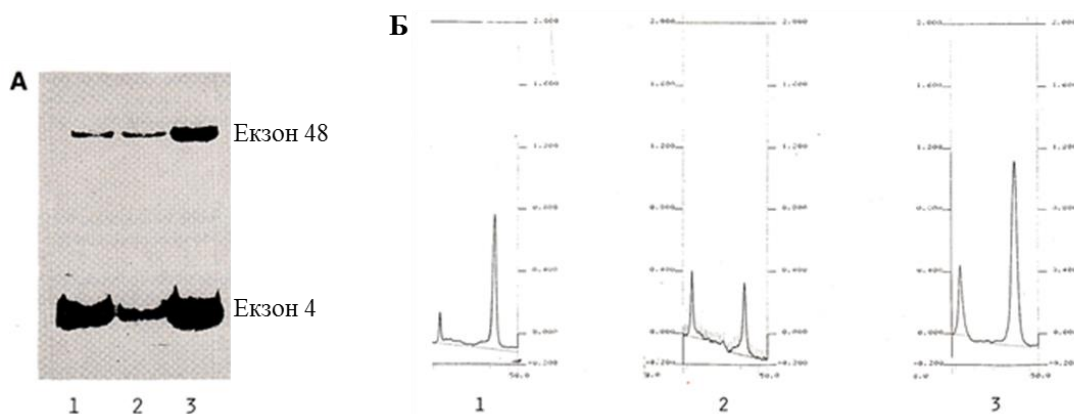
Определянето на носителство на засегнатия ген при жените от ДМД семействата винаги е било сериозно предизвикателство в технологично отношение, поради маскиращия ефект на незасегнатия ген от другата X хромозома. Дълги години определянето на носителство се базираше на индиректно проследяване на засегнатата X хромозома в поколенията. В някои случаи, ако пациентът е с делеция в *DMD* гена и разполагаме с полиморфни маркери в района на делецията е възможно да се установи загуба на родителски алел в хода на индиректния анализ (Фигура 5А). В случай, че майчиният здрав алел присъства в генотипа на дъщерята, тогава директно се доказва неносителство на *DMD* делеция (Фигура 5Б). Възможно е генотипът на майката да покаже наличие на два алела (хетерозиготен профил) в района на делецията, което показва че майката е неносител на делецията в лимфоцитарната си ДНК. Най-вероятно в този случай се касае за нововъзникнал дефект, каквито са ~30% от случаите, но това не е основание за непровеждане на пренатална диагностика при следващи бременности, поради риск от герминативен мозаицизъм 14%-18% [Bakker et al., 1989]. С описаните примери става ясно, че в някои случаи индиректният анализ може директно да изясни носителския статус при рисковите жени.



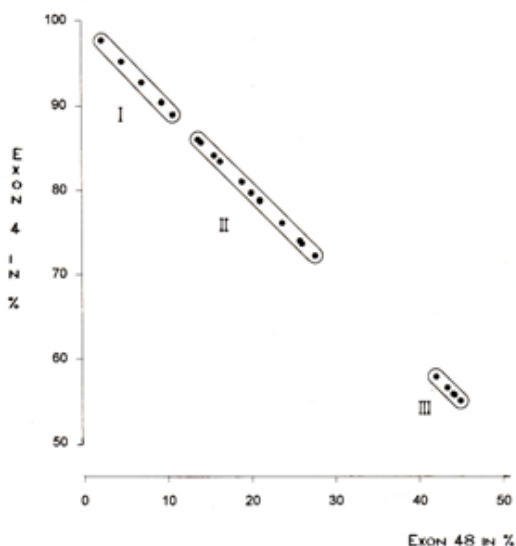
**Фигура 5 (А).** Индиректен анализ в семейство с делеция на екзони 45-49. Майка и сестра носителки; директно доказване на носителство при сестрата чрез загуба на майчин алел в делецията; **(Б).** директно доказване на неносителство при сестрата чрез установяване на хетерозиготност в делецията.

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

Фактът, че в района на делецията жените носителки имат наполовина намалено алелно съдържание спрямо неносителките ни подтикна да разработим полуколичествен метод за доказване на носителство [Bronzova, Todorova, Kalaydjieva, 1994]. За целта използвахме дуплексен PCR: в една реакция бяха амплифицирани два екзона, един в делецията и един извън делецията, играещ ролята на контрола. Получените продукти бяха разделяни в акриламиден гел и резултатите се визуализираха след автордиография и денситометрия (Фигура 6А, Б). В някои случаи резултатите получени при носителки на делеции се разграничаваха трудно от тези при нормални контроли (Фигура 7 групи I и II). Поради това затруднение в интерпретацията на резултатите, както и поради радиоактивното изпълнение на теста и нуждата от специална денситометрична апаратура тази методика беше използвана за диагностични цели много кратко време.



**Фигура 6.** Полуколичествен метод за доказване на хетерозиготно носителство на делеции на базата на амплификация на два екзона, единият в делецията, другият извън нея. (А). Радиоактивна електрофореза на двата амплификационни продукта. (Б). Денситометрия. Проба 1 – хетерозиготна делеция на екзон 48; проба 2 – хетерозиготна делеция на екзон 4; проба 3 – нормална контрола.



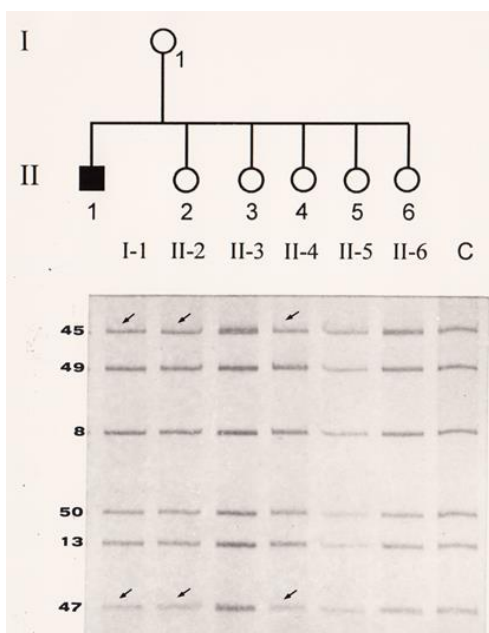
**Фигура 7.** Пропорция на екзонните пикове след денситометрична обработка.

I – носителки на делеция, включваща екзон 48

II – неносителки

III – носителки на делеция, включваща екзон 4

Същата идея за полуколичествена оценка на носителство при рисковите жени от засегнатите ДМД/БМД фамилии беше доразвита по-късно в съвместните ни разработки с Dr. Marta Miorin от екипа на проф. Gian-Antonio Danieli, University of Padua, Italy [Miorin, Todorova et al., 1997]. Методиката се базираше отново на мултиплексен полу-количествен PCR, анализиран в акриламиден гел със сребърно оцветяване, както при скрининга за делеции при засегнатите момчета. За да може да се използва за полуколичествена оценка на броя копия във всеки амплификационен фрагмент, въведохме някои модификации. Количеството на всички ДНК проби, които се анализират в една серия трябва да е еднакво (100 ng разредена ДНК) и намножаването се провежда при 17 цикъла (експоненциална фаза на амплификация). Идеята беше, че при стартиране с еднаква матрица при всички проби и при провеждане на PCR амплификацията в експоненциална фаза, броят копия които получаваме за всеки фрагмент във всяка проба са количествено сравними и зависят от наличните алели в генотипа на пациента (един алел при наличие на делеция или два алела при нормален резултат) (Фигура 8). При тези рестриктивни условия на изпълнение на PCR дори без помощта на денситометър могат директно да се визуализират разлики в интензивността на получените фрагменти. Сравнението беше извършвано спрямо контролни проби (хоризонтално) и спрямо контролни фрагменти в рамките на всяка проба (вертикално).

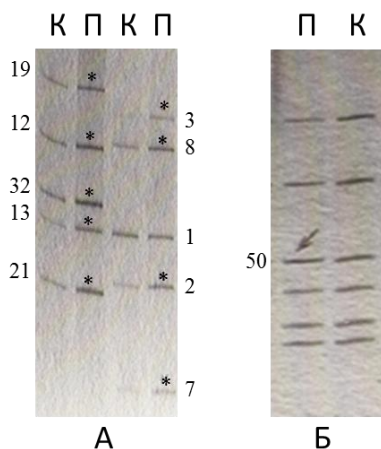


**Фигура 8.** Полуколичествен метод за доказване на хетерозиготно носителство на делеции в рамките на едно семейство. Делетираните екзони 45 и 47 са посочени със стрелки.

### Дупликации в *DMD* гена

Изпълнението на PCR за полуколичествена оценка на брой копия във всеки амплификационен продукт вече беше доказало своите възможности, поради което се породиха идеята да се използва същата методика за търсене на дупликации при засегнатите момчета. Очакваните резултати бяха един алел за нормален резултат и два алела при наличие на дупликация. Търсенето на дупликации в *DMD* гена винаги е било голямо предизвикателство, поради огромния размер на дуплицираните фрагменти. Разработеният от нас полуколичествен мултиплексен PCR беше приложен при български пациенти, които оставаха с неясен молекулен дефект след прилагане на делеционен скрининг. С помощта на тази методика бяха

открити първите две дупликации у нас: dupl 48-50 и dupl 2-32...33 (Фигура 9) [Todorova et al., 1996]. В последствие, тези два молекулни дефекта бяха потвърдени с навлизането на новите модерни MLPA технологии за количествен анализ (виж Таблица 1).



**Фигура 9.** Полуколичествен метод за доказване на дупликации. Дуплицираните екзони са представени със звездичка и стрелка.

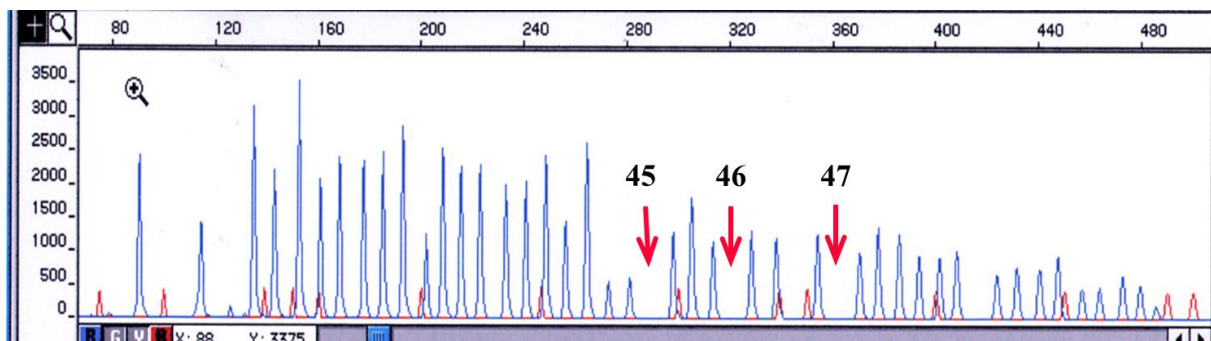
(А). Дупликация на екзони 2-32; (Б). Дупликация на екзон 50.

К – контрола; П - пациент

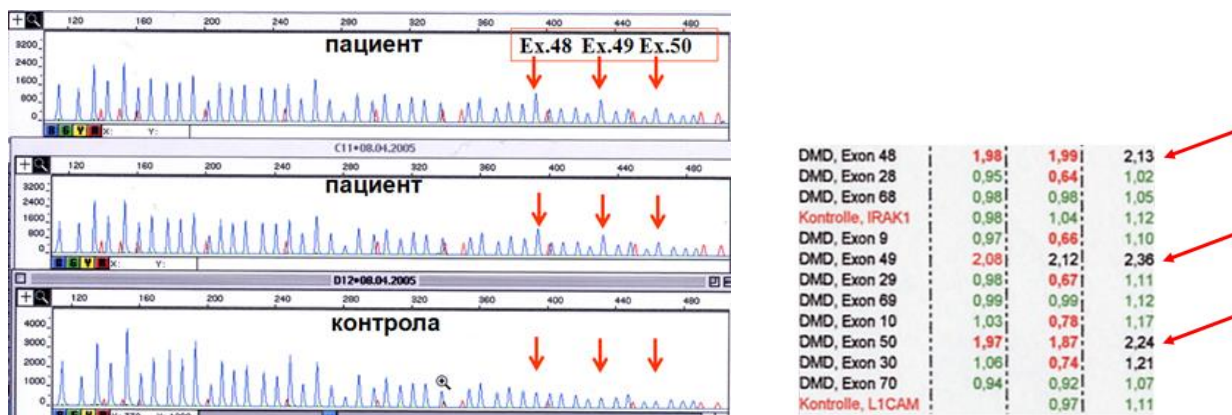
Наличните по онова време диагностични методи за анализ на *DMD* гена имаха някои сериозни недостатъци: не беше възможно да се реши проблемът на семейството, ако индексният пациент е починал; не беше възможно (или беше възможно в редки случаи) да се изследват директно жени за носителство; при липса на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

Години по-късно, през 2003-2004 г. в колаборация с екипа на проф. Jurgen Horst, University of Muenster, Germany, започнахме оптимизиране на MLPA анализ за диагностичното му приложение при ДМД/БМД пациенти [www.mlpa.com]. При болните момчета делециите се откриват лесно на базата на загуба на амплификационен продукт за един или няколко екзона (Фигура 10). Дупликациите обаче, се интерпретират по-трудно на базата на количествена оценка на амплификационните продукти с помощта на математически Excel алгоритми или специфични софтуери (Фигура 11). При съотношение на площите >1.9-2.0 резултатът се интерпретира като дупликация (Фигура 11).

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



**Фигура 10.** MLPA профил при пациент с делеция на екзони 45-47 (ex45ex47del -> с.6439-?\_6912+?del).



**Фигура 11.** MLPA профил при пациент с дупликация на екзони 48-50 (ex48ex50dup -> c.6913-?\_7309+?dup) и математически Excel алгоритъм за интерпретация на резултата.

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

**Таблица 1.** Дупликации при български пациенти с ДМД/БМД.

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

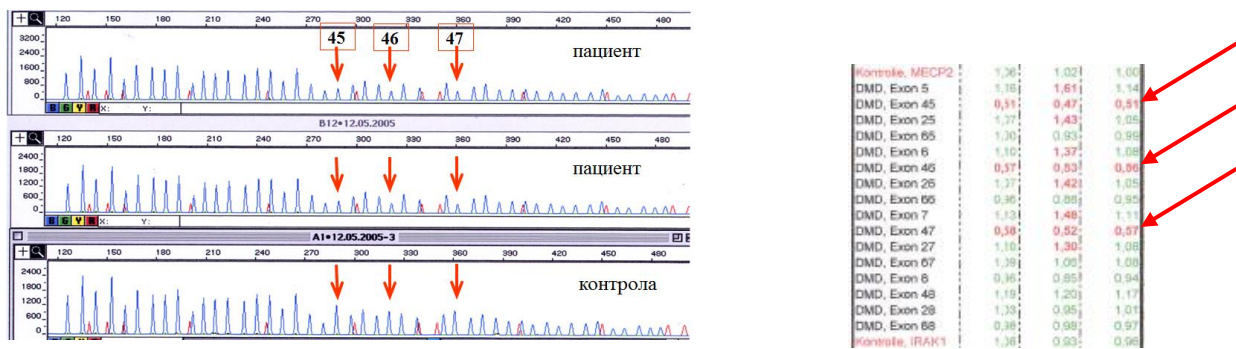
\*\*\*\* - Доказани и с полуколичествен анализ

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

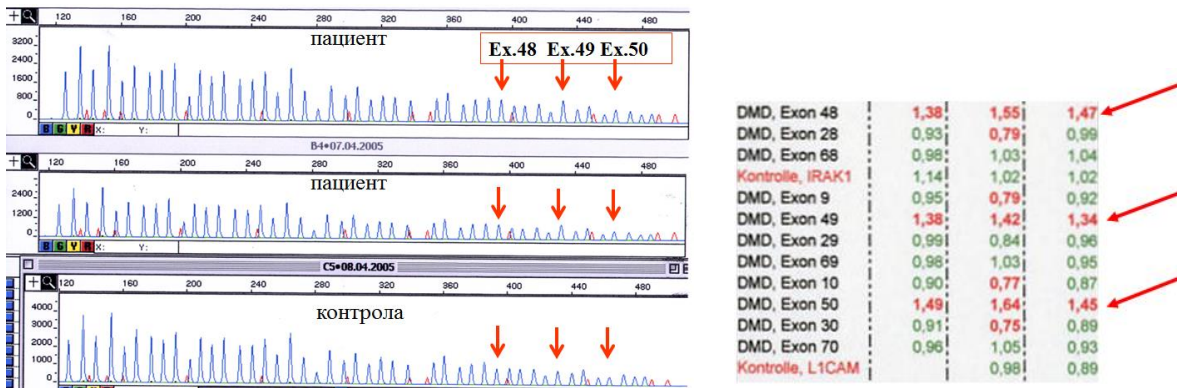
Освен за откриване на дупликации, MLPA анализът дава възможност да се изследват и директно жени за носителство на делеции и дупликации, както и семейства с починал индексен пациент. До момента сме изследвали 9 такива семейства и сме открили делеции като молекулна причина за заболяването при 6 от тях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

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

Носителството на делеция се оценява количествено като намаляване площта на делетираните фрагменти наполовина (Фигура 12), а носителството на дупликации – като увеличаване площта на дуплицираните фрагменти (Фигура 13). Необходима е математическа обработка на резултатите в програма Excel за по-прецизна интерпретация на броя копия в даден генен регион (Фигури 12 и 13). При съотношение на площите под 0.6, резултатът се интерпретира като хетерозиготна делеция, а при съотношение на площите над 1.3, резултатът се интерпретира като хетерозиготна дупликация.



**Фигура 12.** MLPA профил при жена, носителка на делеция на екзони 45-47 (ex45ex47del -> c.6439-?\_6912+?del) и математически Excel алгоритъм за интерпретация на резултата.

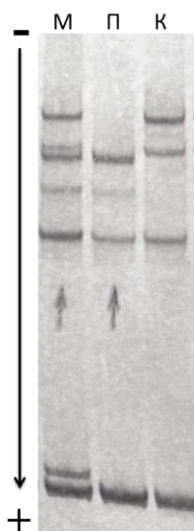


**Фигура 13.** MLPA профил при жена, носителка на дупликация на екзони 48-50 (ex48ex50dup -> c.6913-?\_7309+?dup) и математически Excel алгоритъм за интерпретация на резултата.

Малки делеции, инсерции, дупликации или точкови мутации остават в повечето случаи неоткрити с тази техника. В някои изключително редки случаи се оказва възможно MLPA анализът да е от помощ и при откриване на точкови мутации. Поради това, при липса само на един екзон от електрофоретичния профил на ДМД/БМД пациент, този екзон се проверява с PCR.

### Точкови мутации

Останалите мутации в *DMD* гена с честота около 25% са nonsense и missense мутации, малки делеции (от един до няколко нуклеотида в рамките на един екзон) и мутации, нарушаващи сплайсинга. Откриването на този вид дефекти беше най-затруднено технологично, поради огромните размери на гена и изследването екзон по екзон чрез радиоактивно секвениране, изглеждаше като да „търсиш игла в копа сено“. Скринингът за точкови мутации при български пациенти започна в колаборация с екипа на проф. Gian-Antonio Danieli, University of Padua, Italy се основаваше на SSCP (single-strand conformation polymorphism) анализ [Todorova and Danieli, 1997]. Този метод се базира на факта, че някои точкови мутации променят конформационната подвижност на едноверижни ДНК фрагменти, което дава възможност за промяна в електрофоретичния профил, при анализиране на пациенти спрямо нормални контроли (Фигура 14). Този тест беше много продължителен във времето (за ген с размерите на *DMD* бяха необходими около 2-3 години за да се скринира напълно при група от около 15 пациента), много трудоемък и с незадоволителна чувствителност (не всички мутации в дадения регион променят конформацията и могат да се открият чрез SSCP анализ), поради което не се прилагаше рутинно за диагностични цели. При откриването на специфичен електрофоретичен профил се налагаше в последствие секвениране на съответния екзон, за да се установи какво причинява променената конформация.



**Фигура 14.** SSCP профил на екзон 41 от *DMD* гена. Пациент (П) мутантен профил, сравнен с нормална контрола (К) и майка (М), хетерозиготен носител на мутацията.

Изследването на всичките 79 екзона на *DMD* гена е продължителен, трудоемък и все още сравнително скъп анализ. Откритите точкови мутации при български пациенти са представени в Таблица 2.

**Таблица 2.** Точкови мутации и малки делеции при български пациенти с ДМД/БМД.

№	Диагноза	Екзон	Нуклеотидна замяна	Аминокиселинна замяна
1	ДМД	44	del16bp	Frameshift
2	ДМД	59	c.8776C>T	p.Gln2926*
3	ДМД	7	c.583C>T	p.Arg195*
4	ДМД	и17	c.2169-2A>G	Сплайсинг мутация
5	ДМД	3	c.178C>T	p.Gln60*
6	ДМД	24	c.3220G>T	p.Glu1074*
7	ДМД	и64	c.9361+1G>A	Сплайсинг мутация
8	ДМД	59	c.8929_8932delAAAG	p.Lys2977Serfs*11
9	ДМД	43	c.6276C>G	p.Tyr2092*
10	ДМД	6	c.473A>T	p.Asn158Ile
11	ДМД	23	c.2991C>G	p.Tyr997*
12	ДМД	41	c.5845delC	p.Gln1949fs*33
13	ДМД	16	c.1975G>T	p.Glu659*
14	ДМД	32	c.4375C>T	p.Arg1459*

\*- стоп кодон; и-интрон

Към 2015 г. са открити 11 точкови нуклеотидни замени и 3 малки делеции на един или няколко нуклеотида при български пациенти. Всички точкови мутации са открити при ДМД пациенти. Прави впечатление, че само една от откритите мутации е missenes. Аминокиселинната замяна в екзон 6 p.Asn158Ile беше анализирана с математическите предиктори за оценка патогенния ефект на замяната върху белтъчната структура и/или функция (PolyPhen2 v.2.2.2) и беше оценена като патогенна със скор 1.000.

Останалите точкови мутации и малки делеции причиняват преждевременно прекратяване на белтъчната синтеза. Две от точковите мутации нарушават сплайсинга.

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

Откриването на променен електрофоретичен профил в хода на SSCP анализа можеше да се използва и за директно доказване или отхвърляне на носителство при жените от семейството на конкретен пациент, който е диагностициран посредством SSCP анализ (виж Фигура 14). При жени хетерозиготни носителки на точковата мутация се установява двоен

електрофоретичен профил комбинация от нормалния и патологичния (виж Фигура 14). При жени носители, профилът е идентичен с този при нормални контроли.

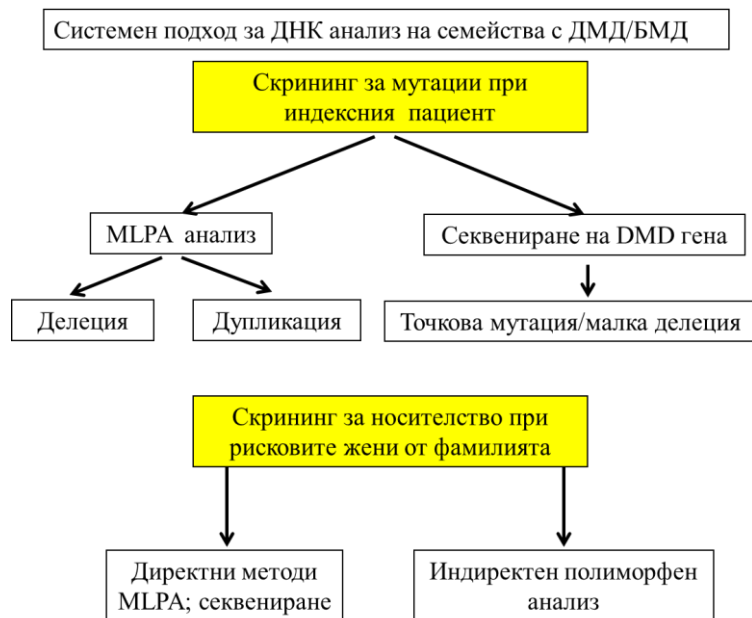
Секвенционните технологии по Sanger и NGS дават възможност директно да бъде установена точкова мутация в генома на всяка жена от рискови семейства с ДМД/БМД.

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

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

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

На Фигура 15 е представен **системен подход** за анализ на семейства с ДМД/БМД фенотип, който позволява успеваемост на молекулярно-генетичната диагностика близка до 100%. С приложението на MLPA анализ за делеции и дупликации успяваме да изясним ~67% от семействата с липсващ индексен пациент.



**Фигура 15.** Системен подход за анализ на семейства с ДМД/БМД фенотип.

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

Първата диагноза LGMD2A при български пациент на молекулно ниво поставих през 2002 г. в колаборация с групата на prof. Clemens Mueller-Reible, University of Wuerzburg, Germany [Todorova et al., 2005]. Молекулярно-генетичният анализ на калпаин 3 гена вървеше бързо и лесно чрез секвениране на *CAPN3* гена на автоматичен секвенатор. Почти 100% от имунохистохимично заподозряните пациенти бяха доказани на молекулно ниво. По това време, разполагах с ДНК проби от български пациенти с неясна клинична диагноза, най-общо казано „мускулна дистрофия неопределен тип“. Анализирах *CAPN3* гена при тази група пациенти и какво беше моето учудване, когато една значителна част от тях се оказаха с калпаинопатия. Така беше поставено началото на молекулярно-генетичната диагностика на LGMD2A у нас.

Бяха изследвани 151 неродствени семейства с предполагаема клинична диагноза пояс крайник. Клиничната диагноза беше потвърдена на молекулно ниво при 24 пациента (22 неродствени български семейства). На базата на генетично верифицираните случаи (~15%) беше обобщена клиничната симптоматика на българските пациенти с калпаинопатия [Георгиева, 2006 докторска дисертация; Todorova et al., 2007]. Началото на заболяването в нашата група пациенти варира от 1 до 28 годишна възраст (средна възраст 14.5 години). Първите симптоми почти във всички случаи са свързани с проблеми и затруднения при изкачване на стълби, тичане и изправяне от клекнало положение. Бързата уморемост и чести падания са едни от най-често описваните първи симптоми. Креатинфосфокиназата показва драстично увеличени стойности при всички пациенти, особено в началните етапи от развитие на заболяването. Този показател, обаче не може да се използва като надежден диагностичен критерии, тъй като такива отклонения в ензимните стойности се наблюдават при повечето

мускулни дистрофии. Сред останалите клинични показатели най-специфична находка за конкретната диагноза изглеждат ясно изразената проксимална мускулна слабост и слабост в горните крайници и раменния пояс.

### Точкови мутации в *CAPN3* гена

Точкови мутации (главно missense и една nonsense) заедно с делеции на няколко екзона и малки делеции на един или няколко нуклеотида в *CAPN3* гена представляват най-честата молекулярна причина за изява на калпаинопатия. Резултатите са представени в Таблица 3.

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

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

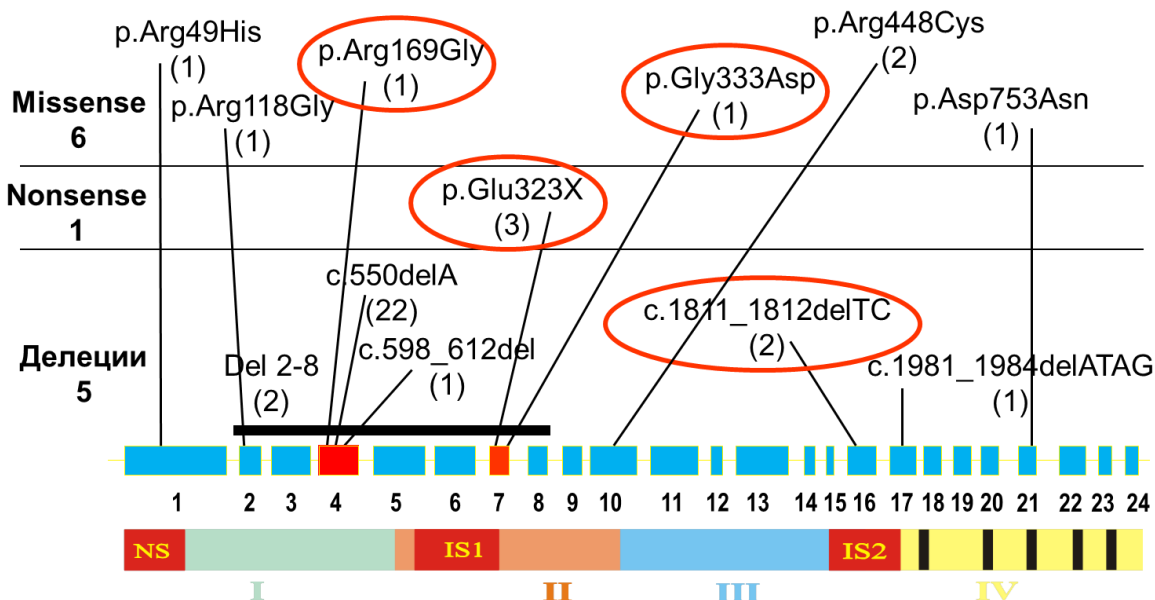
7 А и Б – две болни сестри, 16 А и Б – болни брат и сестра (от близкородствен брак)

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

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

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

В нашата извадка бяха открити 4 мутации, които не бяха съобщавани до тогава от други автори (виж Таблица 3); в следствие някои от тях бяха намерени и при пациенти от други популации. Локализацията на мутациите по дължината на гена (екзоните, в които попадат) и границите на белтъчните домени са представени на Фигура 16.



**Фигура 16.** Мутации в *CAPN3* гена при български LGMD2A пациенти. Екзони 4 и 7 са маркирани в червено, там попадат 76% от откритите мутации при български пациенти (26/34). Заградените мутации са открити за пръв път при български пациенти. Броят пациенти, които носят една и съща мутация е представен в скоби.

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

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

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

В нашата извадка от LGMD2A пациенти най-чест патогенен дефект 68% (26/38) се оказаха малки делеции на един или няколко нуклеотида (виж Таблица 3 и Фигура 16). От откритите дефекти 30 (79%) водеха до изместване на рамката на четене на генетичната информация (frameshift) и/или стоп-кодон, свързани с преждевременно прекратяване на белтъчната синтеза. Патогенният ефект на делециите и nonsense мутациите не се нуждаеше от допълнителни доказателства и проверки.

В допълнение, открихме 6 типа missense мутации, заменящи една аминокиселина с друга. Една от тях p.Asp753Asn беше публикувана в световната база данни като патогенна [www.dmd.nl] и не е интерпретирана допълнително за доказване патогенния ѝ ефект при нашия пациент. Останалите пет съгласно изискванията по онова време бяха проверени върху

100 нормални български хромозоми и на тази база бяха приети като свързани със заболяването и съответно патогенни. С възникването на математическите предиктори за оценка патогенния ефект на мутациите върху белтъчната структура и/или функция, вече разполагахме с друго средство за интерпретация на missense мутациите. Тези предиктори се превърнаха в неразделна част от нашата ежедневна работа по ДНК анализа на всеки конкретен пациент. Откритите от нас missense мутациите в *CAPN3* гена бяха анализирани със специфичен софтуер PolyPhen-2 v2.2.2r. Шестте missense мутации засягат еволюционно висококонсервативни аминокиселини, което има важен принос за оценка на техния патогенен ефект. Вероятният патогенен ефект на четирите аминокиселинни замени беше оценен със скор за патогенност съответно: 1.000-0.988; 1.000-0.998; 1.000-1.000; 0.912-0.786; 1.000-1.000 и 1.000-1.000.

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

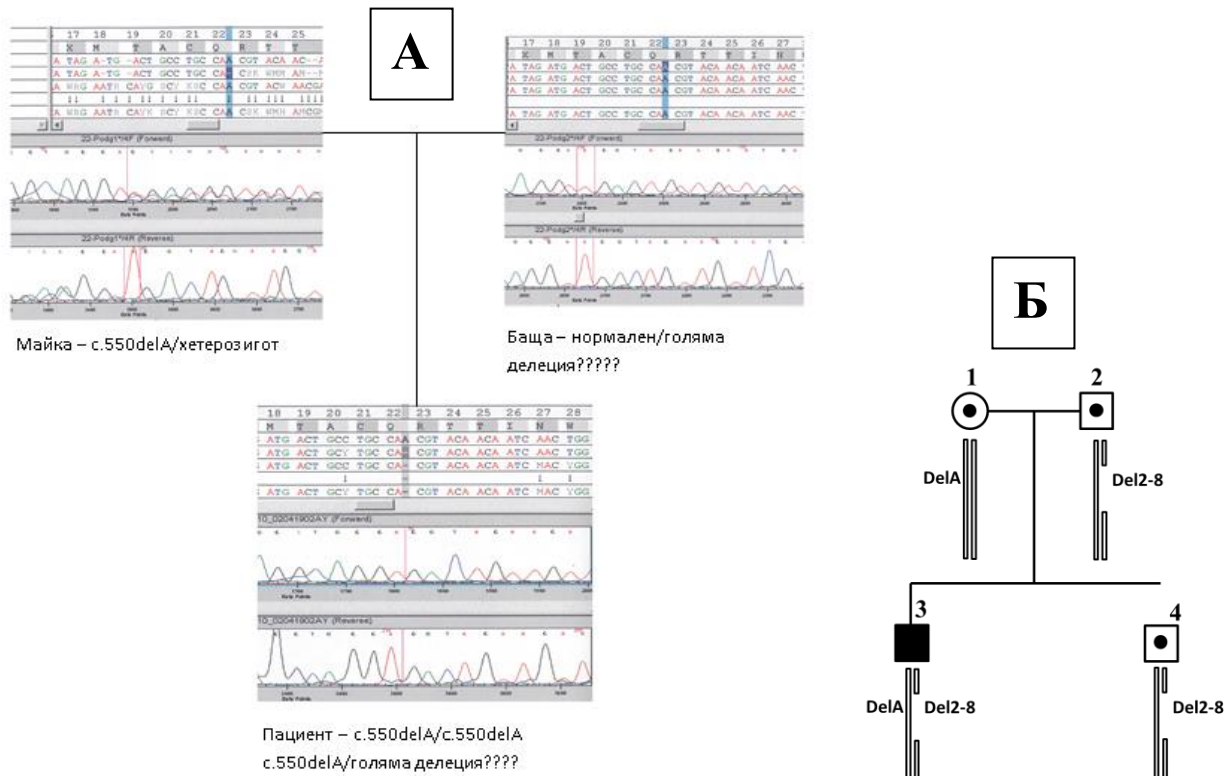
Особен интерес от научна гледна точка представляваха двете мутации в екзон 1 p.Arg49His и в екзон 16 c.1811-12delTC, които засягат две инсерирани секвенции NS и IS2, респективно (виж Фигура 16). Тези последователности играят важна роля за мускулно специфичния калпаин 3. И двата участъка са включени в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

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

### **Големи делеции в *CAPN3* гена**

До тук молекулярно-генетичната диагностика на *CAPN3* гена изглеждаше лесна и безпроблемна. Тези ни очаквания обаче не се оправдаха. При две от изследваните семейства секвенционният анализ показва хомозиготно състояние на делецията c.550delA в екзон 4 на *CAPN3* гена (Фигура 17А). На пръв поглед всичко изглеждаше наред, до момента в който изследвахме родителите за носителство. Секвенционният анализ показва, че само майките носят мутацията c.550delA в хетерозиготно състояние, докато бащите не носеха такава делеция на ДНК ниво (хомозиготни по нормален генотип) (Фигура 17А). И в двата случая бащинството беше потвърдено. Най-логично изглеждаше обяснението за наличие на втора голяма делеция, покриваща целия екзон 4, в резултат на което мутацията c.550delA изглежда хомозиготна при пациента, но тя е в действителност в хемизиготно състояние (Фигура 17Б). По това време, единствената технология, която даваше възможност да се провери тази хипотеза беше изследването на ниво транскрипт (копиДНК). Това наложи изолиране на РНК при тези 2 семейства, обратна транскрипция и PCR на копиДНК със специфично дизайнирани праймери в региона на екзон 1 и екзон 10. В този експеримент „успехът на начинаещия“ беше на наша страна и се получи недвусмислен резултат: наличие на един атипичен (мутантен)

транскрипт около 850 bp и един нормален транскрипт ~1600 bp (Фигура 18). Мутантният транскрипт беше екстахиран от гела и секвениран. Установихме делеция на екзони 2-8 от калпаин 3 гена (Фигура 19).

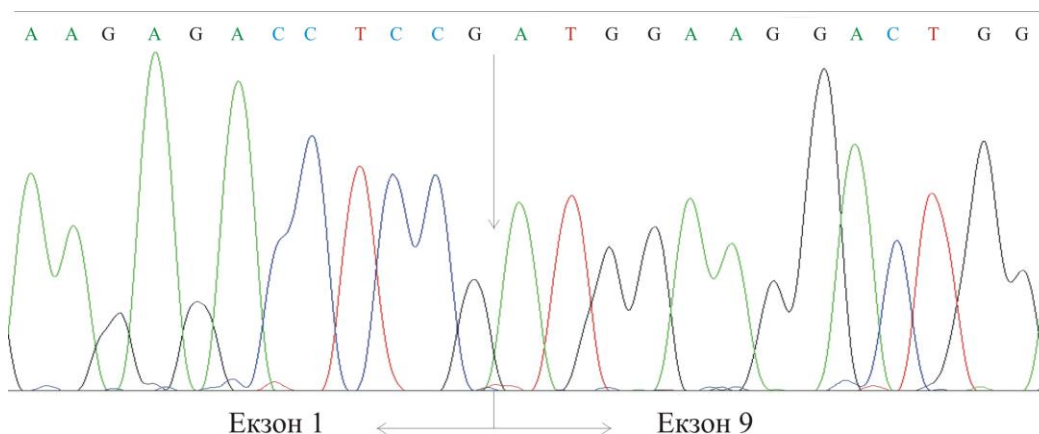


**Фигура 17.** Анализ на мутацията c.550delA в рамките на едно семейство. (А). Секвенционни профили и предположение за наличие на голяма делеция в *CAPN3* гена; (Б). Генотипове на изследваните лица.



Откритата голяма делеция на екзони 2-8 (c.310-?\_c.1115+?del; p.Glu104\_Arg372delfs\*11) е една и съща и при двете изследвани семейства. Този генен дефект нарушава рамката на четене на генетичната информация (frameshift) и води до преждевременно прекратяване на белтъчната синтеза 11 кодона след началото на екзон 9. По същото време такава делеция беше докладвана на European Human Genetics Conference, May 2003, Birmingham, England при швейцарски пациент, който за огромно щастие на изследователите е бил хомозиготен по този дефект и това прави лесно откриването му на ДНК ниво [Joncourt et al., 2003]. Преди нашето

открытие, в литературата беше съобщена само една голяма делеция на екзони 5-7 [Richard et al., 1999].



**Фигура 19.** Секвенционен анализ на получения абнормален транскрипт. Краят на екзон 1 се сплайсва с началото на екзон 9, което съответства на делеция на екзони 2-8 (с.310-?\_с.1115+?del, р.Glu104\_Arg372delfsh\*11).

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

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

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

Нашата хипотеза, че калпаинопатията ще се окаже честа за България беше потвърдена. В годините след въвеждане на молекулярно-генетичната диагностика на *CAPN3* гена се оказа, че тези пациенти не са рядкост у нас. Освен това, с помощта на молекулярно-генетичен

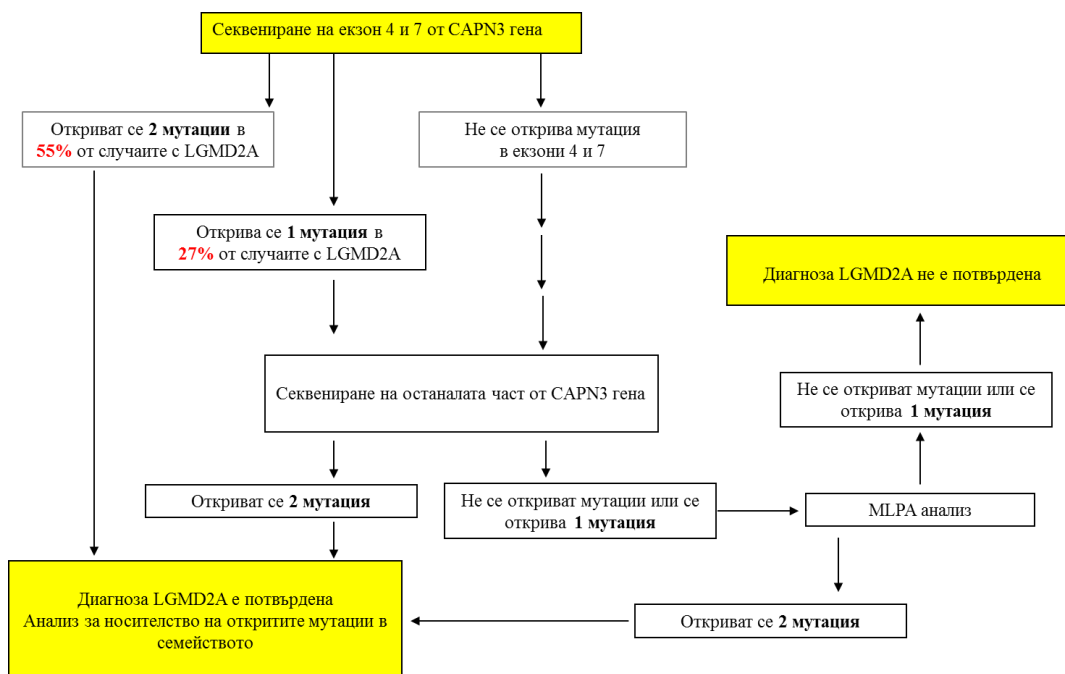
скрининг за двете най-чести мутации в *CAPN3* гена за българските пациенти (c.550delA и p.Glu323\*) се оказва, че някои пациенти с предварителна диагноза ДМД/БМД или спинална мускулна атрофия (СМА), които не са били генетично потвърдени, са в действителност погрешно клинично диагностицирани (Таблица 4) [Georgieva/Todorova et al., 2005].

**Таблица 4.** Ревизиране на диагнозата при пациенти с ДМД/БМД и СМА след провеждане на молекулярно-генетични изследвания.

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

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

Разработеният **системен подход** за анализ на семейства с калпаинопатия е представен на Фигура 20. Успеваемостта на молекулярната диагностика, следвайки този алгоритъм е близка до 85%.



**Фигура 20.** Системен подход за анализ на семейства с LGMD2A.

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

През 2002 г. верифицирах на молекулно ниво първия български пациент с диагноза ЕДМД. Това беше направено отново в колаборация с групата на prof. Clemens Mueller-Reible, University of Wuerzburg, Germany. Тогава имах за задача за разработя и оптимизирам за рутинно изпълнение молекулярно-генетичната диагностика на *LMNA* гена при немски пациенти. След месеци работа успяхме да открием първата мутация в *LMNA* гена при немски пациент и след ревизиране на клиничната диагноза при серия немски пациенти, успяхме да верифицираме на молекулно ниво и други пациенти. Тогава разполагах с ДНК проби от български пациенти с неясни невромускулни заболявания и когато скринирах и нашите пациенти с клинична диагноза съответстваща на ЕДМД, един от тях беше верифициран на молекулно ниво. Така беше поставено началото на молекулярно-генетичната диагностика на ламинопатии в България. Част от тези резултати бяха публикувани в глава от книга “Progress in Medical Genetics”, редактор Marlene A. Horry, Nova Science Publishers, Inc., New York [Todorova et al., 2006].

През изминалите 13 години (2002-2015) изследвах 17 неродствени пациента от немски произход и 7 неродствени български семейства с предполагаема клинична диагноза невромускулна ламинопатия. Мутации в *LMNA* гена бяха открити при 7 от немските пациенти, 41% и при 5 от българските семейства, 71%. Възрастта на поява на първите симптоми при нашите пациенти варираше в широки граници: от 1 до 35 години (средна възраст 17.6 г). Съобщаваните първи симптоми бяха проблеми при тичане, ходене и изкачване на стълби. При четири от случаите аритмия, сърдечни проблеми и кардиомиопатия бяха наблюдавани от самото начало на манифестиране на заболяването, като в два от случаите сърдечното засягане беше водеща симптоматика. Стойностите на креатинкиназата бяха нормални при пациенти в по-ранна възраст (около 14-16 години). При някои пациенти креатинкиназата беше завишена. Прогресията на заболяването беше бавна през първите 30 години от живота и по-бърза след това. При двама български пациенти засягането беше особено тежко с начало в ранна детска възраст на 1 и 3 години, характеризиращо се с типичната клинична картина на конгенитална мускулна дистрофия и бърза прогресия. Едното от тези деца на 4 годишна възраст не можеше да се движи самостоятелно. Някои пациенти се движеха самостоятелно след 50 годишна възраст, а други се нуждаеха от помощ при ходене и изкачване на стълби от по-ранна възраст. Мускулната слабост при повечето пациенти засягаше проксималните мускули на долни и горни крайници, като варираше от лека до тежка форма. Мускулна атрофия, хипертрофия на прасците и криловидни лопатки бяха наблюдавани при единични пациенти. Гръбначни деформации като хиперлордоза и торакална кифоза бяха рядко срещани. Лакътни контрактури, както и контрактури на глезена, стъпалата и врата бяха докладвани при всички пациенти с едно изключение, като при този пациент беше подчертано, че контрактури никога не бяха наблюдавани от преглеждащите го клиницисти. По отношение на сърдечното засягане, всички наши пациенти, с изключение на двете деца, страдаха от ритъмни нарушения. Проводни нарушения бяха установени по-рядко само при 2-ма от нашите пациенти. AV блок беше диагностициран при единични пациенти. При 5 пациента беше имплантиран поне един

расemaker. В два от случаите беше имплантиран дефибрилатор. В редица случаи се налагаше постоянна антикоагулантна терапия с warfarin. Пет от немските семейства и 3 от българските бяха фамилни, 2 немски и 2 български - спорадични.

### **Точкови мутации в LMNA гена**

Резултатите от скрининга за мутации в LMNA гена са представени в Таблица 5. Повече от 80% от откритите първоначално мутации бяха уникални, открити за пръв път от нас, тъй като по онова време молекулярно-генетичната диагностика на ламинопатии едва започваше в световен мащаб и имаше по-малко от 100 патологични находки в LMNA гена в световната база данни. С изключение на мутацията p.Thr528Lys, която беше открита при двама неродствени пациента от немски произход (виж Таблица 5) и беше вече публикувана в други проучвания [Bonne et al., 2000; Brown et al., 2001], всички останали мутации бяха различни за различните пациенти.

Мутациите, които открихме в LMNA гена бяха главно missense (75%), мутации нарушаващи сплайсинга (17%) и nonsense (8%). В нашата извадка от немски и български пациенти не установихме друг тип мутации като малки делеции или инсерции.

**Таблица 5.** Мутации в LMNA гена при немски (1-7) и български (8-12) пациенти.

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

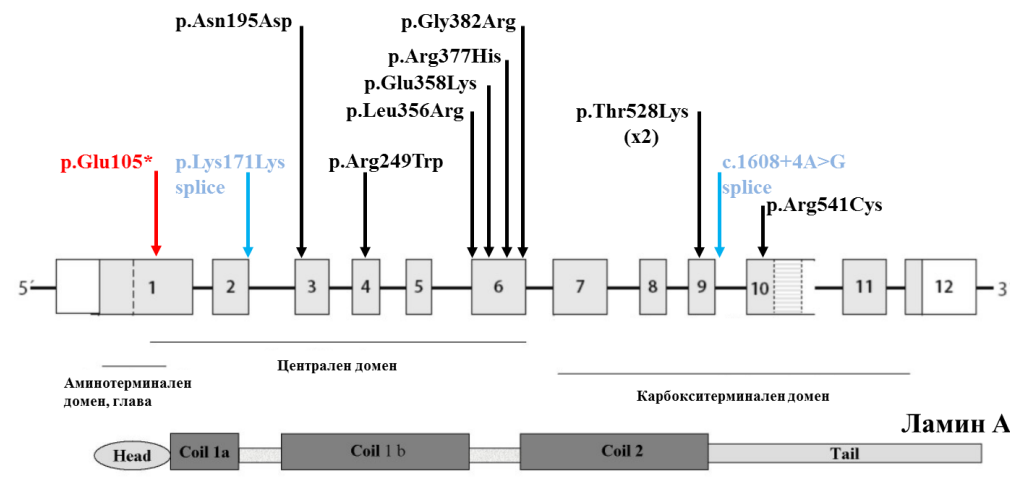
Немските и български пациенти в таблицата са разделени със сиво поле.

\*-стоп кодон

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

Повечето missense мутации засягат централния  $\alpha$ -спирален rod домен на протеина с hotspot в екзон 6. Няколко мутации попадат в C-терминалния глобуларен участък (Фигура 21).

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



**Фигура 21.** Локализация на откритите мутации в нашата извадка по дължината на *LMNA* гена. Екзоните на гена са номерирани в правоъгълници, а белтъчните домени са надписани и илюстрирани под съответните екзони. Missense мутациите са представени в черно с черни стрелки, посочващи позицията на мутацията в конкретния екзон; мутациите нарушаващи сплайсинга са представени в синьо, а стоп-кодон мутацията - в червено.

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

предположим, че тези мутации упражняват подобен ефект върху правилното сглобяване и локализация на ламин А/С белтъчната молекула.

Nonsense мутации са докладвани сравнително рядко в *LMNA* гена, много по-рядко от аминокиселинните замени. В нашата извадка от немски и български пациенти ние открихме само една такава мутация p.Glu105\* в екзон 1, при голямо немско родословие, която е асоциирана с тежка форма мускулна дистрофия пояс-крайник със сърдечно засягане.

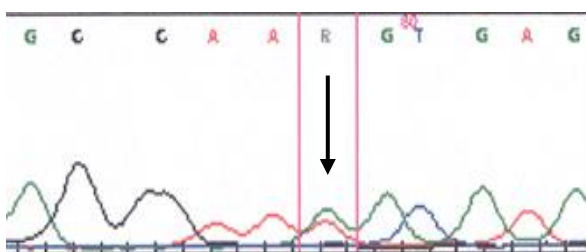
Особен интерес представляват двете мутации, нарушаващи сплайсинга (splice-site). Мутацията с.1608+4A>G засяга четвъртия нуклеотид в донор сплайсинг участъка на интрон 9. Имаше друга публикувана мутация в позиция +5 на същия този донор сплайс участък (с.1608+5G>C), която беше доказана на транскрипционно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

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

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

Втората сплайс мутация, която доказахме в *LMNA* гена (Фигура 22) беше голямо откритие за времето си и отново преобърна тогавашните ни представи за това кои нуклеотидни замени са патогенни и кои се толерират в генома.

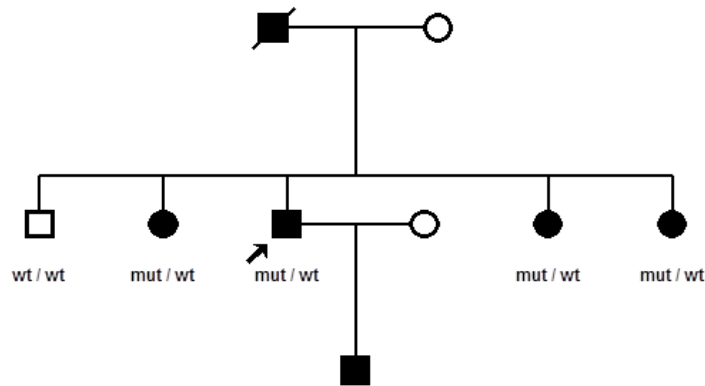
#### LMNA екзон 2, с.513G>A, p.Lys171Lys



**Фигура 22.** Секвенционен профил на сплайс-сайт мутацията в екзон 2 на *LMNA* гена.

До тогава синонимните замени, които откривахме в хода на диагностиката на генетичните заболявания бяха пренебрегвани и на тях не се обръщаше особено внимание. Без каквито и да е по-нататъшни изследвания ги приемахме като непатогенни.

След като приключихме скрининга на целия *LMNA* ген при този пациент, други замени не бяха открити. Клиниката, обаче отговаряше до голяма степен на LGMD1B с типично доминантно унаследяване в няколко засегнати поколения (Фигура 23).



**Фигура 23.** Родословно дърво на семейството със сплайс-сайт мутация p.Lys171Lys. Индексният пациент е посочен със стрелка; wt – див тип; mut – мутантен алел.

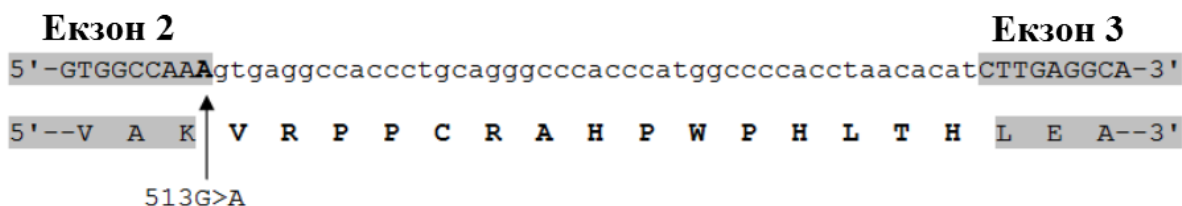
Тогава се замислих над факта, че нуклеотидната замяна с.513G>A засяга последния нуклеотид от екзон 2, точно 5' от донор сплайс участъка и си зададох въпроса каква е вероятността тази нуклеотидна замяна да се отразява върху нормалното процесирание? Ако това е така, то на пръв поглед синонимната аминокиселинна замяна би могла да се превърне в мутация, нарушаваща сплайсинга. Успяхме да съберем ДНК проби от други засегнати и здрави родственици на индексния пациент (виж родословното дърво на Фигура 23) и се оказа, че нуклеотидната замяна с.513G>A сегрегира със заболяването в семейството. Изненадата от тези първи резултати беше голяма и ни мотивира да продължим да изследваме тази находка на транскрипционно ниво. Дизайнирах нови праймери в екзонните последователности на екзон 2 и екзон 3 от *LMNA* гена [Todorova et al., 2003]. Изолираната тотална РНК от пациента и тотална РНК от нормална контрола бяха подложени на обратна транскрипция и кДНК синтез, последвани от амплификация с новодизайнираните праймери (RT-PCR, reverse transcription PCR). Получените транскрипти бяха разделени чрез агарозна гел електрофореза (Фигура 24).

Експериментът показва наличието на два транскрипта при пациента спрямо контролата; единият съвпадащ с този при контролата, а другият по-тежък с около 50 базови двойки (виж Фигура 24). Нивото на експресия на патологичния транскрипт беше около 25% от това на нормалния. Двата транскрипта бяха клонирани с помощта на ТОРО ТА клониращ кит (Invitrogen), за да може всеки един от тях да бъде в последствие секвениран самостоятелно.



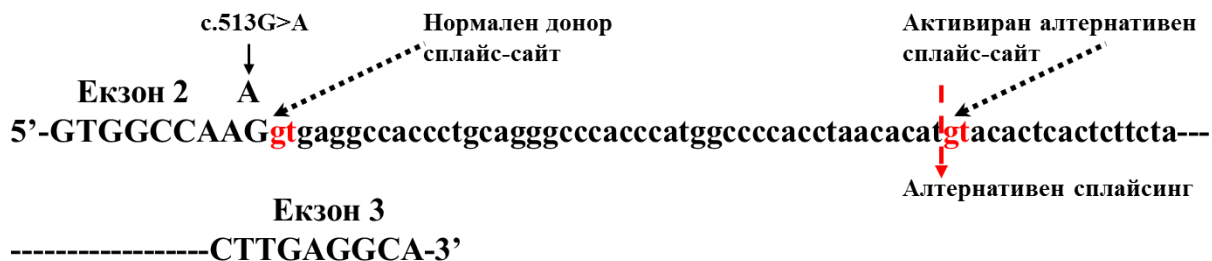
**Фигура 24.** Агарозна гел електрофореза на получените транскрипти (RT-PCR) при пациента спрямо нормална контрола. М – молекулен маркер.

Получените резултати от секвенционния анализ показаха, че патологичният транскрипт съдържа инсерция от 45 нуклеотида (с.513ins45), което води до инсериране на 15 нови аминокиселини (p.Lys171ins15) в белтъчната молекула (Фигура 25). Всичко това се дължи на подтискане на нормалния донор сплайс участък поради мутантния нуклеотид в позиция 5' на консервативния участък и активирането на алтернативен сплайс участък след 45 нуклеотида от интрон 2 (Фигура 26). Изчислените CVs спрямо калкулациите на Shapiro and Senapathy [1987] и Krawczak et al. [1992] са както следва: за нормалната секвенция AGgtgagg CVN=(5.52-0.46)/(5.95-0.46)=0.922; за мутантната секвенция AAgtgagg CVM=(4.84-0.46)/(5.95-0.46)=0.798; за активирания алтернативен сплайс участък ATgtacac CVA=(3.51-0.46)/(5.95-0.46)=0.556. Получените CV стойности показват, че нуклеотидната замяна в позиция -1 на консенсусната сплайсинг секвенция намалява ефективността на нормалната секвенция и в допълнение води до активиране на криптивен сплайс участък, който се разпознава като такъв и води до появата на патологичен транскрипт в приблизително ¼ от случаите.



**Фигура 25.** Секвенция на патологичния транскрипт. Участъците от екзони 2 и 3 са представени с главни букви; инсерираните нуклеотиди от интрона са представени с малки букви; позицията на нуклеотидната замяна с.513G>A е посочена със стрелка и мутантния нуклеотид е маркиран болд; новоинсерираните аминокиселини са представени с еднобуквения символ под съответния кодон.

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



**Фигура 26.** Механизъм на блокиране на нормалния донор сплайс-сайт в интрон 2 на *LMNA* гена и активиране на алтернативен сплайс-сайт 45 нуклеотида след нормалния в посока 3' на интрона (първият gt динуклеотид, който се появява по дължината на интрона след нормалния сплайс-сайт се разпознава като сплайс-сайт и функционира като такъв в хода на процесирването на транскрипта).

### Генотип-фенотипни корелации

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

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

Нивата на креатинфосфокиназата също не можеха да се използват като надежден диагностичен белег, тъй като варираха в много широки граници от нормални стойности, през гранични и леко завишени до многократно завишени стойности. Наличието на контрактури също не е постоянна клинична характеристика на невромускулните ламинопатии. От друга страна сърдечното засягане изглежда доста типично протичащо при нашите пациенти, проявяващо се с аритмия и проводни нарушения, 1-ва степен AV блок. Пет от случаите в хода на прогресията на сърдечната проблематика се нуждаеха от имплантиране на ресетар и/или дефибрилатор.

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

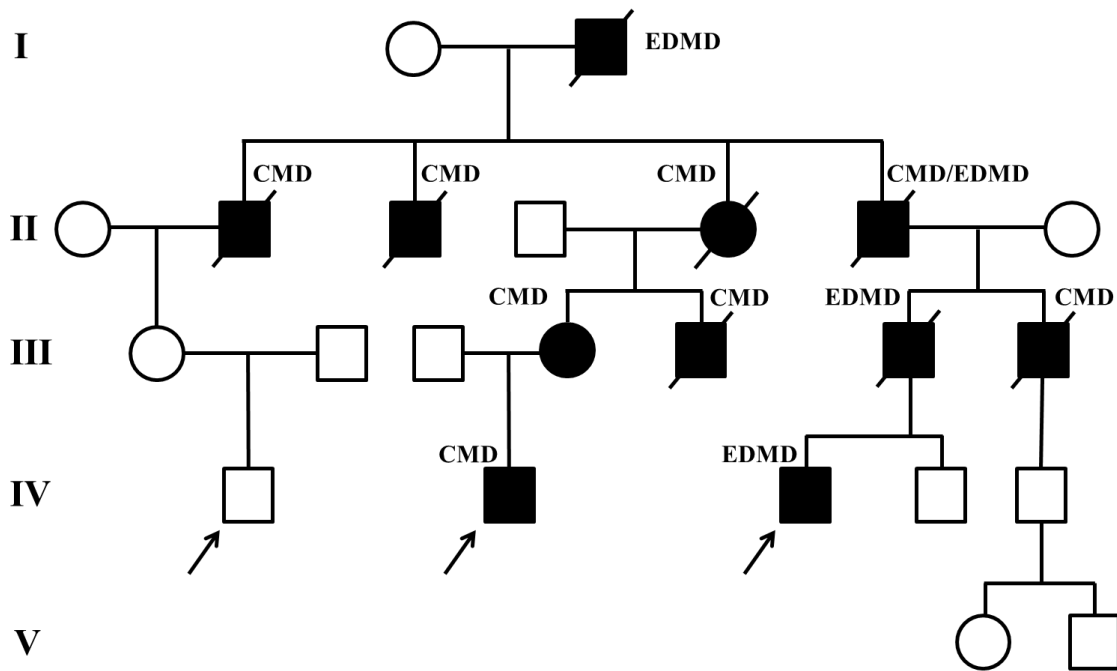
дистрофия) и късно начало през третата декада от живота в останалите два случая. Мутациите нарушаващи сплайсинга в интрони 2 и 9 водят съответно до ранно и късно начало на 14 и 28 години.

В допълнение беше наблюдавана широкоспектърна вариабилност в клиничната симптоматика в рамките на едно семейство. Тази вариабилност беше особено силно изразена при две български семейства. Индексният пациент в семейството с мутация p.Asn195Asp беше сравнително тежко засегнат с начало на заболяването на 16 годишна възраст. Неговата дъщеря, носителка на мутацията, на 17 годишна възраст вече проявяваше тежка мускулна слабост, докато братът на индексния пациент, също носител на мутацията, на 30 годишна възраст не проявяваше никакви симптоми на заболяването. Второто българско семейство с мутация в екзон 6 p.Arg377His представляваше голямо родословие с 4 поколения засегнати индивиди, поне 10 болни (Фигура 27). При снемане на родословната информация направи впечатление, че заболяването във фамилията започва като ЕДМД с водещо невромускулно засягане, след което се предава в един от клоновете като ЕДМД с кардиомиопатия, а в останалите три засегнати клона като чисто сърдечно засягане, дилатативна кардиомиопатия. Същата клинична изява се предава по-надолу при родствениците на всеки един от засегнатите клонове, като в клона със смесено сърдечно и невромускулно засягане в трето поколение при двама братя се установява отново разделяне на симптоматиката на чисто сърдечна и чисто невромускулна (Фигура 27). В това родословие една и съща мутация води до сравнително късно начало след 35 годишна възраст при всички засегнати индивиди, но се проявява с различна клинична симптоматика: само сърдечно засягане или сърдечно с невромускулно засягане в рамките на една фамилия.

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

Двете български деца с конгенитална форма мускулна дистрофия също представляват интерес от гледна точка на генотип – фенотипните интерпретации. И двете мутации са нововъзникнали при индексните пациенти. Едната попада в екзон 4 (rod domain coil 1) p.Arg249Trp, а другата в горещия екзон 6 за missense мутации (rod domain coil 2) p.Glu358Lys. И при двете деца се наблюдава изключително тежка клинична симптоматика с начало в ранна детска възраст, тежко невромускулно засягане и невъзможност за самостоятелно ходене. Мутации в същите тези региони и позиции много близки до засегнатите при тези две деца, са свързани с доста по-лек ход на заболяването с късно начало и бавна прогресия, както в нашата извадка, така и публикувани в световната литература. Понастоящем, тези две мутации са докладвани и при други пациенти с конгенитална мускулна дистрофия или миопатия с ранно начало, много бърза прогресия и тежко сърдечно засягане водещо до ранна смърт около средата на третата декада [www.dmd.nl/LMNA]. Не е възможно да се предположи защо този тип missense мутации причиняват толкова тежка клиника с ранно начало при положение, че невромускулните ламинопатии са като цяло заболявания с късно начало.

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



**Фигура 27.** Родословно дърво на българско семейство с ЕДМД/дилатативна кардиомиопатия. Поколенията са посочени в ляво с римски цифри. Индексните пациенти са посочени със стрелки. Наблюдава се вътрефамилна клинична вариабилност от чиста форма на дилатативна кардиомиопатия (CMD, cardiomyopathy dilated), през смесен тип невромускулно/сърдечно засягане (CMD/EDMD) до чисто невромускулно засягане (EDMD, Emery-Dreifuss muscular dystrophy).

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

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

Докладваната честота на транзиции и трансверзии в човешкия геном показва, че транзициите са много по-чести от трансверзиите [Cooper and Krawczak, 1990]. Възможно

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

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

Ако се разгледа мутабилността на динуклеотидно ниво се получава следният ред: CG>GC>GG>AC=CA>TC=CC=GA=AT=AA>GT [Todorova et al., 2006]. Както се очакваше CG динуклеотидът беше най-често засегнат [Cooper and Krawczak, 1990]. Интересно е да се отбележи, че някои динуклеотидни комбинации като AG, TG, TT, CT и TA, които представляват 31% от възможните комбинации, не бяха открити в мутационни събития [Todorova et al., 2006].

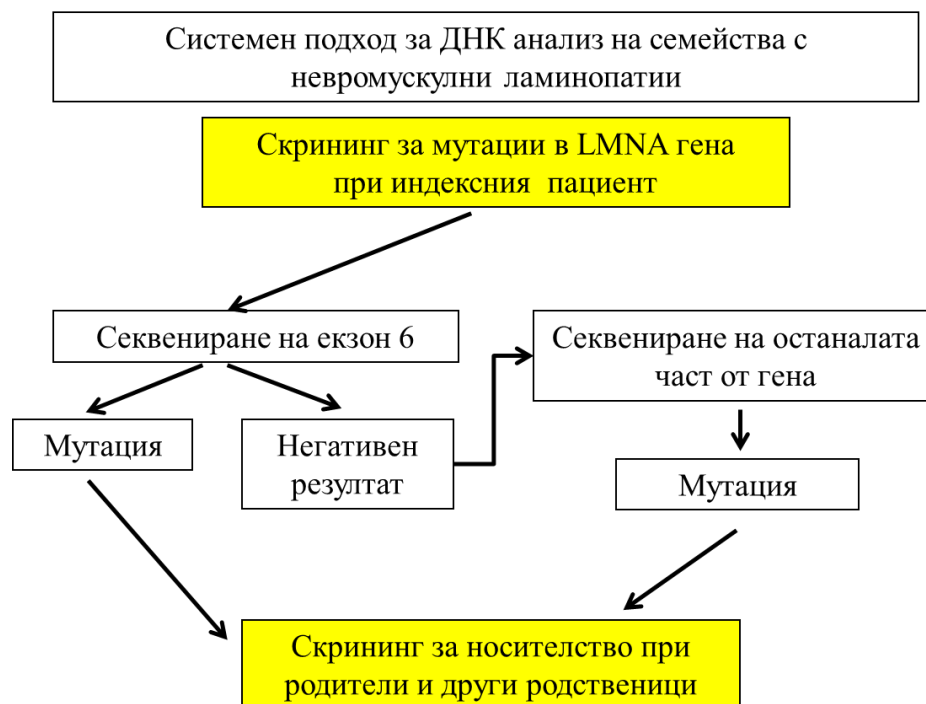
Във висок процент от случаите (~44%) новоинкорпорираният нуклеотид е идентичен на 5' или 3' фланкиращ нуклеотид(и). Тези случаи могат да се обяснят с модела за неправилно сдвояване по време на ДНК репликацията [Kunkel and Alexander, 1986].

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

Интересна находка в нашите проучвания по онова време беше получена при анализирането на мутантните триплети с по един допълнителен нуклеотид в позиция 5' и 3' от триплета (общо 5 нуклеотида). Оформиха се две секвенционни групи, които преимуществено мутират: (1) CG – богата група, която включва аргининовите кодони CGC и CGG и (2) (C/G)A(A/T)CA група [Todorova et al., 2006]. Важно е да се отбележи, че 53% от missense мутациите, които анализирахме по онова време заменяха аминокиселината аргинин. От 6-те

кодона в човешкия геном, които определят аминокиселината аргинин само CGC и CGG (в един случай CGT) участват в мутационни събития в *LMNA* гена, като всички случаи влизат в състава на CG – богата пентануклеотидна последователност [Todorova et al., 2006]. Възможно е тези нуклеотидни сегменти да участват във формирането на специфични вторични структури, които имат отношение към мутагенезата.

**Системният подход** за молекулярно генетична диагностика на ламинопатии (успеваемост 71%) включва секвениране на екзон 6 като първа стъпка, последвано от цялостно секвениране на *LMNA* гена при всеки конкретен пациент (Фигура 28).



**Фигура 28.** Системен подход за ДНК анализ на семейства с невромускулни ламинопатии.

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

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

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

Първите опити за диагностика на FXS чрез анализ на експанзията в *FMR1* гена започнах в колаборация с екипа на проф. Jurgen Horst, University of Muenster, Germany. Първите български пациенти бяха изследвани в Германия през 2003-2004 година посредством Southern blot и последваща хибридизация с радиоактивно маркирана с P<sup>32</sup> сонда, златен стандарт в диагностиката на експанзии по онова време. Тази техника обаче, страдаше от съществени

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

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

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

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

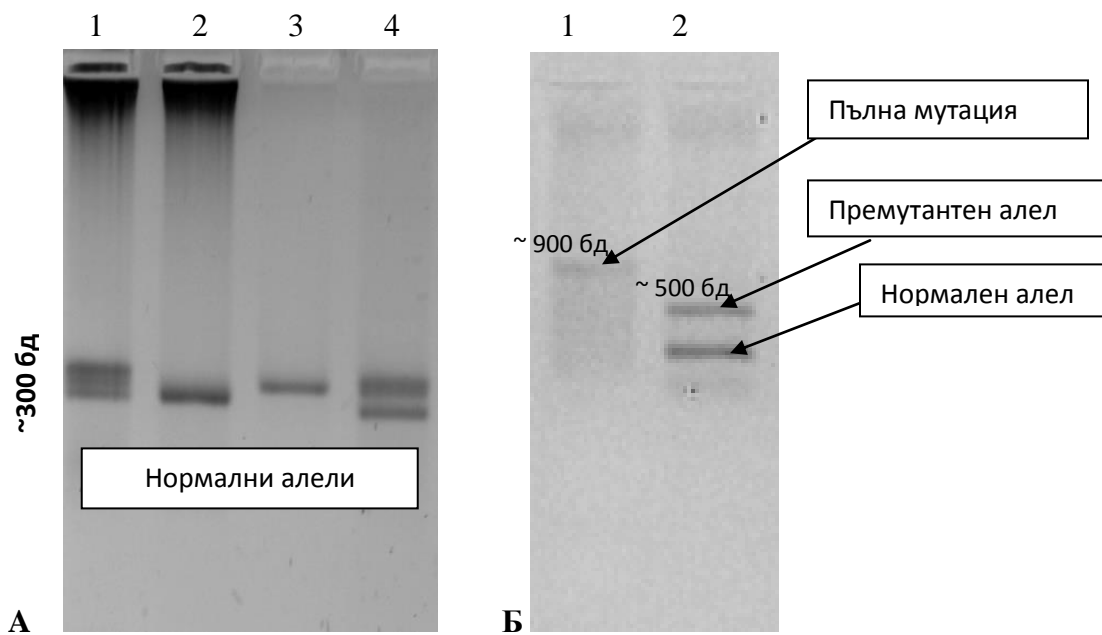
Резултатите от тази амплификация в присъствие на висока концентрация бетаин (2.5M) се визуализират чрез агарозна електрофореза и последваща детекция с етидиев бромид. На този етап се оценява дали амплификацията е била успешна и грубо може да се прецени размерът на получените амплификационни продукти (Фигура 29).

В следствие за по-точно оразмеряване на получените фрагменти, амплификационните продукти бяха анализирани и чрез капилярна електрофореза на ABI310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) (Фигура 30).

Предимство на разработения от нас диагностичен протокол за намножаване CGG повтора в промоторната област на *FMR1* гена е неговата бързина на изпълнение и изключителна надеждност при амплификация на фрагменти до около 150 CGG повтора. Този бърз тест, разработен като скринингов метод позволява получаване на резултат в рамките на 24 часа. Протоколът не изисква анализ на контролни проби заедно с анализираната проба, тъй като всеки получен амплификационен продукт се оразмерява директно чрез използването на

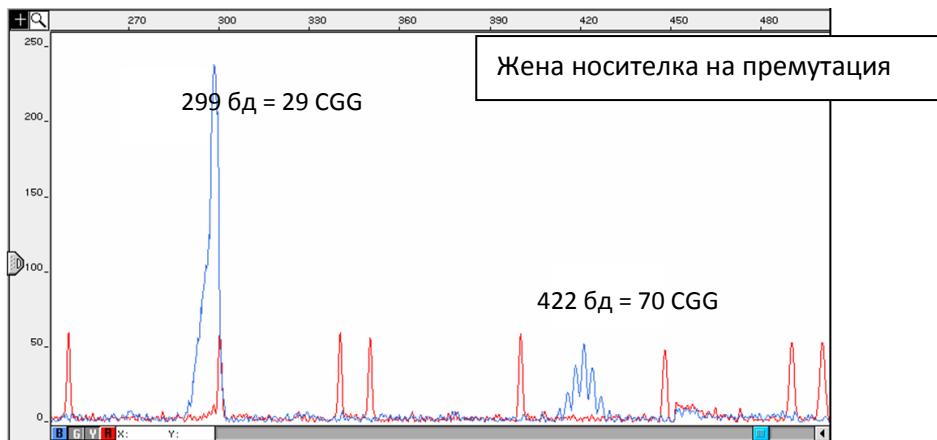
вътрешен стандарт ROX500 (Applied Biosystems) и специфичен софтуер GeneScan v.2.1. или GeneMapper v.4.0. Полученият амплификационен фрагмент в базови двойки (бд) се преизчислява в брой повтори съгласно разработените от нас калкулации (Таблица 6).

Разработването на тази методика беше истинско предизвикателство, тъй като размножаването на такива огромни CG-богати региони от човешкия геном не е лесна работа. Получените резултати бяха изключително обнадеждаващи и задоволителни от диагностична гледна точка. Себестойността на този вид анализ е най-ниска в сравнение с гореописаните техники. Друго много съществено предимство е използването на много малко количество ДНК – 200 ng, за разлика от класическите методи на Southern хибридизация, където са необходими 5-10 µg ДНК. Това предимство прави метода приложим и за целите на пренатална диагностика.



**Фигура 29.** Електрофоретични профили на PCR продукти на CGG повтора в *FMR1* гена: (А) Здрави жени носители - 1; 4; здрави момчета - 2; 3 и (Б) болно момче – 1; жена носителка на премутация - 2. Дължината на фрагментите е определена спрямо молекулен стандарт с известни размери на фрагментите, който не е представен на фигурата.

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



**Фигура 30.** Електрофоретични профили на PCR продукти на CGG повтора в *FMR1* гена, анализирани чрез капиларна електрофореза. Сините пикове представляват фрагментите от амплифицирания CGG повтор, а червените пикове - молекулен стандарт, спрямо който се извършва оразмеряването на фрагментите. Премутантни експандирани алели, които представляват мозайка от фрагменти, различаващи се с по един тринуклеотид, се детектират като поредица от пикове както се вижда от профила на премутантния алел 70 CGG повтора.

**Таблица 6.** Изчисления на CGG повторите спрямо размера на амплификационните продукти в базови двойки (бд).

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

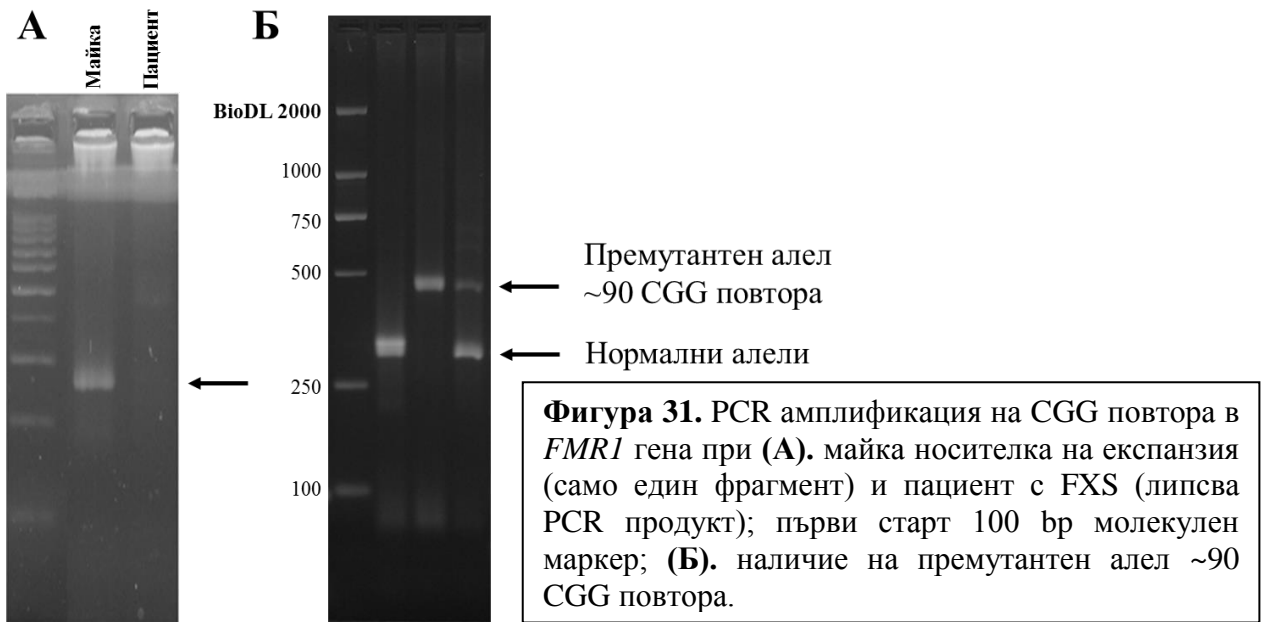
\*Константният регион е 212 бд.

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

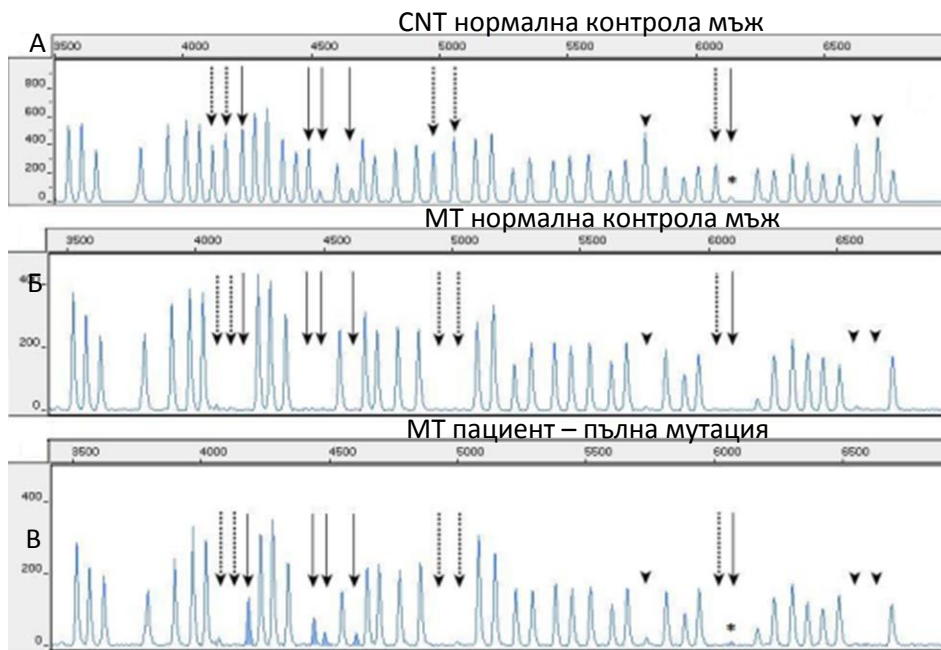
Методът позволява бързо и сравнително евтино да се анализират индиректно много големи CGG експанзии, водещи до хиперметиране, които не могат да се амплифицират с PCR. Това го прави подходящ метод за комбиниране с PCR амплификацията, при изясняване генотипа на всеки конкретен пациент. Голямо предимство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

След като бяхме готови в технологично отношение да изследваме CGG експанзията в *FMRI* гена, започна рутинната молекулярно-генетична диагностика на FXS у нас. За изминалите 9 години бяха насочени 127 деца с предполагаема клинична диагноза FXS. Водеща клинична находка при всички момчета от тази група е липсващ или забавен говор. Интелектуалното развитие при всички момчета е забавено, като в тази група се срещат широки вариации в степента на умствено изоставане: от тежка (IQ=20-34) до гранична (IQ=70-80). Тези вариации в степента на интелектуалния дефицит се дължат на наличието на пациенти с чисто аутистично поведение и дискретни или липсващи синдромни изменения, които се подлагат на скрининг за FXS по-скоро с цел изключване на тази диагноза. При по-голяма част от пациентите от изследваната група са налице дисморфични лицеви характеристики, като характерните за тази диагноза са: големи ниско разположени ротирани назад ушни миди, удължено лице, високо чело, големи раздалечени зъби, високо небце, коси очни цепки, екстравертирани ноздри и др. Поведенческите отклонения не са характерни за всички пациенти от изследваната група. В някои случаи се наблюдава аутистично поведение и избягване на очен контакт. В други случаи децата проявяват хиперактивност и са склонни към агресия. Забавяне във физическото развитие също не е характерно за всички пациенти от изследваната група - наблюдава се при 6 пациента: висока несъразмерна фигура с удължени ръце и крака, хипертрофия на прасците, мускулна хипотония, забавена възможност за самостоятелно седене (около 9 м. – 1 г.), самостоятелно прохождение (1 г. 6 м. – 3 г.). При 4 от изследваните момчета са налице епилептични припадъци или единични гърчови епизоди. Родителите на децата от тази група често свързват появата на патологичната симптоматика с прекарано тежко заболяване като коклюш, пневмония, рецидивиращи отити и др. Често родителите споменават прекарани инфекциозни заболявания, като причина за последващ регрес в развитието на техните деца.

Всички пациенти от изследваната група и техните майки бяха подложени първо на PCR амплификация с описания бетаин обогатен протокол. В допълнение всички пробанди бяха изследвани и с MS-MLPA за оценка на хиперметиране в промоторната област на *FMRI* гена и детекция на делеции/дупликации в този ген. При липса на амплификационен продукт в зоната на нормалните CGG повтори (Фигура 31А), MS-MLPA анализът показва хиперметиране в промоторната област на *FMRI* гена (Фигура 32), което потвърждава диагноза FXS. При майките на тези пациенти с PCR се установява наличие само на един нормален CGG фрагмент (Фигура 31А), като понякога се детектират и премутантни алели (Фигура 31Б).



Детекцията на CGG експанзия във *FMR1* гена вече не беше непосилна задача. От изследваните 127 неродствени пациенти при 14 (11%) беше установена патологична експанзия на CGG повтора в *FMR1* гена и диагнозата беше верифицирана на молекулно ниво. Резултатите са представени в Таблица 7.



В три семейства имаше по две засегнати деца, като и в трите случая бяха установени различни комбинации на експандирали CGG фрагменти (виж Таблица 7). В един от случаите

освен пълна мутация беше открита и делеция в посока 5' от CGG повтора в промоторната област, която най-вероятно няма отношение към диагнозата. Мозаечен генотип беше установен в 7 неродствени семейства, което показва, че при 50% от детектираните случаи пълната мутация е в комбинация с премутантни алели (5 случая) и дори с нормални алели (2 случая). Последната комбинация на нормални алели с пълна CGG експанзия в мозаечен генотип не беше съобщавана в литературата до 2007 г, когато ние открихме такава находка при първия български пациент с верифицирана диагноза FXS на генетично ниво. Този случай на мозайка нормален алел/пълна мутация беше описан подробно в *BMJ Case Report* [Todorov et al., 2009] и е представен по-надолу в текста. Резултатът от PCR анализа в конкретното семейство беше нетипичен: при майката беше установено наличие на един нормален алел 29±1 CGG повтора, а при болното момче беше визуализиран също нормален CGG повтор в зоната на нормалните фрагменти, но с три CGG повтора по-тежък (32±1 CGG) от нормалния фрагмент на майката (Фигура 33А). Резултатът беше потвърден чрез PCR/Southern хибридизация (Фигура 33Б).

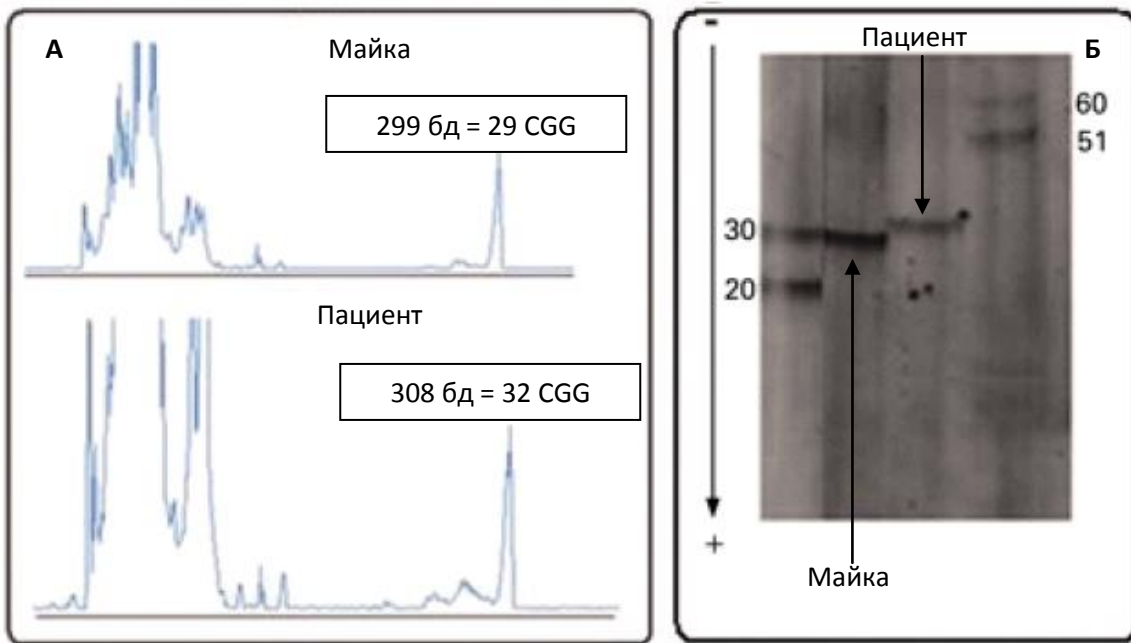
**Таблица 7.** CGG фрагменти в генетичния профил на пациенти с FXS.

Номер	CGG фрагменти в генетичния профил на пациента		Генотип
1	нормален фрагмент		пълна мутация
2			пълна мутация
3			пълна мутация
4		премутация	пълна мутация
5		премутация	пълна мутация
6	нормален фрагмент		пълна мутация
7			пълна мутация
8А	нормален фрагмент		пълна мутация
8Б		премутация	пълна мутация
9А		премутация	пълна мутация
9Б			пълна мутация
10А			пълна мутация
10Б		премутация	пълна мутация
11			пълна мутация
12			пълна мутация
13			пълна мутация
14			делеция 5' от CGG повтора*

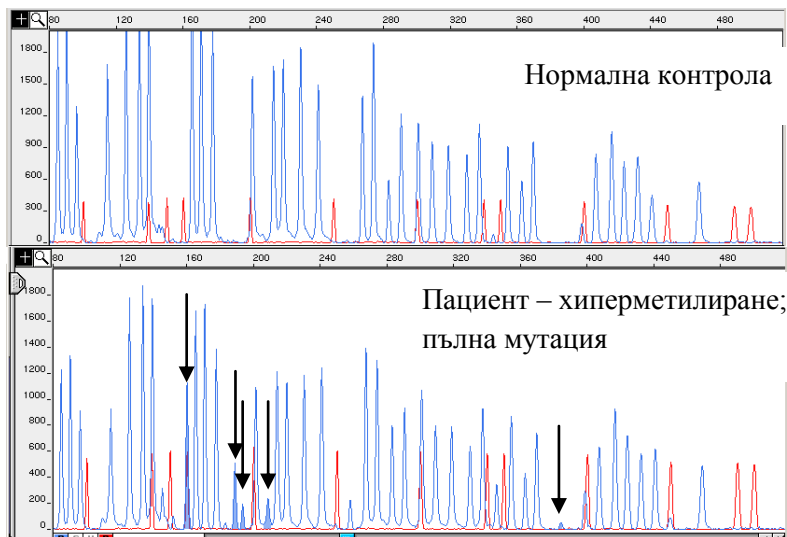
А и Б – засегнати братя

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

MS-MLPA анализът при пациента показва хиперметиране в промоторната област на *FMRI* гена (Фигура 34). Единственото възможно обяснение беше, че сме се натъкнали на мозаечен генотип от нормален фрагмент и пълна мутация. Резултатът от молекулярно-генетичния анализ напълно съвпаднаше с наблюдаваната лека клинична симптоматика при този пациент, което най-вероятно се дължеше на наличието на нормален CGG алел в клетките на централна нервна система. Пациентът беше с интелектуален дефицит от ранна детска възраст, но без физически отклонения и лицев дисморфизъм. Нямаше забавяне в говора, но речевия състав беше доста ограничен.



**Фигура 33 (А).** Капилярна електрофореза на PCR продукт на CGG повтора в *FMR1* гена. **(Б).** PCR/хибридизация по Southern на CGG повтора в *FMR1* гена.



**Фигура 34.** MS-MLPA профил на FXS пациент. След рестрикция с чувствителна към метилиране рестриктаза *Hha* I при пациента се наблюдава хиперметириране на промоторната област на *FMR1* гена, което съответства на пълна мутация. Хиперметирираните фрагменти са посочени със стрелки; при нормална контрола тези фрагменти липсват тъй като са неметирирани и се срязват от чувствителната по отношение на метилиране рестриктаза.

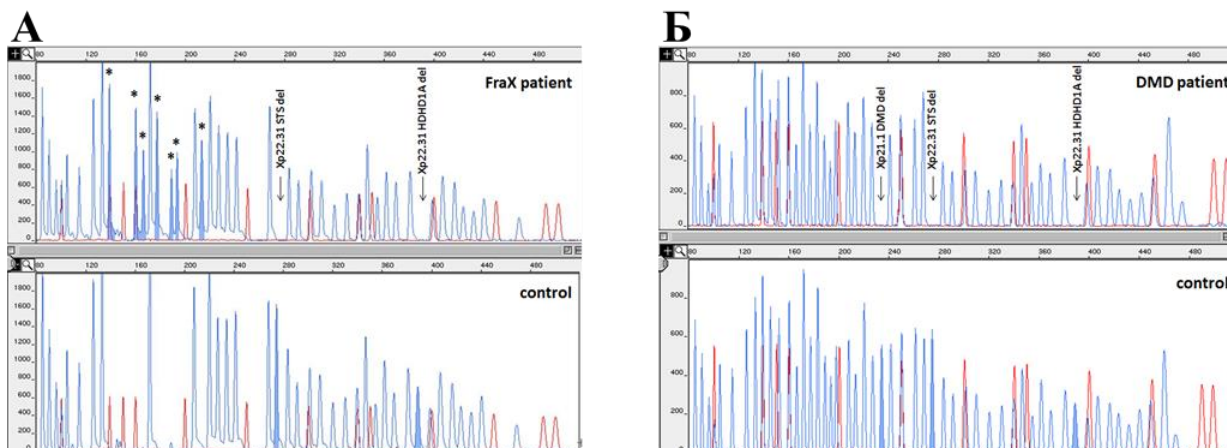
По наше мнение, мозаечният модел на нормален алел с пълна мутация е резултат от унаследяване на майчиния нестабилен премутантен алел, като най-логичният механизъм за възникване на нормалния алел е делеция (регресия) на пълната мутация в рамките на самия CGG повтор, тъй като използваните от нас PCR праймери бяха дизайнирани във фланкиращите региони на повтора [Nolin et al., 1994; Mila et al., 1996; Schmucker & Seidel, 1999; Grasso et al., 1999]. През 2009 г., когато публикувахме този случай, в световната литература имаше само един публикуван случай на регресия на майчина премутация до

нормален алел, което води до напълно здраво момче [Tabolacci et al., 2007]. Беше изказано предположението, че тези случаи може да не са толкова редки в природата, но те остават практически неизвестни поради липса на клинична симптоматика.

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

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

Молекулярно-генетичният анализ при засегнатите момчета беше проведен с помощта на специфичните MLPA китове за гените *FMRI* и *DMD*. При по-големия брат беше доказана пълна CGG експанзия и хиперметиране в промотора на *FMRI* гена, което потвърди предполагаемата диагноза FXS (Фигура 35А). При по-малкото момче с мускулно засягане беше установена делеция в *DMD* гена (Фигура 35Б), която по-късно беше доизяснена на молекулно ниво със специфичния за *DMD* гена MLPA кит: del45-50 (с.6439-?\_7309+?del), което нарушава рамката на четене на генетичната информация и потвърждава клинична диагноза мускулна дистрофия тип Дюшен. В допълнение, при двете момчета беше установена делеция в региона Xp22.31, където попадат гените *STS* и *HDHD1A*, свързани с ихтиоза (Фигура 35А и Б).



**Фигура 35.** MLPA анализ в семейство с две засегнати деца с различна клинична симптоматика. (А). MLPA профил при пациента с FXS; (Б). MLPA профил при пациента с ДМД. И при двамата пациенти се наблюдава делеция на гените *STS* и *HDHD1A*, свързани с ихтиоза.



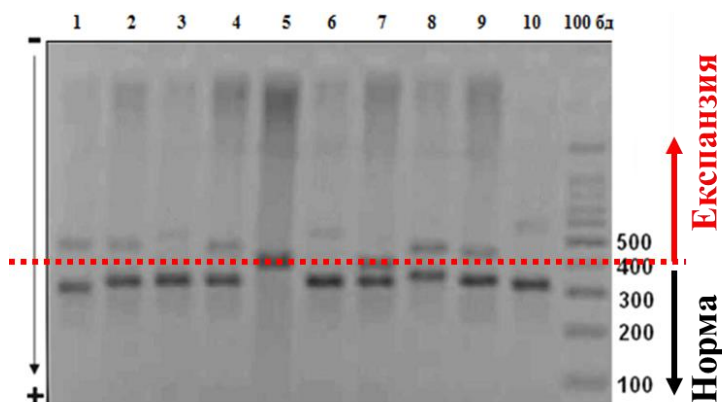
Едно от последствията при рекомбинации на генетично ниво е елиминиране на мутации от генома. Двете рекомбинационни събития в Хр региона, фланкиращи *DMD* гена, могат да се разглеждат като опит за „поправка“ на делетирания алел.

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

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

PCR протоколът, който разработихме с висока концентрация на бетаин 2.5М е подходящ за скринингови цели при жени за оценка на носителски статус, защото нормалните алели и премутациите се детектират успешно в хода на амплификационния анализ и агарозна електрофореза с визуализация етидиев бромид (Фигура 37). Зоната на премутациите е ясно отдиференцируема от нормалните фрагменти и само жени с предполагаем премутантен алел се анализират допълнително с капилярна електрофореза за точно оразмеряване на експанзията.

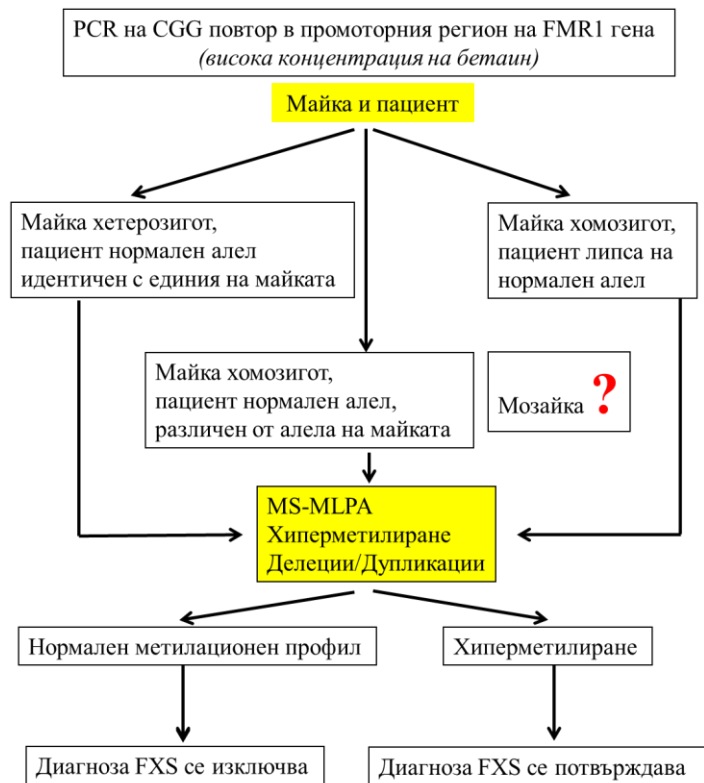
В допълнение MS-MLPA анализът е подходящ за скринингови програми при новородени момчета, тъй като открива само пълни мутации, свързани с клинична изява и изпуска премутациите, които в повечето случаи нямат клинична симптоматика на FXS.



**Фигура 37.** Агарозна електрофореза на амплифициран CGG повтор в *FMR1* гена при жени носителки на премутация. Генотиповете на представените проби, предварително оразмерени с капилярна електрофореза и използвани като контроли в хода на разработката на скрининговия метод са: 1- 21/74 CGG; 2-25/75 CGG; 3-29/~90 CGG; 4- 29/70 CGG; 5-50/56 CGG; 6-26/~90 CGG; 7- 29/50 CGG; 8-35/67 CGG; 9-29/62 CGG; 10- 28/~100 CGG.

Успеваемостта на молекулярно-генетичната диагноза FXS понастоящем е около 11%. Този нисък процент генетично верифицирани случаи се дължи на смесения характер на изследваната група пациенти, в която попадат голям брой деца с чисто аутистично поведение, насочени по-скоро за изключване, отколкото за потвърждаване на диагноза FXS.

**Системният подход** за анализ на семейства с FXS е представен на Фигура 38.



**Фигура 38.** Системен подход за анализ на семейства с предполагаема клинична диагноза FXS.

### 2.2.2. СИНДРОМ НА RETT, RTT

За разлика от разглежданите до тук заболявания, които бяха моногенни, синдром на Rett се асоциира с мутации в повече от един ген и генни локуси. Молекулярно-генетичната диагностика от технологична гледна точка при синдром на Rett не е предизвикателство, базира се на секвениране на ген/и и MLPA анализ за детекция на копийни варианти. Истинско предизвикателство при молекулярно-генетичната диагностика на синдром на Rett и атипичните форми на синдрома е да се насочим към най-вероятния ген за дадената клинична диагноза. От особена важност в случая, за успеха на молекулярно-генетичната диагностика е подробното и точно клинично описание на пациента и интердисциплинарния подход (клиницист и генетик) при всеки конкретен случай.

За изминалия период от 9 години (2007-2015) изследвахме 98 момичета с клинична диагноза RTT, които бяха разпределени в две групи на базата на клиничната симптоматика: с класически Rett синдром и с атипичен Rett синдром [Тодоров, 2011, докторска дисертация]. В зависимост от наличие или отсъствие на епилепсия тези две групи бяха допълнително разделени на пациенти с епилепсия и пациенти без епилепсия [Киров, 2013, докторска дисертация]. Степента на умствено изоставане при пациентите с Rett синдром варира от лека (IQ=50-69) до много тежка (IQ<20). Заболяването при всички представени случаи има прогресиращ характер. Началото на заболяването варира между първите месеци след раждане и 3 годишна възраст. При всички изследвани случаи липсват говорни умения и се наблюдава загуба на социален контакт. Друга характерна особеност при всички засегнати деца от тази група е наличието на стереотипни движения на ръцете, симптом на „миеши ръце“ и краката. Моторното развитие при тези деца е също тежко засегнато. Наблюдава се мускулна хипотония, забавен растеж на главата, клатещо се нестабилно тяло или ходене на пръсти, сколиоза. В някои случаи самостоятелното придвижване е невъзможно. Гърчове и

епилептични припадъци са регистрирани при 41 пациента. Лицев дисморфизъм (микроцефалия) се наблюдава при около 1/4 от изследваните момичета. Всички деца от изследваната група не контролират тазови резервоари. Появяват се дихателни проблеми. Наблюдават се проблеми в циркулацията, които водят до студени, посиняли крака и ръце. В допълнение се забелязват гастроинтестинални проблеми, включващи тежък гастроезофагиален рефлукс. Налице е обилно слюнкоотделяне.

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

Молекулярно-генетичните изследвания при пациенти с RTT започват с PCR/секвениране на *MECP2* гена. При негативен резултат се преминава към MLPA анализ за търсене на големи делеции и дупликации по дължината на *MECP2* гена. При изследване на момичета за гени от X хромозомата обаче, интерпретацията на резултатите е комплицирана, поради наличието на две копия от X хромозомни гени. Делеция при пациент от женски пол се детектира като наполовина намален пик(ове), спрямо този/тези при контролата. Наличието на дупликация се детектира като по-висок пик(ове) от този/тези при контролата.

Прецизната интерпретация на резултатите изисква извършването на математически калкулации за количествена оценка на получените генни фрагменти. За нашите цели най-подходящ се оказва следният математически алгоритъм:

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

съотношение около 1 – нормален резултат

съотношение <0.6 – делеция

съотношение >1.6 – дупликация

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

Резултатите от скрининга за мутации в *MECP2* гена са представени в Таблица 8. В изследваната група от 98 момичета открихме 15 различни типа мутации (виж Таблица 8). Диагнозата RTT беше потвърдена на молекулно ниво при 35 деца (36%).

Интересно е да се спомене, че всички екзонни нуклеотидни замени представляват транзиции на С към Т. Замяната, която нарушава сплайсинга с.27-8С>G е единствената трансверзия открита в нашата извадка. Всички транзиции засягат CpG динуклеотид, където 5-метилцитозин лесно се деаминира и преминава в тимин, пропуска се от поправящите системи и остава фиксиран в генома като патологична мутация (model of mutagenesis by methylation-mediated deamination in CpGs) [Kunkel and Alexander, 1986]. Три от мутациите са missense, заменят една аминокиселина с друга. И трите missense мутации засягат еволюционно консервативен остатък и са оценени като вероятно патогенни със скор за патогенност 1.000. Мутацията p.Thr158Met попада в домена, отговорен за свързване с метилиран регион (Methylation Binding Domain, MBD). Има данни, че мутантният протеин свързва само два пъти по-слабо метилирана ДНК в сравнение с дивия тип [Ghosh et al., 2008]. Данни от кръгов

дихроизъм показват, че вторичната структура на мутантния p.Thr158Met тип е сходна с тази на дивия тип, както в отсъствие, така и в присъствие на ДНК [Ghosh et al., 2008]. От друга страна обаче, температурната стабилност на MBD при мутантния протеин е съществено намалена в сравнение с дивия тип [Ghosh et al., 2008], което най-вероятно обяснява патологичната роля на този протеин. Въпреки че, механизмът на повлияване структурата и/или функцията на протеина при мутацията p.Thr158Met е доста неясен, се установява, че това е една от най-често съобщаваните мутации в *MECP2* гена [Ballestar et al., 2000]. Авторите предполагат, че този аминокиселинен остатък може да играе друга важна роля в белтъчната функция, като например може да участва във взаимодействия с домена, отговорен за потискане на транскрипцията (transcriptional-repression domain). В нашата група пациенти тази мутация е също най-честата находка (6/35=17%).

**Таблица 8.** Мутации в *MECP2* гена при пациенти с диагноза Rett синдром.

№	Екзон	Нуклеотидна замяна	Аминокиселинна замяна	Брой пациенти
1	4	c.473C>T	p.Thr158Met	6
2	4	c.763C>T	p.Arg255*	5
3	4	c.808C>T	p.Arg270*	4
4	4	c.880C>T	p.Arg294*	2
5	4	c.916C>T	p.Arg306Cys	3
6	4	c.1157_1200del144	p.Leu386Glnfs*4	1
7	4	c.1157_1197del41	p.Leu386Glnfs*5	1
8	4	c.502C>T	p.Arg168*	4
9	int2	c.27- 8C>G	Splice-site	1
10	4	c.806delG	p.Gly269Alafs*20	1
11	3	c.316C>T	p.Arg106Trp	2
12	4	c.819delG	p.Ser274Valfs*15	1
13	3-4	c.27-?_*?del*	Делеция екзон 3 и част от 4	2
14	4	c.[584_624del41insTT; 638delTinsCA]	Indel (frameshift)	1
15	3	c.321insGAAG	p.Lys107fs*4	1

\*-стоп кодон; int - интрон

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

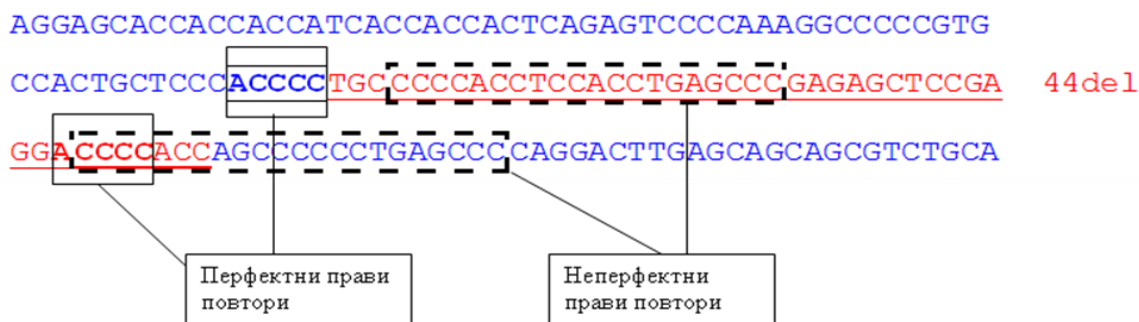
Третата missense мутация p.Arg306Cys се намира в домена, отговорен за подтискане на транскрипцията (transcriptional-repression domain), но за момента няма доказан ефект върху белтъчната функция, въпреки че патогенната ѝ роля е безпорна, тъй като е отново една от

често срещаните мутации при RTT пациенти. В нашата извадка тя е открита при трима пациенти (3/35=9%).

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

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

Освен точкови мутации открихме и друг тип дефекти в нашата извадка, като малки делеции, инсерции и комплексни мутационни събития. Делецията на 44 бази с.1157\_с.1200del44 причинява разместване на рамката на четене на генетичната информация и по този начин води до преждевременно прекратяване на белтъчната синтеза. Свързана е с тежка клинична изява на заболяването. Интересно е да се отбележи, че тази делеция попада в един от делеционните „горещи региони” за *MECP2* гена, като в този регион са докладвани делеции на 41, 44, 46 и 70 нуклеотида, както и комплексни мутационни събития като indels [De Vona et al., 2000; Lee et al., 2001]. Ние също открихме втори пациент с делеция в този регион, покриваща 41 нуклеотида (с.1157\_1197del41), която също е свързана с тежка клинична изява на заболяването. По отношение на клиничната изява на тези мутации е важно да се отбележи, че „preserved speech variants” с подобна на RTT клиника също се дължат на делеции на 41 и 44 нуклеотида точно в този регион, което ги определя като алелни форми на класическия RTT [De Vona et al., 2000]. Фактът, че в горещия делеционен регион се случват *de novo* единотипни мутационни събития, предполага участие на околната секвенция (микросреда) в провокирането на молекулните дефекти. Задълбоченият анализ на околната секвенция, фланкираща делециите в този регион, показва наличието на директни (прави) повтори, които биха могли да провокират приплъзване на полимеразата в хода на репликацията [De Vona et al., 2000]. Микросредата, в която се случва нашата делеция на 44 бази е представена на Фигура 39. Наличието на перфектни и неперфектни директни (прави) повтори в двата фланга на делецията предполагат репликационни приплъзвания на полимеразата, последвани от неточни срязвания и/или снаждания като най-вероятен механизъм за възникване на мутацията.

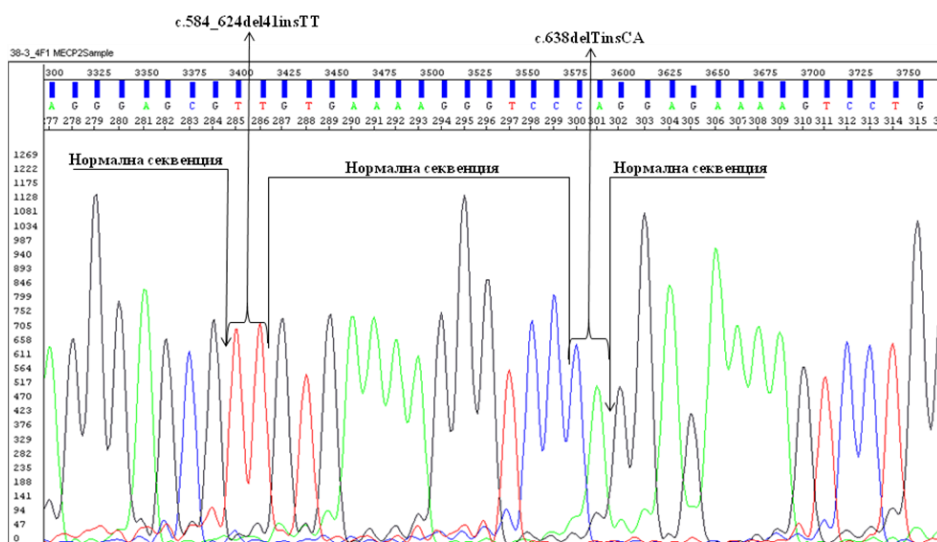


**Фигура 39.** Анализ на околната секвенция в *MECP2* гена в непосредствена близост до 44бд делеция. Делетираните бази са представени в червено. Перфектните и неперфектни прави повтори са оградени.

Друга интересна находка, на която попаднахме в хода на молекулярно-генетичната диагностика на RTT пациенти е комплексно мутационно събитие – комбинация от две инсерции/делеции (indels) – с.[584\_624del41insTT; 638delTinsCA]. Полученият амплификационен профил при този пациент показваше два фрагмента – един нормален и един

по-лек. Секвенционният анализ показва неизвестен тип мутация, нарушаваща рамката на четене (frameshift). За потвърждаване на мутацията и прецизно идентифициране на мутацията полученият мутантен фрагмент беше екстрахиран от агарозния гел, ре-амплифициран и секвениран. Секвенционният анализ на едноверижния фрагмент идентифицира две независими делеционно/инсерционни мутационни събития (indels) в *MECP2* гена (Фигура 40). Това комплексно мутационно събитие беше първата находка от комплексен тип в този ген и имаше своя принос в световната литература [Todorov, Todorova et. al., 2012].

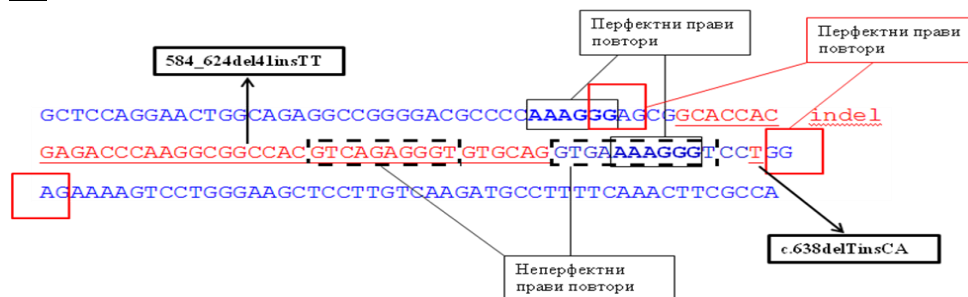
Двете мутационни събития в комплексния indel засягат един алел и най-вероятно са причинени от серия репликационни приплъзвания в права и обратна посока с участието на директни (прави) повтори [Chen et al., 2005]. Такива комплексни генни пренареждания, включващи множество делеционни и инсерционни събития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

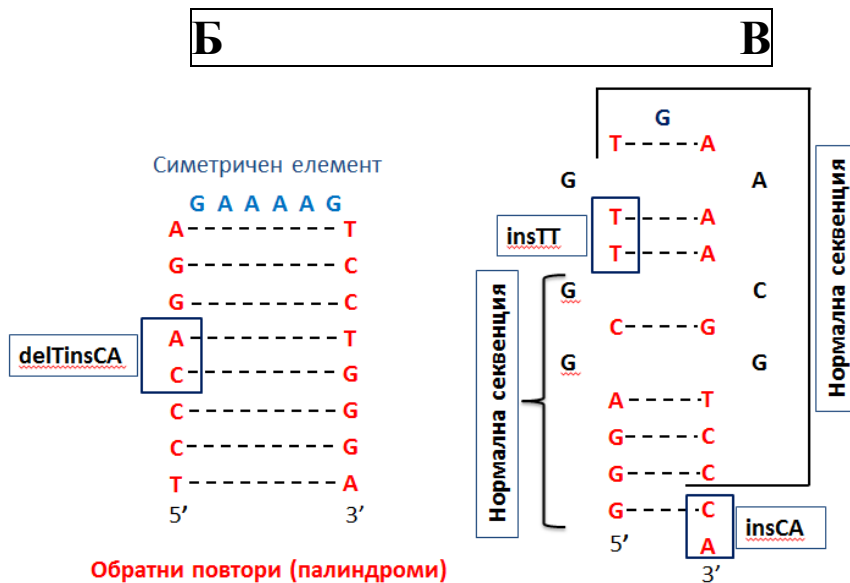


**Фигура 40.** Секвенционен профил на едноверижния мутантен фрагмент след екстракция от агарозен гел. Установява се комплексен мутационен профил върху един алел: c.[584\_624del41insTT; 638delTinsCA].

Опит за изясняване механизма на възникване на открития от нас комплексен indel е представен на Фигура 41А, Б, В. Задълбоченият анализ на околната секвенция показва наличието на перфектни и неперфектни директни (прави) повтори и перфектни и неперфектни палиндромы, заграждащи симетрични елементи, с чието участие се описва генерирането на комплексните мутационни преобразувания.

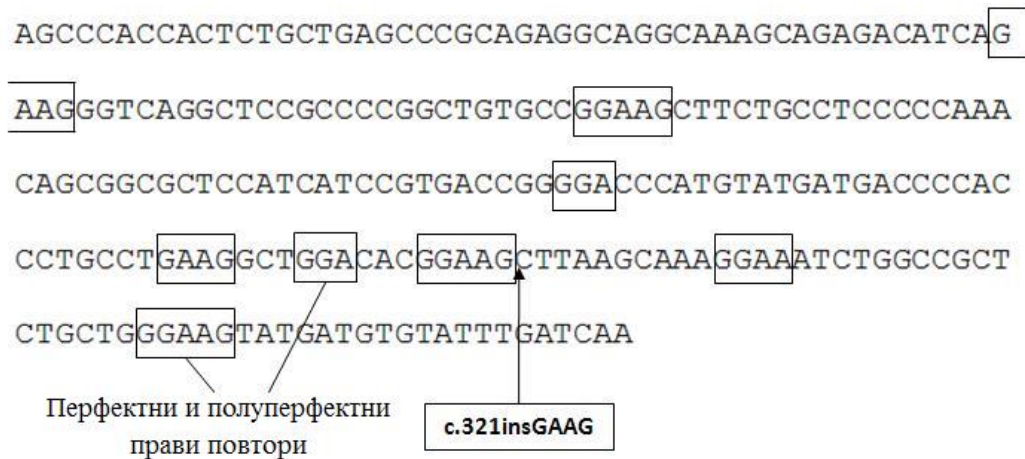
**A**





**Фигура 41. (А).** Анализ на секвенцията в непосредствена близост до района с комплексна делеция/инсерция в *MECP2* гена. Делетираните бази са представени в червено и са подчертани. Анализираният прави повтори са оградени. Обърнатите повтори (палиндромии), ангажиращи новоинсерираните нуклеотиди (оградени) са представени на два отделни панела (**Б и В**).

Друго интересно мутационно събитие, открито за пръв път при български пациент е инсерция на 4 бд с.321insGAAG, р.(Lys107fs\*4) в екзон 3 на *MECP2* гена. Клиничната диагноза при този пациент първоначално е била PWS, поради затлъстяване (с ясно изразена фамилна предиспозиция). Инсерираните 4 нуклеотида представляват интерес от научна гледна точка, тъй като генерират симетричен елемент GAAGGAAG, чрез повторение на мотива GAAG (Фигура 42). При задълбочения анализ на околната секвенция беше установено изобилие на (G)GA(AG) перфектни и полу-перфектни директни повтори, които биха могли да участват в неправилното сдвояване на веригите и приплъзване на полимеразата, завършващо с инсериране на GAAG мотив [Chen et al., 2005].



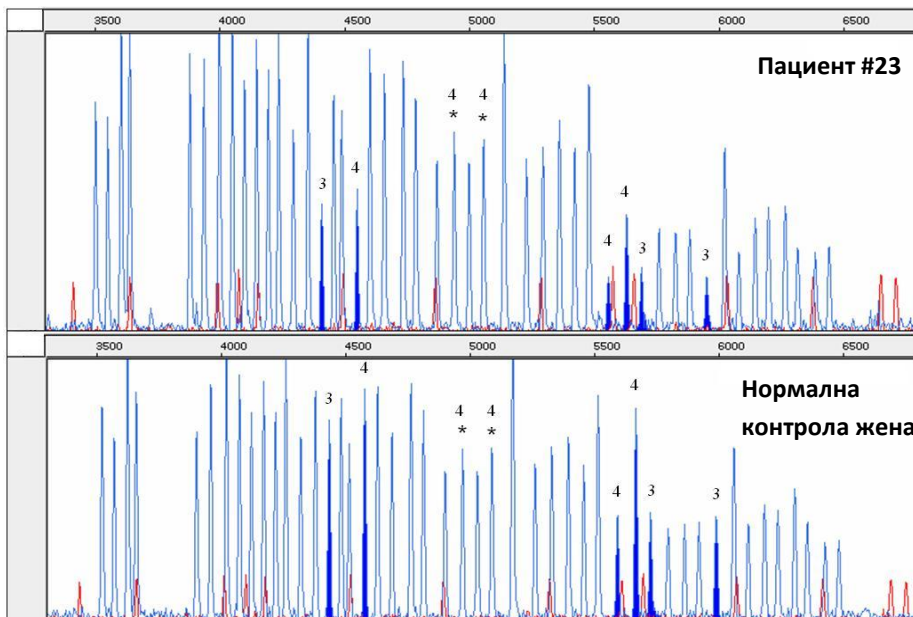
**Фигура 42.** Анализ на околната секвенция в района на 4 бд инсерция в екзон 3 на *MECP2* гена. Инсерираните нуклеотиди са заградени, както и наличните перфектни и полуперфектни прави повтори (G)GA(AG) в региона.

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

### Големи делеции в *MECP2* гена

MLPA анализът доведе до откриване на две идентични големи делеции покриващи целия екзон 3 и част от екзон 4 на *MECP2* гена (Фигура 43).

Резултатите от математическата обработка на делетираните фрагменти са представени в Таблица 9. Получените съотношения за всички делетиранни пикове показват стойности <0.6.



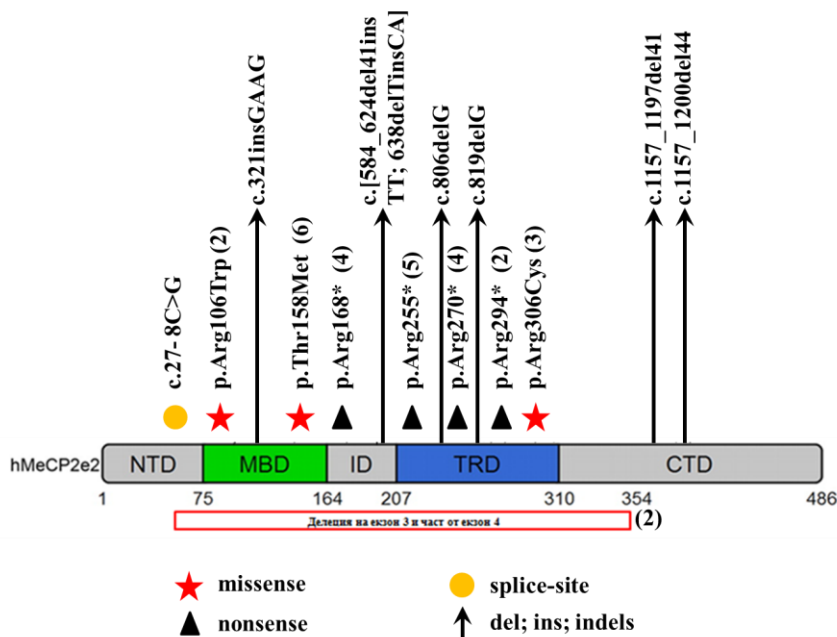
**Фигура 43.**

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

**Таблица 9.** Математическа обработка на данните от MLPA анализа

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

Локализацията на мутациите, открити при нашите пациенти е представена на Фигура 44. Анализът на данните показва, че мутациите са разпръснати по всички домени, като повечето са съсредоточени в двата най-важни функционални домена MBD и TRD.



**Фигура 44.** Локализация на мутациите в *MECP2* гена по дължината на белтъчните домени: N-краен домен (NTD), метил-ДНК свързващ домен (MBD), междинен домен (ID), подтискащ транскрипцията домен (TRD) и C-краен домен (CTD). \* - стоп-кодон мутация; в скоби до всяка мутация е показан брой пациенти, носители на съответната мутация.

### Генотип-фенотипни корелации

Поради широките вариации на клиничната картина при тази група пациенти, генотип-фенотипните корелации не са ясно изразени. Изследваните пациенти бяха разпределени в групи според класическите или атипични клинични критерии и присъствието или отсъствие на епилепсия (Таблица 10).

**Таблица 10.** Класификация на пациентите с RTT според клиничните критерии и присъствие или отсъствие на епилепсия.

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

По литературни данни епилепсия се наблюдава при 70% до 90% от пациентите с класически синдром на Rett [Cooper et al., 1998; Steffenbutg et al., 2001]. Въпреки това към момента според последната ревизия на критериите за RTT, епилепсията не участва в основните критерии. При нашите пациенти с класическа форма RTT този процент се оказва съществено по-малък  $27/47=57\%$ . Нашите резултати показваха, че пациентите с класическа форма на RTT и епилепсия два пъти по-често се асоциират с мутации в *MECP2* гена, отколкото пациентите с класически RTT без епилепсия, което съвпада с публикуваните данни

[Neul et al., 2010]. Епилепсията може да се счита за симптом, провокиран от нарушаване репресионната функция на MeCP2 протеина спрямо други гени. Това води до свръх-експресия на гени в невроните на ЦНС и до промяна в морфологията на невроните и синаптогенезата. Провокира се хиперактивност на мозъчните неврони и драстично снижаване на епилептичния праг.

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

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

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

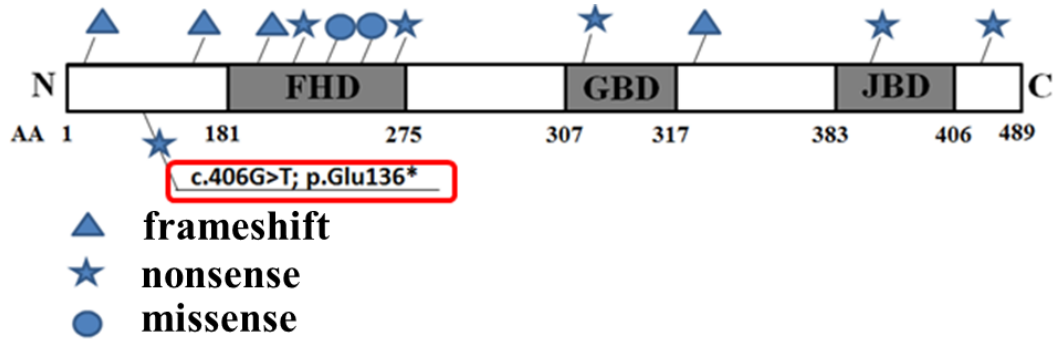
Всички открити мутации в изследваната група пациенти бяха проверени при техните родители. Резултатите показаха, че всички мутации са нововъзникнали при болното дете и не са унаследени от родителите. Тези резултати потвърдиха патологичния характер на откритите генни изменения.

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

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

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

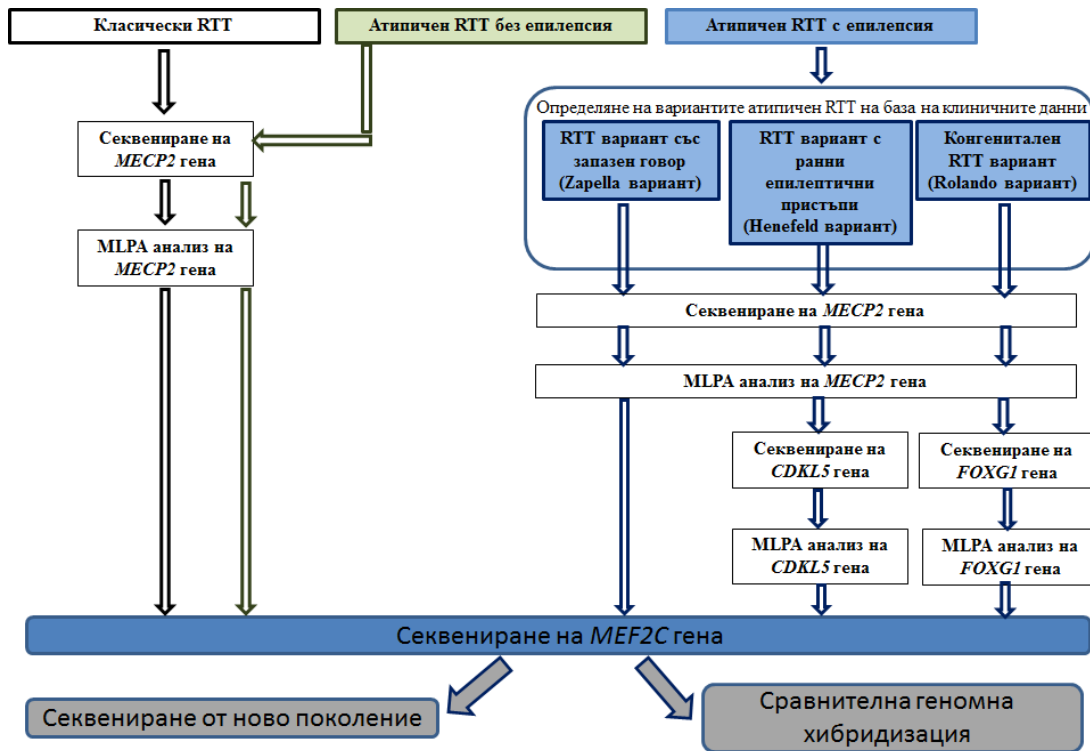
Следващият прицелен ген беше *FOXG1*, който съгласно клиничните критерии е подходящ за скрининг при пациенти с конгенитален (Rolando) RTT вариант. Особено специфични за този RTT вариант са следните клинични данни: тежка постнатална микроцефалия, регрес на 5 м.в. и начало на гърчове след начало на психомоторния регрес. Общо 9 пациента бяха подбрани от нашата извадка, като подходящи за скрининг на този ген. Благодарение на подробното и точно клинично описание, молекулярно-генетичната диагностика се увенча с успех. При един пациент беше открита непубликувана nonsense мутация в екзон 1 на *FOXG1* гена: с.406G>T; p.Glu136\*. Мутацията попада в N-терминалния домен на гена, който при прегледа на публикуваните данни от други автори се оказа, че е сравнително беден на мутации. На Фигура 45 са представени мутациите, които бяха налични към този момент в световната литература. В N-терминалния домен бяха открити преди това само 2 мутации нарушаващи рамката на четене на генетичната информация (frameshift) и стоп-кодон мутацията открита при българския пациент беше единствената по рода си в този регион.



**Фигура 45.** Схематично представяне на публикуваните до тогава мутации в гена *FOXG1*. Представени са функционалните белтъчни домени: ДНК-свързващ домен (DNA-binding forkhead domain - FHD), Gro-свързващ домен (Gro-binding domain - GBD) и KDM5B-свързващ домен (KDM5B binding domain - JBD). Аминокиселинната номерация (AA) е показана под домовете. Различните типове мутации са изобразени със символи. Българската мутация е оградена с червено.

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

Следвайки разработения системен подход за молекулярно-генетична диагностика на Rett синдром (Фигура 46), успеваемостта е 36%.



**Фигура 46.** Системен подход за молекулярно-генетична диагностика на пациенти с RTT. Секвенирането на *MECP2* гена е препоръчително да се извършва на 2 етапа:  
 1) секвениране на екзон 4 на *MECP2* гена, където попадат 91% от мутациите  
 2) секвениране на останалите екзони на *MECP2* гена

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

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

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

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

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

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

**Таблица 11.** Мутации в гените *PCDH19* и *CDKL5* при български пациенти с епилептична енцефалопатия с ранно начало.

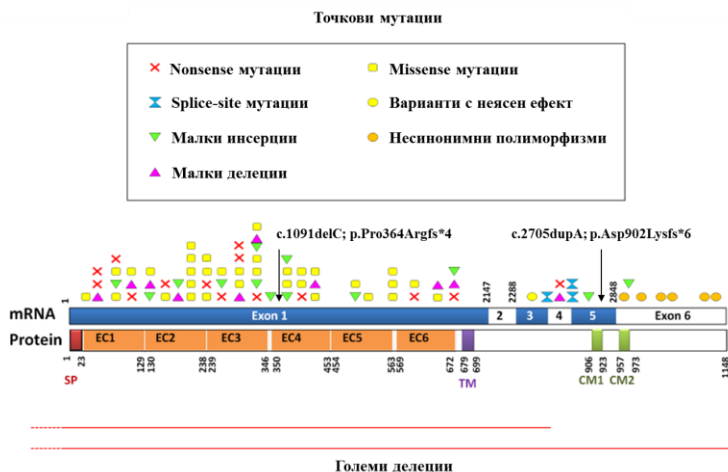
№	Диагноза	Ген	Нуклеотидна замяна	Ефект на ниво белтък
1	EIEE 9	<i>PCDH19</i>	c.2705dupA	p.Asp902Lysfs*6
2	EIEE 9	<i>PCDH19</i>	c.1091delC	p.Pro364Argfs*4
3	EIEE 2	<i>CDKL5</i>	c.539C>T	p.Pro180Leu
4	EIEE 2	<i>CDKL5</i>	c.825+1G>T	сплайсинг ефект

\*-стоп кодон

Мутацията c.2705dupA е локализирана в екзон 5 на гена, докато повечето съобщавани мутации до тогава бяха съсредоточени в екзон 1 [Jamal et al., 2010; Depienne et al., 2011]. На Фигура 47 представихме схематично известните до тогава мутации в *PCDH19* гена, заедно с откритите 2 мутации при нашите пациенти [Dimova et al., 2012]. Екзон 5 кодира двата цитоплазмични домена, които са силно консервативни еволюционно [Hynes et al., 2010; Jamal et

al., 2010] и там попадат много малко от известните мутации, включително и нашата c.2705dupA.

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



**Фигура 47.** Локализация на мутациите в *PCDH19* гена по литературни данни. Българските мутации са посочени със стрелки.

### Тест за носителство на *PCDH19* мутациите при родителите на болните деца

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

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

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

На базата на нашите резултати и резултати от други проучвания [Hynes et al., 2010; Marini et al., 2010; Depienne et al., 2011; Higurashi et al., 2012; Specchio et al., 2011] заключихме, че генът *PCDH19* е добър прицелен ген за изследване при спорадични случаи характеризиращи се с ранни епилептични гърчове и начало в детска възраст, изоставане в невро-психичното развитие, поведенчески отклонения и фебрилно-индуцирани гърчове при пациенти от женски пол.

Вторият ген, който изследвахме при пациенти с епилептична енцефалопатия с ранно начало беше генът *CDKL5*. Бяха открити две мутации в *CDKL5* гена: с.539C>T; p.Pro180Leu и с.825+1G>T (Таблица 11). Мутацията p.Pro180Leu заменя една аминокиселина с друга, което наложи нейната софтуерна обработка за оценка на патогенния ефект върху белтъчната функция. Мутацията засяга еволюционно консервативна аминокиселина и математическите модели показват сравнително висока вероятност за патогенност (MutationTaster: disease causing (p-value: 0.684). Друго доказателство за патогенния ефект на тази замяна върху белтъчната функция е локализацията на мутацията в каталитичния домен на протеина. Мутацията беше и публикувана като патогенна в базата данни Uniprot - UniProtKB/Swiss-Prot O76039.

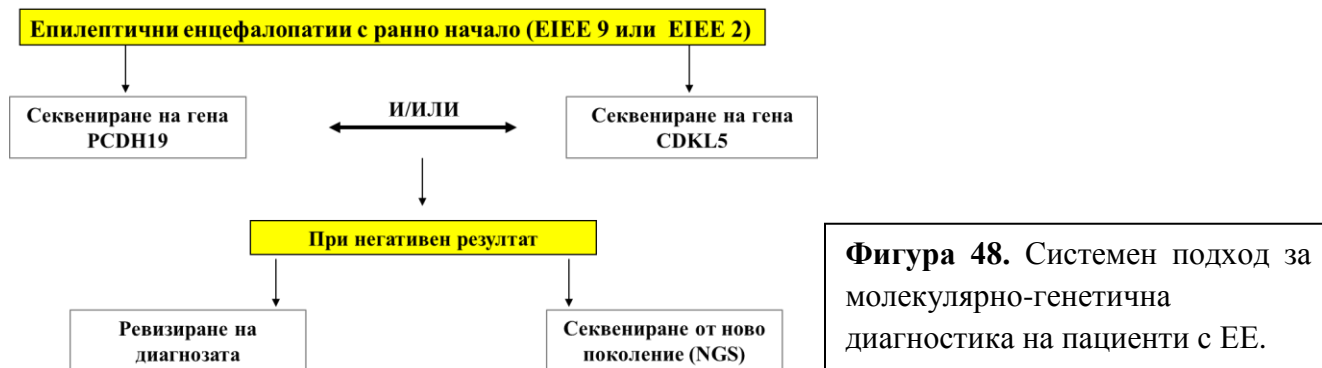
Втората мутация в *CDKL5* гена с.825+1G>T засягаше +1 позицията на консервативния донор сплайс-сайт и не се нуждаеше от допълнителни доказателства за патогенния ѝ характер. Тази мутация също попада в каталитичния домен на протеина и се очаква да има съществен патогенен ефект върху белтъчната функция.

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

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

Актуалният за момента **системен подход** е представен на Фигура 48. Общо 36% от ЕЕ с ранно начало бяха изяснени на молекулно ниво.

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



**Фигура 48.** Системен подход за молекулярно-генетична диагностика на пациенти с ЕЕ.

#### 2.2.4. СИНДРОМ НА DRAVET (DS)

Молекулярно-генетичната диагностика на синдром на Dravet следва стандартния ход на секвениране на *SCN1A* гена и последващ MLPA анализ за големи делеции и дупликации по дължината на гена [Йорданова, 2013, докторска дисертация]. За изминалия период от около 5 години бяха насочени 29 деца с предполагаема клинична диагноза DS, GEFS+ или MAE (миоклонична астатична епилепсия) за *SCN1A* скрининг. Мутации в гена *SCN1A* бяха открити при 9 деца. Резултатите са представени в Таблица 12. От таблицата прави впечатление, че групата е интернационална. От изследваните 29 деца 7 бяха от арменски произход и от тях при 5 диагнозата DS беше потвърдена на молекулно ниво (5/7=71%). За този висок процент изяснени арменски случаи заслугата е основно на насочващия невролог от Армения. Двадесет и едно деца от изследваната група бяха от български произход, но в тази група само при 3 диагнозата беше изяснена на молекулно ниво (14%). Един пациент с мутация в *SCN1A* гена беше от македонски произход. По отношение на половото разпределение, в нашата група от *SCN1A*-асоциирани случаи засегнатите пациенти бяха главно от мъжки пол, като съотношението момчета:момичета беше 3.5:1. Това съотношение се различаваше съществено от очакваното по литературни данни 2:1. Разликата най-вероятно се дължи на малкия брой генетично верифицирани случаи. При 8 от 9-те деца с мутации в *SCN1A* гена клиничната диагноза беше DS, а в един от случаите - MAE.

**Таблица 12.** Мутации в гена *SCN1A*.

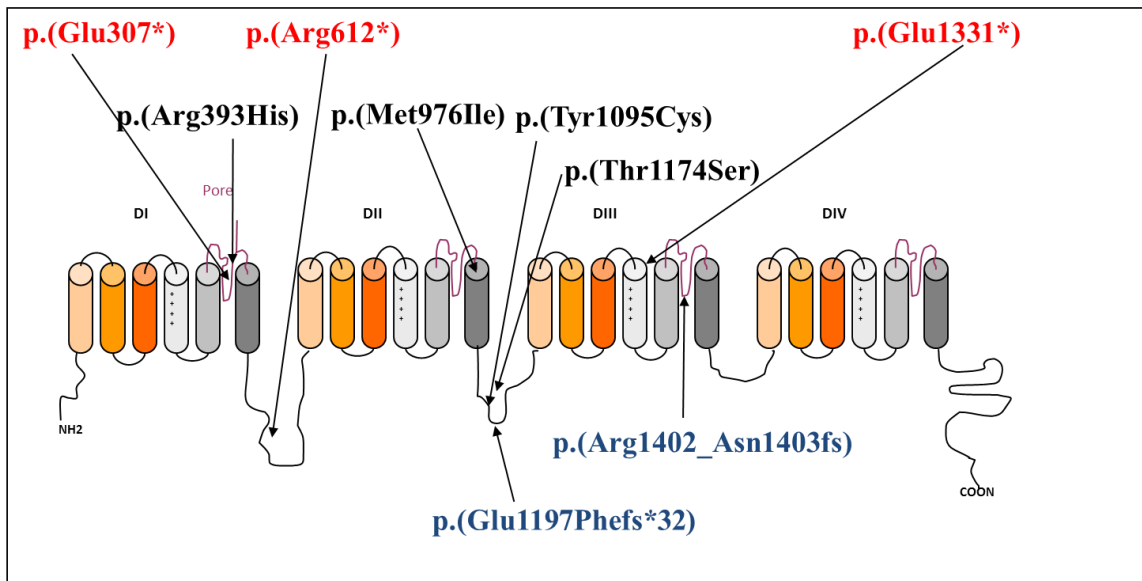
№	пол	Нац	Диагноза	Нуклеотидна замяна	Аминокиселинна замяна	Екзон	Вид мутация	Унаследяване
1.	Ж	М	DS	c.4205_4208delGAAA	p.(Arg1402_Asn1403fs)	21	frameshift	de novo
2.	М	Б	MAE	c.3521C>G	p.(Thr1174Ser)	17	missense	майка
3.	М	Б	DS	c.3991G>T	p.(Glu1331*)	20	nonsense	de novo
4.	М	А	DS	c.3284A>G	p.(Tyr1095Cys)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

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

#### Мутации в *SCN1A* гена

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

По отношение на типа нуклеотидни замени бяха наблюдавани всякакви възможни комбинации от типа транзиции и трансверзии. Мутациите са разпръснати в различни екзони по дължината на гена. Пет от откритите генетични изменения не бяха известни преди това в световната литература. Локализацията на мутациите в съответните домени на алфа-субединицата на натриевия канал е представена схематично на Фигура 49.



**Фигура 49.** Локализация на мутациите в съответните домени на алфа-субединицата на натриевия канал. Nonsense мутациите са маркирани в червено, missense – в черно и мутациите нарушаващи рамката на четене на генетичната информация – в синьо. Всеки белтъчен домен е изграден от 6 трансмембранны сегмента: S1, S2, S3, S4, S5 и S6, представени в различен цвят.

Една от стоп-кодон мутациите попада в сегмента S4 на домен III, който играе ролята на волтажен сензор. Три от мутациите (1 missense, 1 nonsense и 1 frameshift) засягат поровия участък между алфа-верижните трансмембранны сегменти S5 и S6; 1 missense попада в сегмента S6. Най-много мутации в нашата група засягат свързващите участъци между домени: в DII\_DIII свързващия участък (3) и в DI\_DII свързващия участък (1). Локализацията на представените тук мутации във важни за белтъчната функция региони и домени има отношение към патогенния характер на тези генетични изменения и към факта, че ги откриваме при тежко засегнати пациенти с Dravet синдром. Не открихме мутации в крайния домен IV на белтъка. Missense мутациите бяха проверени по отношение на еволюционната консервативност на заменените аминокиселинни остатъци в различни видове  $Na_v$  канали. Оказа се, че само мутацията в поровия участък между алфа-верижните трансмембранны сегменти S5 и S6, както и мутацията в сегмент S6 променят еволюционно висококонсервативен аминокиселинен остатък, което би могло да обясни техния патогенен ефект. Останалите две мутации, локализирани в свързващите междудоменни участъци засягат неконсервативни аминокиселини. Три от четирите missense мутации бяха публикувани и от други автори като патогенни, само една p.Tyr1095Cys беше открита за пръв път при пациент от нашата група.

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

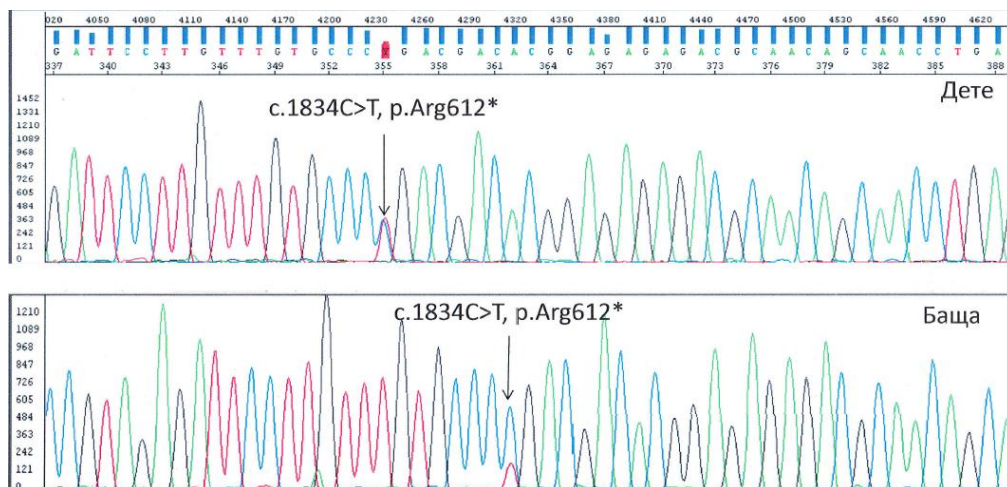
От технологична гледна точка, до момента всички генетични изменения, които открихме в *SCN1A* гена се детектираха чрез секвениране, не бяха намерени големи делеции и дупликации, които изискват MLPA анализ.

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

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

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

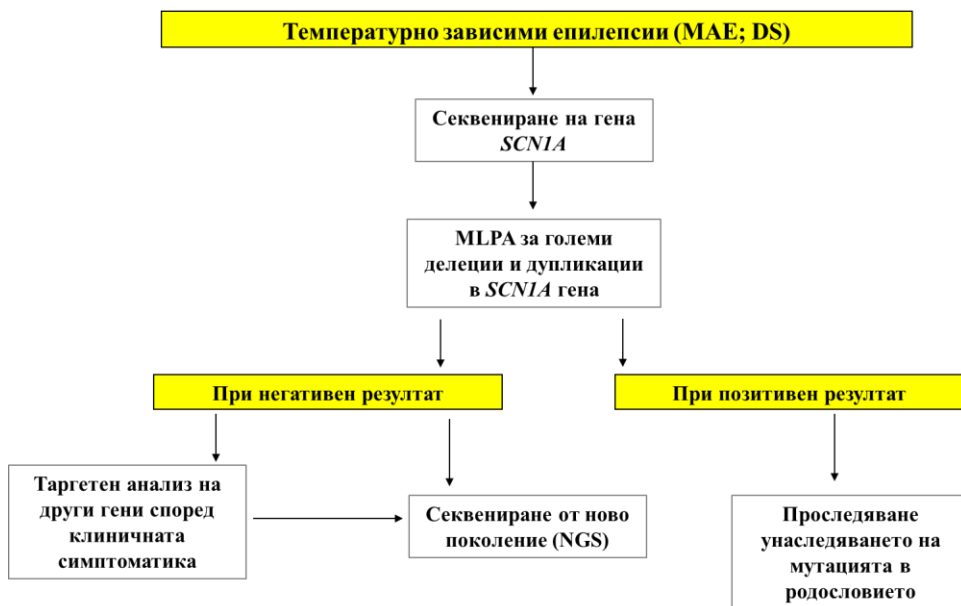
Особено интересна от гледна точка на унаследяването се оказа новооткритата стоп кодон мутация p.Arg612\* в екзон 11 на *SCN1A* гена, която при изследване на проби от двамата родители се оказа унаследена от асимптоматичен баща. При бащата, в ДНК от венозна кръв беше установен мозаечен генотип по отношение на мутантния алел, който представлява около 26% от дивия тип алел (Фигура 50).



**Фигура 50.**  
Секвенционен профил на мутацията p.Arg612\* в *SCN1A* гена при пациент и неговия баща, при който се детектира мозаечен генотип по отношение на мутантния спрямо дивия тип алел.

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

Актуалният към момента **системен подход** за молекулярно-генетична диагностика на температурно зависими епилепсии (Dravet синдром и др.) е представен на Фигура 51. Следвайки този диагностичен алгоритъм изяснихме на молекулярно ниво 31% от изследваните пациенти с тежка епилептична симптоматика, клинично диагностицирани като Dravet синдром.



**Фигура 51.** Системен подход за молекулярно-генетична диагностика на температурно зависими епилепсии.

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

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

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

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

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

NGS модерните технологии, заедно с биоинформационните софтуери навлизат все по-дълбоко в нашата пряка диагностична работа. При Rett синдром, епилепсиите и епилептичните енцефалопатии, след като покрием възможностите за молекулярно-генетична диагностика ген-по-ген и не сме достигнали до изясняване на генетичната причина за заболяването (около 65%-

70% от случаите), следваща стъпка е NGS. Днес NGS технологиите предлагат диагностични панели, *clinical exome* (~5000 гена с диагностична стойност), *whole exome*, *whole genome* и други генни и геномни комбинации за диагностични цели. За момента обаче, новите технологии също имат своите ограничения. Например някои региони от човешкия геном не могат да бъдат достатъчно надеждно покрити, така че резултатът да има дефинитивна диагностична стойност. Поради този факт не е възможно да се издаде негативен резултат само на базата на NGS анализа и се налага комбинирането на NGS технологиите с класическото секвениране по Sanger. Голям брой от генетичните находки, които откриваме, не отговарят на клиничната картина при пациента или могат да се окажат свързани с ракови заболявания или други неврологични заболявания с късно начало, които ние диагностицираме сега в детска възраст. Това са т.нар. „случайни находки“, които нямат отношение към правилното диагностициране на пациента в момента, според наблюдаваната клинична картина. Навлизаме в сверата на етичните норми при генетични изследвания. Големи дебати и спорове се водят относно това, дали да изследваме *whole genome* или *whole exome*, каква част от находките да докладваме в резултата на пациента и как да интерпретираме правилно това, което научаваме от книгата на живота. Ясно, еднозначно решение няма, но технологичният прогрес и геномната ера в медицината и молекулярната диагностика са факт и ние трябва да сме подготвени.

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

# **БИБЛИОГРАФИЯ**

## **Българска литература**

1. Абаджиев М и сътр. (1977) Неврол, психиатр. и неврохирургия (София) 3:153-160.
2. Божинов и сътр. (1973) Медицина и Физкултура, 20-80.
3. Георгиева Б. (2006) Докторска дисертация.
4. Йорданов и сътр. (1964) Невр Псих и Неврох. (София) 3(6):472-479.
5. Йорданова И. (2013) Докторска дисертация.
6. Киров А. (2013) Докторска дисертация.
7. Тодоров Т. (2011) Докторска дисертация.
8. Тодорова А. (1999) Докторска дисертация.

## **Чуждестранна литература**

1. Angelicheva D et al., (1997) Hum Genet. 99(4):513-20.
2. Bakker E et al., (1989) J Med Genet. 26:553-559.
3. Ballestar E et al., (2000) Biochemistry 39(24):7100-6.
4. Beggs AH et al., (1990) Hum Genet. 6:45-48.
5. Bonne G et al., (2000) Ann Neurol., 48(2):170-80.
6. Bronzova J, Todorova A, Kalaydjieva L. (1994) Hum Genet. 93(2):170-4.
7. Bronzova J, Todorova A et al., (1995) Balkan J Clin Labor 3:13-16.
8. Brown CA et al., (2001) Am J Med Genet. 102(4):359-67.
9. Carvalho CM et al., (2009) Hum Mol Genet. 18(12):2188-203.
10. Chamberlain JS et al., (1989) Nucleic Acids Res. 16:11141-11156.
11. Charniot JC et al., (2003) Hum Mut. 21(5):473-81.
12. Chen J-M et al., (2005) Hum Mut. 26(2):125-134.
13. Cooper DN, Krawczak M. (1990) Hum Genet. 85(1):55-74.
14. Cooper RA, Kerr AM, Amos PM. (1998) Eur J Paediatr Neurol., 2(3):127-35.
15. Danieli GA et al., (1993) Hum Genet. 91:342-346.
16. De Bona C et al., (2000) Eur J Hum Genet 8(5):325-30.
17. Depienne C et al., (2009) PLoS Genet. 5 e1000381.
18. Depienne C et al., (2011) Hum Mutat. 32:E1959-75.
19. Dibbens LM et al., (2011) Neurology 76:1514-9.
20. Dimova PS et al., (2012) Pediatr Neurol. 46(6):397-400.
21. Dincer P et al., (1997) Ann Neurol. 42: 222-229.
22. Ebach K et al., (2005) Neuropediatrics 36(3):210-3.
23. Escayg A et al., (2001) Am J Hum Genet. 68(4):866-873.
24. Fanin M et al., (2004) Hum Mutat. 24(1):52-62.
25. Fisher DZ et al., (1986) Proc Natl Acad Sci U S A. 83(17):6450-4.
26. Galvagni F et al., (1994) Hum Genet. 94:83-87.
27. Gargus JJ, Tournay A. (2007) Pediatr Neurol. 37(6):407-10.
28. Georgieva B, Todorova A et al., (2005) Am J Med Genet 136A:399-400.
29. Ghosh RP et al., (2008) J Biol Chem 283(29):20523-20534.
30. Glass CA et al., (1993) EMBO J. 12(11):4413-24.
31. Grasso M et al., (1999) Am J Med Genet., 85: 311-16.
32. Henke W et al., (1997) Nucleic Acids Res 25(19):3957-3958.
33. Herasse M et al., (1999) Mol Cell Biol., 19(6):4047-55.
34. Higurashi N et al., (2012) Epilepsy Res. 99(1-2):28-37.
35. Höger TH et al., (1991) Exp Cell Res. 197(2):280-9.
36. Hynes K1 et al., (2010) J Med Genet. 47(3):211-6.
37. Jamal SM1 et al., (2010) Am J Med Genet A. 152A(10):2475-81.
38. Joncourt F et al., (2003) Eur J Hum Genet. 11, Supplement 1, P667.
39. Kalaydjieva L, Eigel A, Horst J. (1989) J Med Genet. 26(10):614-8.
40. Kanai K et al., (2004) Neurology 63:329-34.
41. Khaniani MS et al., (2008) Mol Cytogenet. 8:1-6.
42. Koenig M et al., (1987) Cell 50:509-517.
43. Krawczak M, Cooper DN. (1991) Hum Genet. 86(5):425-41.
44. Krawczak M, Reiss J, Cooper DN. (1992) Hum Genet. 90(1-2):41-54.
45. Kunkel TA, Alexander PS. (1986) J Biol Chem 261(1):160-6.
46. Lee SSSJ, Wan M, Francke U. (2001) Brain and Development 23:S138-S143.

47. Lin CC, Draper PN, De Braekeleer M. (1985) *Cell Genet.* 39:269-274.
48. Marini C et al., (2009) *Epilepsia* 50(7):1670-8.
49. Marini C et al., (2010) *Neurology* 75(7):646-53.
50. Milà M et al., (1996) *J Med Genet.* 33:338-40.
51. Miorin M, Todorova A et al., (1997) *Basic Appl Myol* 7(3):265-269.
52. Monaco AP et al., (1988) *Genomics* 2:90-95.
53. Muchir A et al., (2000) *Hum Mol Genet.* 9(9):1453-9.
54. Mulley JC et al., (2005) *Hum Mut.* 25(6):535-542.
55. Neul JL et al., (2010) *Ann Neurol.* 68(6):944-50.
56. Nolin SL et al., (1994) *Am J Med Genet.* 51:509-12.
57. Ostlund C et al., (2001) *J Cell Sci.* 114(Pt24):4435-45.
58. Piluso G et al., (2005) *J Med Genet.* 42(9):686-93.
59. Pogoda TV et al., (2000) *Hum Mut.* 15(3):295.
60. Raharjo WH et al., (2001) *J Cell Sci.* 114(Pt24):4447-57.
61. Richard I et al., (1999) *Am J Hum Genet* 64:1524-1540.
62. Riordan JR et al., (1989) *Science* 245:1066-1073.
63. Schmucker B, Seidel J. (1999) *Am J Med Genet.* 84:221-5.
64. Shapiro MB, Senapathy P. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15(17):7155-74.
65. Specchio N et al., (2011) *Epilepsia* 52(7):1251-7.
66. Steffenburg U et al., (2001) *Acta Paediatr.* 90:34-9.
67. Stuurman N, Heins S, Aebi U. (1998) *J Struct Biol.* 122(1-2):42-66.
68. Tabolacci E et al., (2007) *Eur J Hum Genet* 16:209-14.
69. Taniura H, Glass C, Gerace L. (1995) *J Cell Biol.* 131(1):33-44.
70. Tassone F et al., (2008) *J Mol Diagn.* 10:43-49.
71. Todorov T et al., (2009) *BMJ Case Reports* [doi:10.1136/bcr.06.2008.0139].
72. Todorov T, Todorova A et al., (2010a) *Genet Counseling* 21(2):257-262.
73. Todorov T, Todorova A et al., (2010b) *Balkan J Med Genet* 13(2):11-25.
74. Todorov T, Todorova A et al., (2010c) *Mol Biotechnol.* 45:150-154.
75. Todorov T, Todorova A et al., (2012) *Mutat Res.* 734(1-2):69-72.
76. Todorova A et al., (1996) *Am J Med Genet.* 65:40-43.
77. Todorova A and Danieli GA. (1997) *Hum Mut.* 9:537-547.
78. Todorova A et al., (1999) *Balkan J of Med Genet.* 2(4):13-20.
79. Todorova A et al., (2003) *J Med Genet.* 40(10):e115.
80. Todorova A, Kress W, Mueller CR. (2005) *Clin Genet.* 67:356-358.
81. Todorova A et al., (2006) "Progress in Medical Genetics", Nova Science Publishers, Inc., 229-257.
82. Todorova A et al., (2007) *Neurogenetics* 8:225-229.
83. Todorova A et al., (2013) *Clin Genet.* 85(3):286-9.
84. Wan M et al., (1999) *Am J Hum Genet.* 65:1520-1529.
85. White SJ et al., (2006) *Hum Mutat* 27:938-945.
86. Yim SY et al., (2008) *J Korean Med Sci.* 23(3):470-6.
87. Yordanova I et al., (2011) *Neurosci Lett.* 494(2):180-3.

### **Електронни източници**

1. <http://www.dmd.nl>
2. <http://www.dmd.nl/LMNA>
3. <http://www.mlpa.com>

## ИЗВОДИ

1. Познанията ни за човешкия геном, за взаимодействието между генетични и епигенетични фактори, за това как да интерпретираме всеки резултат и да анализираме генотип-фенотипните корелации, търпят динамично ежедневно развитие.
2. Възможностите на съвременните технологии за генетична диагностика са огромни и се развиват с бързи темпове, което изисква постоянно обучени и квалифициране от страна на специалистите.
3. Бурното развитие на технологиите увеличи значително нашите възможности за мутационен скрининг и изясняване на носителски статус в засегнатите семейства.
4. Навлизането на биоинформатиката в молекулярно-генетичната диагностика представлява мощно средство за *in silico* оценка на патогенния ефект на мутациите.
5. Мозаечен генотип по отношение на някои мутации в изследваните гени е причина за разлики във фенотипната изява на заболяванията.
6. Провеждането на генетични изследвания при пациента, без участие на неговите родители или други ключови родственици, би могло да доведе до грешна интерпретация на получените резултати и оценка на патогенния ефект на откритите генетични изменения.
7. Генотип-фенотипните интерпретации при някои от описаните заболявания, въпреки моногенното унаследяване, противоречат на стандартните разбирания за връзка между генетичен дефект и фенотипна изява на заболяването. Установени са значителни вътрефамилни разлики в клиничната симптоматика при носителите на мутации и вариации от асимптоматично носителство до тежка клинична симптоматика. Възможна е намесата на други генетични и епигенетични фактори.
8. В някои гени възникват *de novo* мутации, причинени от независими мутационни събития, но често засягат едни и същи нуклеотиди или генни региони. При различни пациенти и популации се откриват едни и същи мутации, което предполага прякото участие на околната секвенция и архитектура във възникването на мутационните събития.
9. Комплексни мутационни събития върху един алел биха могли да се обяснят с геномната архитектура на региона и наличието на повторени елементи, чието присъствие може да генерира нестабилни ДНК структури, едноверижни нарушения и прекръстосвания в ДНК, колапс на репликационната вилка и приплъзване на полимеразата.
10. Няма единен механизъм на мутагенеза, който да бъде приложим при всички мутационни събития. Вероятността за възникване на мутация в дадена позиция на гена се увеличава при положение, че независими механизми на мутагенеза могат да я провокират точно в тази позиция; водеща роля изглежда че има околната секвенция и нейната архитектура.
11. Синонимни замени в човешкия геном не могат да се приемат директно като непатогенни, необходими са доказателства за това.
12. Най-важният урок в ежедневната диагностична практика е интерпретирането на резултатите от генетичните изследвания. Всеки конкретен резултат, колкото и убедително да изглежда на пръв поглед като патогенен или непатогенен трябва да се интерпретира с повишено внимание.
13. Необходим е интердисциплинарен подход за правилното интерпретиране на резултатите от генетичните и геномни изследвания.

## **ПРИНОСИ**

### **МЕТОДИЧНИ:**

Бяха разработени собствени методики за:

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

### **НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧНИ:**

1. Бяха проведени изследвания върху механизмите на мутагенеза в човешкия геном и участието на околната секвенция и геномната архитектура в провокирането на мутационните събития.
2. Бяха интерпретирани модели на мутагенеза с участието на прави, обратни повтори и симетрични елементи, провокиращи формирането на двойноспирални вторични структури.
3. Бяха представени убедителни доказателства не само за експандирането, но и за контрахирането на динамични CGG експанзии в човешкия геном.

### **ПРИЛОЖНО-ДИАГНОСТИЧНИ:**

1. Беше доказана първата дупликация в *DMD* гена при български пациент.
2. Беше доказана първата точкова мутация в *DMD* гена при български пациент.
3. За пръв път беше изяснен носителски статус в българско ДМД семейство с липсващ индексен пациент.
4. Беше доказан на молекулно ниво първия случай на калпаинопатия в България.
5. Беше доказана първата голяма делеция в *CAPN3* гена при български пациент.
6. Беше доказан на молекулно ниво първия случай на мускулна дистрофия Emery-Dreifuss в България.
7. Беше доказана синонимна замяна, която има патогенен сплайсинг ефект. Това е един от малкото известни случаи от този тип в литературата.
8. Беше оразмерена първата CGG експанзия в *FMR1* гена при български пациент.
9. Беше проследен за пръв път при български пациенти феномена на мозаицизъм, породен от експандиране и контрахиране на CGG повтор.
10. Беше доказан на молекулно ниво първия случай на епилептична енцефалопатия тип 9 в България.

11. Беше доказан на молекулно ниво първия случай на епилептична енцефалопатия тип 2 в България.
12. Разработих съвременни диагностични алгоритми, съобразени с наличните технологии, които доведоха до следната успеваемост на молекулярно-генетичната диагностика у нас:

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

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

Ламинопатии - 71%.

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

Синдром на Rett – 36%;

Епилептични енцефалопатии с ранно начало – 36%;

Dravet синдром – 31%.

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

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

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

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

## ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

№	Публикация в международни списания	IF	Индивидуален IF	Цитирания
1	Bronzova J, <b><u>Todorova A</u></b> , Kalaydjieva L. (1994) Detection of carriers of deletions in the dystrophin gene in Bulgarian DMD-BMD families. Hum Genet. 93(2):170-4.	<b>2.758</b>	<b>0.919</b>	<b>5</b>
2	<b><u>Todorova A</u></b> , Constantinova D, Kremensky I. (2003a) Dilated cardiomyopathy and new 16bp deletion in exon 44 of the dystrophin gene: The possible role of repeated motifs in mutation generation.	<b>2.603</b>	<b>0.868</b>	<b>6</b>
3	<b><u>Todorova A</u></b> , Halliger-Keller B, Walter MC, Dabauvalle MC, Lochmüller H, Müller CR. (2003b) A synonymous codon change in the LMNA gene alters mRNA splicing and causes limb girdle muscular dystrophy type 1B. J Med Genet. 40(10):e115.	<b>6.368</b>	<b>1.061</b>	<b>15</b>
4	<b><u>Todorova A</u></b> , Kress W, Mueller CR. (2005) Novel mutations in calpain 3 gene in Germany. Clin Genet 67:356-358.	<b>3.276</b>	<b>1.092</b>	<b>7</b>
5	(Georgieva B, <b><u>Todorova A</u></b> ), equal contribution Tournev I, Mitev V, Plageras P, Kremensky I. (2005) 550delA mutation in calpain 3 (CAPN3) gene: DMD/BMD, SMA, or LGMD2A – clinically misdiagnosed cases. Am J Med Genet 136A:399-400.	<b>1.913</b>	<b>0.319</b>	<b>3</b>
6	<b><u>Todorova A</u></b> , Georgieva B, Tournev I, Todorov T, Bogdanova N, Mitev V, Mueller CR, Kremensky I, Horst J. (2007) A large deletion and novel point mutations in the calpain 3 gene (CAPN3) in Bulgarian LGMD2A patients. Neurogenetics 8:225-229.	<b>4.281</b>	<b>0.476</b>	<b>7</b>
7	<b><u>Todorova A</u></b> , Todorov T, Georgieva B, Lukova M, Guergueltcheva V, Kremensky I, Mitev V. (2008) MLPA analysis/complete sequencing of the DMD gene in a group of Bulgarian Duchenne/Becker muscular dystrophy patients. Neuromusc Disorders 18(8):667-670.	<b>2.932</b>	<b>0.419</b>	<b>6</b>
8	(Todorov T, <b><u>Todorova A</u></b> ), equal contribution Kirov A, Dimitrov B, Carvalho R, Nygren AOH, Boneva I, Mitev V. (2009) Fragile X mosaic male full mutation/normal allele detected by PCR/MS-MLPA. BMJ Case Reports [doi:10.1136/bcr.06.2008.0139].	---	---	<b>5</b>
9	(Todorov T, <b><u>Todorova A</u></b> ), equal contribution Avdjieva D, Dimova P, Angelova L, Tincheva R, Mitev V. (2010) Molecular Basis of mental retardation	<b>0.395</b>	<b>0.056</b>	<b>1</b>

	in a sample from Bulgaria. Genetic Counseling 21(2):257-262.			
10	(Todorov T, <b><u>Todorova A</u></b> ), equal contribution Georgieva B, Mitev V. (2010) A unified rapid PCR method for detection of normal and expanded trinucleotide alleles of CAG repeats in Huntington chorea and CGG repeats in Fragile X syndrome. Mol Biotechnol., 45:150-154.	<b>2.091</b>	<b>0.523</b>	<b>5</b>
11	Yordanova I, Todorov T, Dimova P, Hristova D, Tincheva R, Litvinenko I, Yotovska O, Kremensky I, <b><u>Todorova A</u></b> . (2011) One novel Dravet syndrome causing mutation and one recurrent MAE causing mutation in SCN1A gene. Neurosci Lett 494(2):180-3.	<b>2.105</b>	<b>0.234</b>	<b>5</b>
12	(Todorov T, <b><u>Todorova A</u></b> ), equal contribution Motoescu C, Dimova P, Iancu D, Craiu D, Stoian D, Barbarii L, Bojinova V, Mitev V. (2012) Spontaneous recurrent mutations and a complex rearrangement in the MECP2 gene in the light of current models of mutagenesis. Mutat Res. 734(1-2):69-72.	<b>3.902</b>	<b>0.390</b>	<b>1</b>
13	Dimova PS, Kirov A, <b><u>Todorova A</u></b> , Todorov T, Mitev V. (2012) A novel PCDH19 mutation inherited from an unaffected mother. Pediatr Neurol., 46(6):397-400.	<b>1.416</b>	<b>0.283</b>	<b>5</b>
14	<b><u>Todorova A</u></b> , Litvinenko I, Todorov T, Tincheva R, Avdjeva D, Tincheva S, Mitev V. (2013) A family with fragile X syndrome, Duchenne muscular dystrophy and ichthyosis transmitted by an asymptomatic carrier. Clin Genet., 85(3):286-9.	<b>3.931</b>	<b>0.562</b>	<b>0</b>
	<b>Монографии и книги</b>			
1	<b><u>Todorova A</u></b> , Halliger-Keller B, Kress W, Tournev I, Dabauvalle MC, Kremensky I, Mueller CR. The mutation spectrum of the lamin A/C gene (LMNA): A single gene-multiple diseases. Chapter X in the book "Progress in Medical Genetics", published by Nova Science Publishers, Inc. 2006, pp.229-257.			
2	Chamova T, Tournev T, <b><u>Todorova A</u></b> . Approaches in diagnostic & care of Duchenne/Becker muscular dystrophy. Genotype-phenotype correlations in Duchenne/Becker muscular dystrophy patients. (2011). Lambert Academic Publishing. ISBN:978-3-8473-1737-1.			
	<b>ОБЩО:</b>	<b>37.971</b>	<b>7.202</b>	<b>71</b>