

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ  
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА

---

Д-р Радослава Василева Въжарова

**АНАЛИТИЧЕН ПОДХОД ЗА РАЗКРИВАНЕ НА ГЕНЕТИЧНИ  
НАРУШЕНИЯ ПРИ РЕДКИ БОЛЕСТИ ЧРЕЗ ДНК СЕКВЕНИРАНЕ ОТ  
НОВО ПОКОЛЕНИЕ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

Област на висше образование: „Природни науки, математика и информатика”

Професионално направление: „Биологически науки” Шифър 4.3.

Научна специалност: „Генетика”

Научен ръководител: чл.кор. проф.д-р Драга Тончева, дбн

София, 2016

Дисертационният труд е написан на 178 стандартни страници, онагледен е с 55 фигури, 25 таблици и 1 приложение. Библиографията обхваща 359 източници.

Дисертационният труд е обсъден на разширен Катедрен съвет в Катедрата по медицинска генетика към Медицински Факултет, Медицински Университет – София на 18.12.2015 г. и е насочен за защита пред Научно жури.

Публичната защита ще се състои от 13'00 ч. на 10.05.2016 г. в УБ „Лозенец“, ул. Козяк №1, Деканат, 2 ет. Аула.

Материалите по защитата са на разположение в Катедрата по медицинска генетика, СБАЛАГ „Майчин дом“, ет 6

Членове на научното жури:

Акад. проф. Иван Иванов, дбн

Проф. д-р Върбан Ганев, дм, дбн

Проф. д-р Радка Тинчева, дмн

Чл. кор.проф. д-р Драга Тончева, дбн

Доц. д-р Вили Стоянова, дм

## 1. ВЪВЕДЕНИЕ

Настоящият дисертационен труд е посветен на тема, която винаги ще остане актуална – етиологията на редките генетични болести.

Редките болести, дължащи се на дефекти в единични гени могат да бъдат хронични, инвалидизиращи и ограничаващи продължителността на живота. Независимо от тяхната тежест, някои редки заболявания са съвместими с добро качество на живот, ако бъдат диагностицирани рано и оптимално третирани. Макар че, отделните нозологични единици са редки (по дефиниция засягат по-малко от 200,000 души в Съединените щати или по-малко от 1 на 2000 души в Европа), сумарната им честота е значима и засягат милиони хора по целия свят.

Бързото развитие на геномните технологии през последните 15-20 години и резултатите, получени в хода на проекта Човешки геном, създадоха предпоставка за внедряване постиженията на геномиката в клиничната практика. Появата на методите за масивно паралелно секвениране (новогенерационно секвениране, NGS) ни предостави възможност за едновременно „прочитане“ на големи набори от гени и дори цели геноми. Рязкото намаляване на цената, съчетано с увеличен добив на данни за кратък период от време, превърна задача, като секвениране генома на един индивид, от проект изискващ многогодишните усилия на множество лаборатории, в „лабораторен тест“, който може да се осъществи в една лаборатория за обозримо кратък период. Основното предизвикателство по отношение на секвенирането от ново поколение не е самата технология, а интерпретацията на данните, получени с тази технология и ползването им в контекста на конкретно клинично приложение. Независимо, че NGS има потенциала да промени диагностичната парадигма в медицинската генетика, остава неясно кои пациенти биха имали полза от NGS анализ и на какъв етап от клиничното им проследяване. Обект на дисертацията не е откриване на нови асоциации на генни дефекти с конкретни болестни фенотипи, а дефиниране на възможностите за прилагане на NGS на генни панели, включващи голям брой гени, в клиничната практика като елемент от диагностичния подход при пациентите / семействата, засегнати от редки моногенни заболявания.

## 2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

**Цел:** Да се изследват възможностите на таргетното екзомно ресеквениране на панели от гени като аналитичен подход за установяване на генетични нарушения при пациенти с редки болести.

### **Задачи:**

1. Да се въведе технологията за масивно паралелно секвениране от ново поколение (NGS).
2. Да се определи честотата и типа на вариантите в геномите на здрави индивиди чрез таргетно ресеквениране с генен панел, включващ 4813 гени
3. Да се селектират таргетни групи пациенти с редки генетични заболявания и да се подготвят биологични проби за таргетно ресеквениране.
4. Да се анализират генетичните нарушения при редки моногенни заболявания според типа на вариантите (патологични и вероятно патологични) разкрити при таргетно ресеквениране с панели, включващи:
  - 552 известни гена (асоциирани с тежки рецесивни заболявания)
  - 94 известни гена (асоциирани с предразположеност към туморни заболявания)
  - 4813 известни гена (асоциирани с моногенни заболявания и предразположения).
5. Да се предложи алгоритъм за геномно профилиране при пациенти с редки моногенни болести

### 3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

#### 3.1.Участници в проучването

Изследванията чрез секвениране от ново поколение са извършени в лаборатория „Геномика“ на СБАЛГАР „Д-р Малинов“ в периода 2013-2015 година.

В хода на проучването са изследвани общо 58 лица, разпределени в следните групи: 10 здрави възрастни без симптоми на редки моногенни заболявания (контролна група), 43 пациенти с моногенни или вероятно моногенни заболявания и 5 здрави родственици на пациенти с моногенни заболявания.

Всички участници са запознати с целта на генетичното изследване и са потвърдили писмено информираното си съгласие за извършване на анализа или това е направено от техен родител/пълномощен представител.

Биологичните проби на основната група пациенти с редки заболявания бяха предоставени от Националната генетична лаборатория, СБАЛАГ „Майчин дом“, Медицински университет София. Въз основа на водещите клинични симптоми разпределението на пациентите по клинични диагнози е както следва:

- **с неврологични и невромускулни заболявания:** общо 16 от които, 2 с прогресивна мускулна дистрофия тип Дюшен / Бекер, 7 със спастична квадриплегия (при 4 - и епилепсия), 1 с Атаксия-телангиектазия, 1 с предполагаема Спинална мускулна атрофия, 4 с епилепсия (1 с GEFS+, 1 с Епилепсия и хиперамониемия, 1 с Епилепсия и специфични разстройства в развитието на двигателната функция, 1 с Епилепсия), 1 с Аутизъм, ИНПР;
- **с метаболитни заболявания:** общо 14, от които 1 с Пропионова ацидурия, 1 с 3-метил-глутаконова ацидурия, 1 с Митохондриялна енцефалопатия, 1 с Левциноза, 1 с Zellweger spectrum, 1 с Niemann–Pick type C, 1 с предполагаема болест на Rompre, 3 с Гликогеноза, 1 с предполагаема болест на Крабе, 3 с абнормен резултат от метаболитен скрининг, но неуточнено метаболитно заболяване;
- **с костно-ставни заболявания:** 3 с Obs. Osteogenesis imperfecta;
- **със сърдечно-съдови заболявания:** 1 с Дисекция на аортата;
- **с белодробни заболявания:** 2 с Кистозна фиброза
- **с кожни заболявания:** 1 с Булозна епидермолиза;
- **с множествени малформации:** 1 с Obs. Синдром на Noonan s, 1 с ПМС (двустранна аплазия на радиуси и палци, едностранна бъбречна агенезия), 1 с ИНПР. Obs. WBS, 1 с ПМС (аномалия на ЦНС, ВСМ). ИНПР;
- **други:** 1 с предполагаема Туберозна склероза, 1 с Изоставане в растежа и частична аниридия;

В изследването бяха включени също 5 здрави родственици на пациенти с редки моногенни заболявания: сестра на починал болен с Мукополизахаридоза тип ШВ (MPSIIIВ, Sanfilippo B), родителите на дете починало от Интрахепатална прогресивна холестаза и родителите на дете починало от Булозна епидермолиза тип Herlitz.

Контролната група включва 10 лица (3 жени и 7 мъже) на възраст над 18 години (от 25 до 56 г.), неродствени помежду си, от български етнически произход, които нямат симптоми на тежки редки моногенни заболявания към момента на изследването.

## 3.2. Биологични проби

От всеки изследван е взета биологична проба за извличане на геномна ДНК. ДНК пробите на 43 от пациентите са предоставени от Националната генетична лаборатория, СБАЛГАГ „Майчин дом“, Медицински университет София, а на десетте контролни лица и на 5 от пациентите биологичните проби са взети в СБАЛГАР „Д-р Малинов“. При 55 от изследваните ДНК е изолирана от венозна кръв взета чрез затворена затворена вакутейнер система при спазване на стандартните процедури за стерилност. При трима пациенти ДНК е извлечена от тъкан: при един от букална лигавица, при един от кожна биопсия и при един от чернодробна тъкан включена в парафин. За изолирането на ДНК кръвта е събирана във вакутейнери с K2EDTA, а тъканните проби в контейнер със стерилен физиологичен разтвор. Изолирането на ДНК е извършвано не по-късно от 24 часа след взимането на биологичната проба. След изолирането е измервана концентрацията на ДНК във всяка проба, отделяна е 1-2 µg ДНК (разтворена в TE буфер) за извършване на анализа, а останалото количество ДНК е банкирано и се съхранява съответно в ДНК банката на Националната генетична лаборатория и на СБАЛГАР „Д-р Малинов“.

## 3.3. Методи

В настоящата работа са използвани предимно молекулно генетични методи за лабораторен анализ – екстракция на ДНК, ДНК секвениране от ново поколение и SNP-каротиопиране.

### 3.3.1. Изолиране на ДНК

ДНК беше изолирана от кръв, използвайки кита на Qiagen QIAamp DNA Blood Mini Kit. Епруветките с кръв бяха центрофугирани за 10 минути на 2500 x g. Така кръвта се разделя на три фракции - горна, съдържаща плазма; средна, в която се концентрират левкоцитите, съдържащи клетъчни ядра; и долна, в която се концентрират безядрените еритроцити.

За процеса на изолиране на ДНК се взимат 200 µl от средната фракция на левкоцитите (buffy coat) и се смесват с 20 µl протеиназа K и 200 µl лизис буфер AL. Реакцията се вортексира за 15 сек и се инкубира за 10 мин на 56°C. След кратко центрофугиране се добавят 200 µl етанол (96–100%), следва вортексиране за 15 сек и прехвърляне на сместа в QIAamp Mini spin колона, поставена в събирателна епруетка. Колоната се центрофугира за 1 мин на 6000 x g и се прехвърля в нова събирателна епруетка. Към колоната се добавят 500 µl буфер AW1, центрофугира се за 1 мин на 6000 x g, след което отново се слага в нова събирателна епруетка. Добавят се 500 µl буфер AW2, след което пробата се центрофугира за 3 мин на пълна скорост (20000 x g). Елуатът се изхвърля. Следва центрофугиране за още 1 мин на максимална скорост за пълно изсушаване на колоната, след което колоната се слага в нова епендорф епруетка и се инкубира за 5 мин на стайна температура с елуиращ буфер AE. Следва центрофугиране за 1 мин на 6000 x g, при което се отделя пречистената ДНК. Количеството ѝ, както и качеството бяха измервани с NanoDrop 2000c (ThermoScientific) след изолирането. При наличие на замърсяване от протеини, соли или други контаминанти ( $260/280 < 1.8$ ;  $260/230 < 2.0$ ) пробите бяха пречиствани, използвайки кита NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up на Macherey-Nagel.

### 3.3.2. Таргетно ДНК ресеквениране от ново поколение

Екстрахираните ДНК проби бяха разпределяни в групи за секвениране с различни генни панели според клиничната симптоматика и работната клинична диагноза на пациентите. За таргетно ДНК ресеквениране е използвана технологията и апаратура на Illumina.

#### 3.3.2.1. Генни панели използвани за таргетно ДНК ресеквениране

За изследването на всички пациенти, включени в този дисертационен труд, бяха използвани три различни секвенционни панела на Illumina - TruSight Cancer Panel, TruSight Inherited Disease Panel и TruSight One Panel. Всеки от тях включва кодиращата част на различен набор от гени. Дизайнът на всеки панел е спрямо версия NCBI37/hg19 на човешкия референтен геном.

**TruSight Cancer** (Illumina) генният панел включва 94 гена, мутации в които предразполагат към туморни заболявания (асоциирани предимно с редки фамилни ракови синдроми). Списък на гените в панела е показан в таблица №1А на Приложение 1 . В панела също така са включени и районите на 284 SNP-а, за които големи GWAS проучвания са показали, че са асоциирани с рак. Общият таргетен район на панела е 255 Кб.

**TruSight Inherited Disease** генният панел е предназначен за изследването на редки тежки моногенни заболявания с предимно рецесивен тип на унаследяване и начало в детска възраст. Таргетният район е 2.25 Мб, като включва екзоните на 552 гена (8801 екзона). Списък на гените в панела е показан в таблица №2А на Приложение 1.

В дизайна на **TruSight One** генния панел са включени олиго сонди, комплементарни на екзоните на 4813 гена (~62000 екзона), мутации в които водят до известни болестни състояния и предразположения, както и някои гени, които досега не са асоциирани със заболявания. В него са включени всички гени от гореспомнатите два по-малки панела. Таргетният район на панела е 12 Мб. Списък на гените в панела е показан в таблица №3А на Приложение 1

В таблица 1 са показани основните характеристики на ползваните генни панели и броят пациенти с редки заболявания изследвани със съответния панел.

**Таблица 1.** Основни характеристики на генните панели TruSight

Генен панел	TruSight Cancer	TruSight Inherited	TruSight One
Брой таргетни гени	94	552	4 813
Брой таргетни екзони	1 700	8 801	62 000
Общ размер на таргетния район	255 Кб	2.25 Мб	12 Мб
Брой изследвани пациенти	3	25	15
Брой изследвани здрави лица	-	3	12

### 3.3.2.2. Приготвяне на библиотеките за секвениране

За приготвяне на библиотеката от таргетни райони за всеки пациент, която впоследствие да бъде секвенирана, беше следван протоколът *TruSight Rapid Capture Sample Preparation guide (Revision A)*.

#### Нормализиране на ДНК

Първоначално концентрацията на всяка от ДНК пробите беше доведена до 10 ng/μl (измерване със спектрофотометър Nanodrop). След това точната концентрация на двойно-верижната ДНК в пробата бе измервана с Qubit 2.0 Fluorometric Quantitation System, използвайки Qubit dsDNA BR (Broad Range) Assay Kit. За повечето проби концентрацията варираше в диапазона 5-10 ng/μl - за тези, които не бяха в него, се правеше по-голяма или по-малка разрежка от изходната ДНК.

#### Тагментация

Първата стъпка от процеса на приготвяне на библиотеката е тагментацията (тагване/маркиране + фрагментация), при която Nextera транспозоми начупват на случаен принцип геномната ДНК на фрагменти със средна дължина от 300 бази, добавяйки адапторни секвенции в двата края на всеки от тях (Фиг. 6 А).

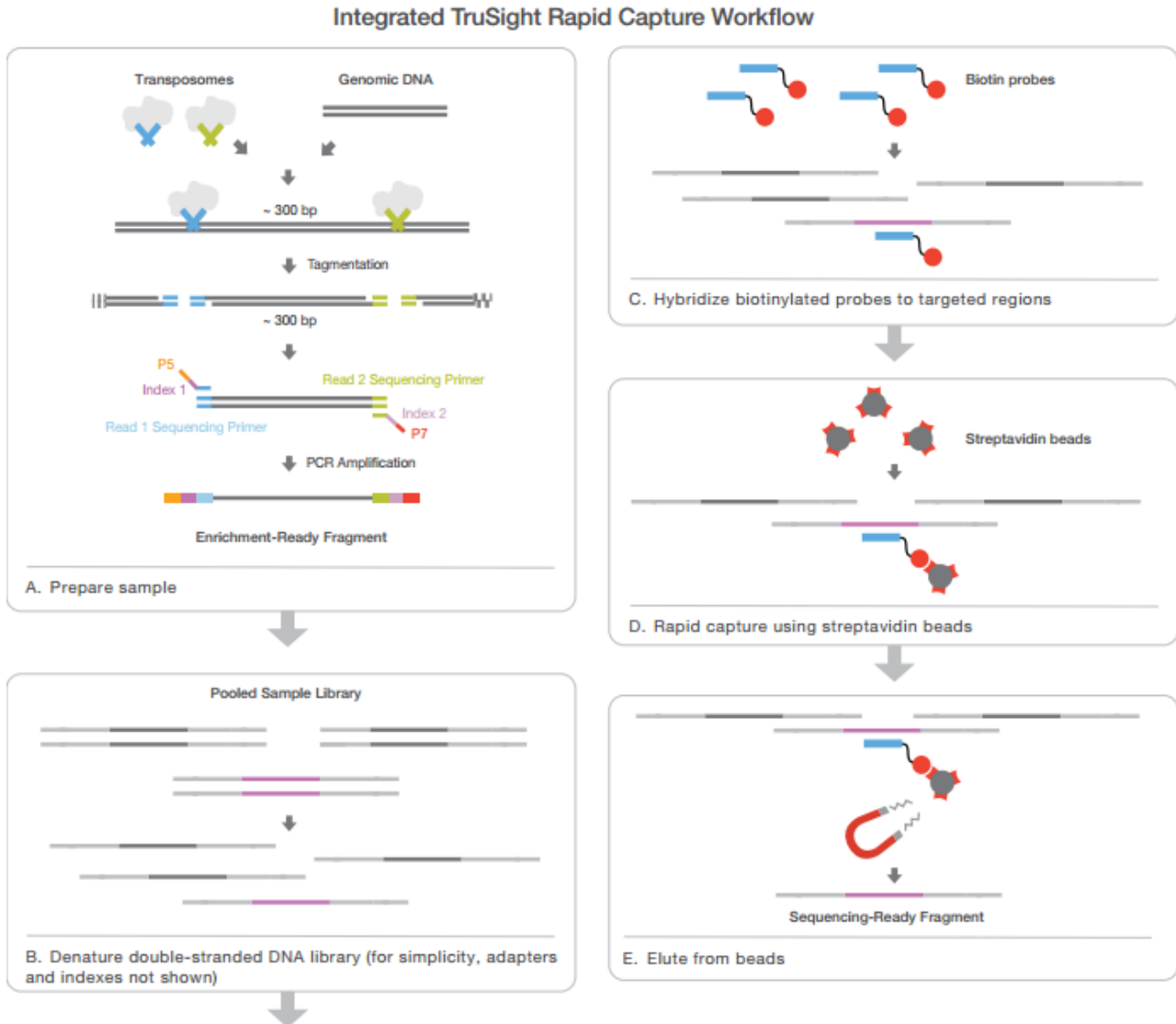
За реакцията се ползват 96-ямкови плаки. От всяка проба се взимат 50 ng начално количество ДНК и се накапват в отделна ямка. Към нея се добавя нужното количество ТЕ буфер, за да се достигне обем от 10 μl ДНК разтвор с концентрация 5 ng/μl. Към тях се добавят 25 μl Tagment DNA Buffer (TD) и 15 μl Tagment DNA Enzyme (TDE1), който съдържа Nextera транспозомите. Плаката се запечатва със залепящо фолио Microseal 'B' (тази стъпка се повтаря винаги преди плаката да се вортексира, центрофугира или инкубира, след което фолиото се маха и изхвърля). Плаката, съдържаща ДНК и реагентите за тагментацията, се поставя на шейкър за 1 мин на 1800 rpm. Следва центрофугиране за 1 мин на 280 x g и инкубация за 10 мин на 58°C, след което фолиото се разлепя и се добавят 15 μl Stop Tagment Buffer (ST) към всяка ямка. Плаката се вортексира (1800 rpm, 1 мин), центрофугира се (280 x g, 1 мин) и се оставя на стайна температура за 4 мин за деактивация на тагментационната реакция.

#### Първо пречистване

По време на първото пречистване тагментираната ДНК се пречиства от транспозомите, за да не останат свързани с краищата на фрагментите.

Към всяка ямка се добавят 65 μl добре разтворени Sample Purification Beads (SPB), които преференциално се свързат само с ДНК фрагментите. Плаката се вортексира (1800 rpm, 1 мин) и се инкубира за 8 мин на стайна температура, след което се поставя за 2 мин на магнитна стойка, която утаява пречиствателните мъниста, свързани с ДНК. Супернатантата (130 μl) се премахва от всяка ямка, без да се нарушава интактността на утаените мъниста. Приготвя се пресен 80% етанол, разреждайки 100% EtOH с двойно дестилирана вода. Докато плаката е на магнита, се добавят бавно 200 μl 80% етанол. Без запечатване с фолио се изчаква 30 секунди, след което етанолът се премахва от ямките с пипета. Накапват се нови 200 μl етанол, последвани от 30 секунди инкубация, след което от ямките се премахва целият остатъчен етанол. Плаката се оставя незапечатана за 10 мин на стайна температура, за да изсъхне напълно от етанола. След това се маха от магнита и внимателно се добавят 22.5 μl Resuspension Buffer (RSB), без да се докосват мънистата с

типчето на пипетата. Следва вортексиране (1800 rpm, 1 мин), инкубация (2 мин, стайна температура) и вортексиране (280 x g, 1 мин), след което плаката се поставя за 2 мин на магнитната стойка. Супернатантата съдържа отделената от пречиствателните мъниста ДНК. 20 µl от всяка ямка се прехвърлят в отделни 200-µl PCR епруветки, без да се влиза в контакт с утаените мъниста.



**Фигура 1.** Работната процедура за подготвяне на библиотеката за секвениране по протокола *TruSight Rapid Capture Sample Preparation guide*

### Първа PCR амплификация

Първата PCR амплификация с лимитиран брой цикли размножава тагментираните ДНК фрагменти, като освен това добавя към краищата им уникална за всяка проба комбинация от индекси (i7 и i5) с цел мултиплексиране на секвенционната реакция, както и адапторни секвенции (P5 и P7), служещи по-късно за свързването на фрагментите с поточната (flow) клетка и генерирането на клъстери (Фиг. 1А).

Подбира се уникална комбинация от индексни праймери i7 (N701, N702, N703...) и i5 (E501, E502, E503...) за всяка проба от една секвенционна реакция. Всеки индекс се състои от 8 нуклеотида, които служат като баркод за всички секвенции на даден пациент. По време на секвенирането MiSeq отчита базите гуанин (G) и тимин (T) със зелен лазер, а аденин (A) и цитозин (C) - с червен лазер. Двойките индекси за пробите, които впоследствие ще се комбинират в един пул, се избират така, че на всяка една от осемте позиции на индекс i7 и i5 да има поне един нуклеотид, четен от другия лазер.

Sample	Good Index 1		Bad Index 1	
1	701	TAAGGCGA	702	CGTACTAG
2	702	CGTACTAG	703	AGGCAGAA
3	704	TCCTGAGC	711	AAGAGGCA
		√√√√√√√√		x√xx√xx√

√=signal in both color  
x=signal missing in one color channel

**Фигура 2.** Подход при избора на индекси за пробите: поддържане на цветови баланс при лазерното отчитане на базите за всяка индексова позиция (взета от Illumina, 2015)

Избраните индекси се размразяват, вортексират се за кратко и се центрофугират за няколко секунди на 600 x g. Към всяка от ДНК пробите се добавят 5 µl индекс i7, 5 µl индекс i5 и 20 µl Nextera Library Amplification Mix (NLM). Всяка епруветка се вортексира (1200 rpm, 1 мин) и центрофугира (280 x g, 1 мин), след което се слага в термален сайкълър с предварително загрят до 100°C капак и се пуска следната PCR програма:

- 72°C за 3 минути
- 98°C за 30 секунди
- 10 цикъла по:
  - 98°C за 10 секунди
  - 60°C за 30 секунди
  - 72°C за 30 секунди
- 72°C за 5 минути
- Изчакване на 10°C

#### Пречистване след първия PCR

Това пречистване се извършва за отстраняването на нежеланите реагенти от PCR реакцията.

След края на амплификацията всички епруветки се изваждат от термалния сайкълър и се центрофугират на 280 x g за 1 мин. Целият обем (50 µl) от всяка от тях се прехвърля в отделна ямка на нова плака. След продължително вортексиране (15 - 20 сек) на Sample Purification Beads към всяка ямка се добавят 90 µl от пречиствателните мъниста. Плаката

се поставя на шейкър за 1 мин на 1800 rpm, след което се инкубира на стайна температура за 10 мин. Следва центрофугиране (280 x g, 1 мин) и поставяне на магнитната стойка за 2 мин. Супернатантата (140 µl) се отстранява, след което следват две последователни измивания с 200 µl прясно приготвен 80% етанол с по 30 сек изчакване след всяко от тях. След премахване на остатъчния етанол плаката отново се оставя за сушене за 10 мин на стайна температура, след което се маха от магнита и към всяка ямка се добавят 27 µl RSB. Плаката се вортексира (1800 rpm, 1 мин), инкубира се (2 мин, стайна температура), центрофугира се (280 x g, 1 мин) и отново се поставя за 2 мин на магнита. От всяка ямка се прехвърлят 25 µl (2 пипетирания по 12.5 µl) от супернатантата, съдържаща пречистените ДНК фрагменти, в отделна PCR епруветка.

### **Измерване на пробите след първия PCR**

Концентрацията на всяка проба беше измервана посредством Qubit 2.0 Fluorometric Quantitation System. Всички получени концентрации бяха в диапазона 20 - 150 ng/µl. Най-вероятно разминаването в концентрациите на различните проби се дължи на качеството, продължителността на съхранение и фрагментираността на изходната ДНК. Пробата, изолирана от парафиново блокче, беше с значително по-ниска концентрация в сравнение с тези, изолирани от кръв или букална лигавица.

### **Първа хибридизация**

Преди първата хибридизация се приготвя обща ДНК библиотека (pool), съдържаща различно индексирани проби, която впоследствие да се пусне в една секвенционна реакция. От всяка проба се взимат 500 ng ДНК и се добавят в общия пул. Ако общият обем на смесените проби надвишава 40 µl, пулт се концентрира с помощта на вакуумен концентратор без прилагане на топлина. Ако обемът на пула е под 40 µl, се добавя необходимото количество RSB до 40 µl.

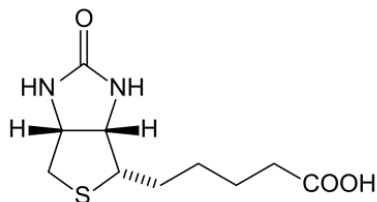
Капацитетът на секвенатора MiSeq и уникалното индексирание на всяка проба позволява в едно секвениране да се комбинират подготвените библиотеки на различни индивиди. Броят на пробите, които могат да се секвенират едновременно, зависи от размера на таргетния район и желаната дълбочина на секвениране. В едно секвениране могат да се комбинират до 12 различни библиотеки подготвени с панела TruSight Cancer, до 6 – с TruSight Inherited Disease и до 3 – с TruSight One при желана средна дълбочина на секвениране около 100 x.

Преди приготвянето на хибридизационната реакция Enrichment Hybridization Buffer (ЕНВ) се вортексира продължително до пълното ресуспендиране на кристалите в него. След това към всеки приготвен пул (40 µl) се добавят 50 µl ЕНВ, както и 10 µl от специфичния за всеки панел TruSight Content Set (CSO), който съдържа набора от олигосонди, комплементарни на таргетните райони, включени в панела. Следва вортексиране на хибридизационната смес на 1200 rpm за 1 мин и центрофугиране (280 x g, 1 мин), след което пулт/пуловете се поставят в термален сайкълър на следната програма:

- 95°C за 10 минути (денатурация)
- 18 цикъла по една минута, започващи от 94°C, като всеки следващ цикъл температурата спада с 2°C
- 58°C за минимум 1.5 и максимум 24 часа

За оптимизиране на ефикасността на хибридизацията продължителността на последната стъпка при първата хибридизация за всеки пул беше между 15 и 20 часа. След

денатурацията (Фиг. 1B) комплементарните олигосонди се свързват само с ДНК фрагментите, съдържащи таргетни райони (Фиг. 1C). Всяка олигосонда е биотинилирана - т.е. представлява нуклеотидна секвенция, към която ковалентно е прикрепена молекулата биотин (витамин B7) (Фиг. 3).

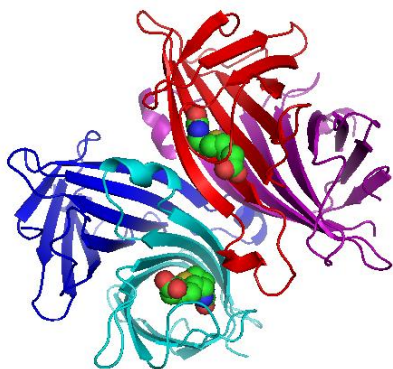


**Фигура 3** Структурата на биотина, наричан още витамин B7, който е ковалентно свързан към нуклеотидните секвенции, комплементарни на таргетните райони от всеки панел

### Първо извличане на таргетните райони (Capture)

По време на извличането на таргетните райони към хибридизационната реакция се добавят магнитни мъниста, към повърхността на които са прикрепени тетрамерни форми на белтъка стрептавидин. Той е с молекулна маса от 52.5 kDa и е изолиран от бактерията *Streptomyces avidinii*. Стрептавидинът и биотинът (Фиг.4) образуват една от най-силните нековалентни връзки в природата с дисоциационна константа ( $K_d$ )  $\approx 10^{-14}$  mol/L (Green, 1975). Така стрептавидиновите магнитни мъниста се свързват с биотинилираните сонди, които от своя страна са се хибридизирали с таргетните райони (Фиг. 1D).

След края на хибридизацията всеки пул се центрофугира (280 x g, 1 мин) и съдържанието му (~100  $\mu$ l) се прехвърля в отделна ямка на нова плака. След като бъдат добре вортексирани, към всеки пул се добавят 250  $\mu$ l Streptavidin Magnetic Beads (SMB). Плаката се вортексира (1200 rpm, 5 мин) и се инкубира на стайна температура за 25 мин. По време на тази стъпка се осъществява взаимодействието между стрептавидина и биотина. След инкубацията плаката се центрофугира (280 x g, 1 мин) и се поставя за 2 мин на магнитната стойка. Супернатантата се премахва, без да се влиза в контакт с магнитните мъниста, след което плаката се сваля от магнита.



**Фигура 4** Триизмерна структура на тетрамерен стрептавидин с два свързани биотина.

На базата на това взаимодействие се основава принципът за изолиране на фрагментите, съдържащи таргетни райони, от останалите.

Следват две последователни измивания за отстраняване на неспецифични взаимодействия на стрептавидиновите мъниста и изолиране само на таргетните райони. Enrichment Wash Solution (EWS) се темперира до стайна температура и се вортексира продължително. 200  $\mu$ l от разтвора се добавят към утаените мъниста от всеки пул, след което плаката се слага на шейкър за 4 мин на 1800 rpm. След вортексирането библиотеките се ресуспендират

допълнително чрез пипетиране на целия им обем 10-15 пъти. Плаката се инкубира за 30 мин на предварително загрят до 50°C термоблок. След инкубацията плаката се изважда и веднага се слага за 2 мин на магнитната стойка. Супернатантата се маха и плаката се сваля от магнита, след което наново се накапват 200 µl EWS и отново се повтарят същите последователни стъпки.

След повторното премахване на супернатантата след втората инкубация с EWS следва елуирането на таргетните райони от стрептавидин-биотиновия комплекс (Фиг 5E). За всеки пул се приготвя елуционен премикс, съдържащ 28.5 µl Enrichment Elution Buffer 1 (EE1) и 1.5 µl 2N NaOH (HP3). След кратко центрофугиране се добавят 23 µl от премикса към утаените стрептавидинови мъниста на всеки пул. Следва вортексиране на шейкър (1800 rpm, 2 мин), инкубация за 2 мин на стайна температура, при която става самото елуиране на ДНК фрагментите, и центрофугиране (280 x g, 1 мин). Плаката отново се поставя за 2 мин на магнит, като този път ДНК фрагментите не са свързани с утаените мъниста, а се намират в супернатантата. От нея се взимат 21 µl и се прехвърлят в нова PCR епруветка. Към тях се добавят 4 µl Elute Target Buffer 2 (ET2) за неутрализиране на елуирането. Обогащението на таргетни райони пул се вортексира за 1 мин на 1800 rpm, след което се центрофугира (280 x g, 1 мин).

### **Втора хибридизация**

След първото извличане на таргетните райони следва повторна хибридизация, при която елуираната библиотека отново се смесва с олигосонди за допълнително обогатяване и повишена специфичност на таргетните райони.

Към 25-те µl елуирана библиотеката се добавят 15 µl Resuspension Buffer, 50 µl ЕНВ (след вортексиране и ресуспендиране на кристалите) и 10 µl от съответния TruSight Content Set (CSO), съдържащ олигосондите. Следва вортексиране на хибридизационната реакция (1200 rpm, 1 мин) и центрофугиране (280 x g, 1 мин), след което пулт се поставя в термален сайкълър на следната програма:

- 95°C за 10 минути (денатурация)
- 18 цикъла по една минута, започващи от 94°C, като всеки следващ цикъл температурата спада с 2°C
- 58°C за минимум 14.5 и максимум 24 часа

### **Второ извличане на таргетните райони (Capture)**

Следва второ извличане на таргетните райони, при което се следват същите стъпки, както при първото.

### **Пречистване на обогатената библиотека**

След второто извличане на таргетните райони елуираната библиотека се пречиства преди финалната PCR амплификация.

Обемът на библиотеката (25 µl) се прехвърля в нова ямка на плака. След продължително вортексиране към библиотеката се добавят 45 µl Sample Purification Beads. Плаката се вортексира (1800 rpm, 1 мин) и се инкубира за 10 мин на стайна температура, след което се центрофугира (280 x g, 1 мин) и се поставя на магнитна стойка за 2 мин. Супернатантата (70 µl) се премахва, след което се извършват две последователни измивания с 200 µl прясно приготвен 80% етанол с по 30 сек изчакване след всяко от тях.

След премахване на остатъчния етанол плаката се оставя за 10 мин на стайна температура, за да изсъхнат утаените мъниста, след което се маха от магнита. Добавят се 27.5 µl RSB. Плаката се вортексира (1800 rpm, 1 мин), инкубира се (2 мин, стайна температура), центрофугира се (280 x g, 1 мин) и отново се поставя за 2 мин на магнита. 25 µl (2 пипетирания по 12.5 µl) от супернатантата, съдържаща пречистените ДНК фрагменти, се прехвърлят в отделна PCR епруветка.

### **Втора PCR амплификация**

По време на втората PCR амплификация се амплифицират специфично само таргетните райони, извлечени след двете хибридизации.

След кратко вортексиране към библиотеката се добавят 5 µl PCR Primer Cocktail (PPC) и 20 µl Nextera Enrichment Amplification Mix (NEM). Следва вортексиране (1200 rpm, 1 мин), центрофугиране (280 x g, 1 мин) и пускане на следната PCR програма:

- 98°C за 30 секунди
- 12 цикъла по:
  - 98°C за 10 секунди
  - 60°C за 30 секунди
  - 72°C за 30 секунди
- 72°C за 5 минути
- Изчакване на 10°C

### **Пречистване след втория PCR**

По време на тази стъпка амплифицираната библиотека, съдържаща таргетните райони, се пречиства финално преди секвенирането.

PCR епруветката се вади от термалния сайкълър и се центрофугира (280 x g, 1 мин), след което съдържанието ѝ (50 µl) се прехвърля в нова ямка на плака. Добавят се 90 µl Sample Purification Beads. Плаката се вортексира (1800 rpm, 1 мин) и се инкубира за 10 мин на стайна температура. Следва центрофугиране (280 x g, 1 мин) и поставяне на магнитната стойка за 2 мин. Супернатантата (140 µl) се премахва, след което утаените мъниста се промиват два последователни пъти с 200 µl прясно приготвен 80% етанол с по 30 сек изчакване след всяко от тях. След премахване на етанола плаката се инкубира за 10 мин на стайна температура, за да изсъхнат утаените мъниста, след което се маха от магнита. Добавят се 32 µl RSB. Следва вортексиране (1800 rpm, 1 мин), инкубация (2 мин, стайна температура), центрофугиране (280 x g, 1 мин) и поставяне на плаката за 2 мин на магнитната стойка. 30 µl (2 пипетирания по 15 µl) от супернатантата, съдържаща таргетните ДНК фрагменти, се прехвърлят в отделна PCR епруветка. С тази стъпка завършва процесът на приготвяне на библиотеките за секвениране.

## Определяне на концентрацията на библиотеките за секвениране

Преди зареждане на секвенционната реакция е необходимо да се определи концентрацията на всяка от пригответените библиотеки. Използван бе протоколът *KAPA Library Quantification Kit for Illumina platforms* на KAPA Biosystems.

Приготвят се две разредки на пригответената библиотека - 1:1000 и 1:2000. 1  $\mu\text{l}$  от библиотеката се смесва с 999  $\mu\text{l}$  RSB. След 15 сек вортексиране се взимат 100  $\mu\text{l}$  от първата разредка (1:1000) и се смесват с 100  $\mu\text{l}$  RSB, за да се получи втората разредка от 1:2000.

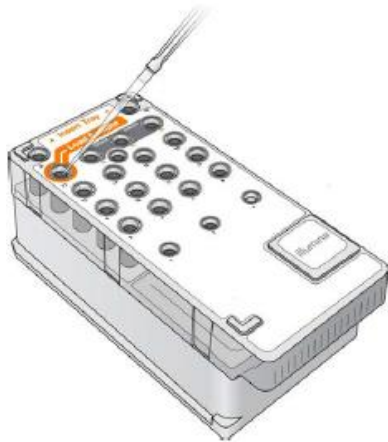
Реагентът 10X Primer Premix съдържа праймери, комплементарни на адапторните райони в краищата на всеки фрагмент от библиотеката. 1 ml 10X Primer Premix се смесва с 5 ml 2X KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix, за да се приготви финалният мастър микс. В реакционната смес за определяне на концентрацията се смесват 12  $\mu\text{l}$  мастър микс, 4  $\mu\text{l}$  PCR-grade  $\text{H}_2\text{O}$  и 4  $\mu\text{l}$  от разреdkите на библиотеката или от ДНК стандартите. Използват се 6 ДНК стандарти със следните концентрации: 20 pM/ $\mu\text{l}$ , 2 pM/ $\mu\text{l}$ , 0.2 pM/ $\mu\text{l}$ , 0.02 pM/ $\mu\text{l}$ , 0.002 pM/ $\mu\text{l}$  и 0.0002 pM/ $\mu\text{l}$ . В 48-ямякова плака се накапват по три реакции за всяка от двете разредки на библиотеката и за всеки от шестте стандарта. Пуска се и една негативна контрола, в която вместо ДНК се добавя RSB. Плаката се поставя в qPCR система Illumina Eco и се пуска следната програма:

- 95°C за 5 минути
- 35 цикъла по:
  - 95°C за 30 секунди
  - 60°C за 45 секунди

За изчисляване на концентрацията на библиотеката бе ползвана по-малката разредка от 1:1000. Концентрацията се изчислява по формулата:  $C \times 452/500 \times 1000$ , където  $C$  е концентрацията на разреdkата, установена от qPCR-а, 452 е дължината в бази на стандартите, а 500 бази е средната дължина на фрагментите от пригответените библиотеки.

## Подготовка за секвениране

За всяко от секвениранятията беше използван MiSeq Reagent Kit v2, включващ стандартна поточна (flow) клетка за 500 цикъла. При всяко секвениране flow клетката беше зареждана с концентрация в диапазона 15-25 pM/ $\mu\text{l}$ . Подобни концентрации дават оптимална гъстота на кльстърри по време на секвенирането. След определяне на концентрацията всяка от библиотеките е разреждана до 3-5 nM/ $\mu\text{l}$ . За денатурация бе ползвана 0.2 N NaOH. 5  $\mu\text{l}$  от пригответената библиотека се смесва с 5  $\mu\text{l}$  0.2N NaOH. Сместа се инкубира за 5 мин на стайна температура, след което към нея се добавя 990  $\mu\text{l}$  хибридизационен буфер HT1. Полученият 1 ml се накапва в предварително размразената на лед реагентна касета (Фиг. 5), съдържаща необходимите реагенти за секвенирането. Използвани бяха MiSeq Reagent Kit v2. След изплакване поточната клетка (Фиг. 6), на която се извършва кльстър генерирането и разчитането на базите, се поставя на мястото си в MiSeq апарата. Поставят се също и PR бутилката, съдържаща буфер за изплакване, и реагентната касета, след което се дава начало на секвенирането от контролния софтуер.



**Фигура 5** Реагентната касета с резервоара, в който се добавя приготвената библиотека от таргетни секвенции



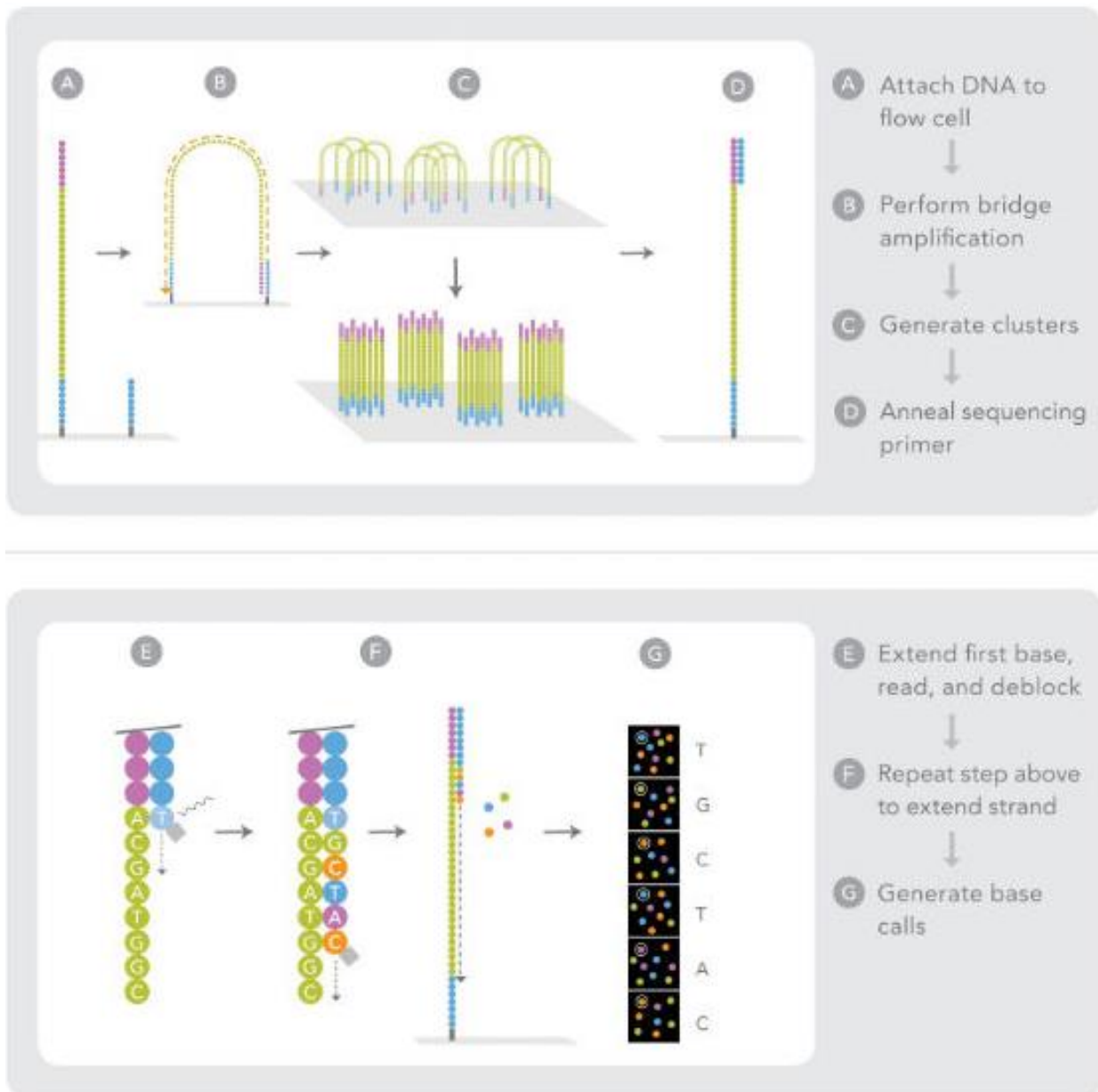
**Фигура 6** Поточната клетка, на която се извършва целият процес на секвениране, заедно с държача

### 3.3.2.3. Секвениране

В началото на процеса на секвенирането чрез микроканалчета подготвените ДНК фрагменти навлизат в поточната клетка. По повърхността ѝ ковалентно са фиксирани огромен брой олигонуклеотиди, комплементарни на адапторните секвенции, добавени по време на приготвянето на библиотеките. ДНК фрагментите се закрепят за поточната клетка (Фиг. 7А), след което чрез така наречената мостова (bridge) амплификация (Фиг. 7В) се генерират клъстърни. Така се създават голям брой клъстърни, всеки съдържащ хиляди копия на един специфичен ДНК фрагмент (Фиг. 7С). След генерирането на клъстърните започва самото разчитане на нуклеотидната последователност. Секвенционни праймери, комплементарни на част от адапторната секвенция, се хибридизират с намножените фрагменти (Фиг. 7D). Секвенирането се извършва по време на синтез (sequencing-by-synthesis) чрез използването на dNTP-та, всеки от които е свързан с флуоресцентно белязан терминатор. При инкорпориране на дадена база (Фиг. 7E) флуоресцентният сигнал се отчита от лазер и базата се идентифицира. След това терминаторът се отстранява, за да позволи инкорпорирането на следващата флуоресцентно белязана база и удължаването на веригата (Фиг. 7F). Крайният резултат е генерирането на секвенции с висока степен на прецизност (Фиг. 7G).

След приключване на разчитането на базите започва първичният анализ на получените секвенции от самия секвенатор чрез софтуера MiSeq Reporter, който извършва демултиплексиране и разпределяне на секвенциите за всеки един от пациентите в отделна директория. Освен това получените секвенции се подравняват с референтния човешки геном (версия GRCh37) и несъответствията се отчитат като варианти. За подравняване на последователностите спрямо референтния геном е ползван алгоритъма на Burrows-

Wheeler (Li H, Durbin R. 2009) или Isaac, а за идентифициране на вариантите (еднонуклеотидни замени, делеции / инсерции с дължина до 25 бази) - приложението GATK Variant Caller или Isaac Variant Caller. Данните от всяко секвениране бяха също така качвани и в облака на Illumina - BaseSpace, където впоследствие могат да се извършват различен тип допълнителни анализи.



**Фигура 7** Стъпките в процеса на секвениране с технологията на Illumina (адаптирана от Illumina, 2008)

### 3.4. Анализ на данните

За визуализация на получените прочити от секвенирането беше използвана програмата GenomeBrowse (ver.2.0.7) на Golden Helix. За филтруване на вариантите беше използван софтуерът Variant Studio (ver.2.1) на Illumina. Програмата предлага различни критерии за филтриране на вариантите като честота в различни популации и функционално последствие и дава възможност за генериране на собствена база данни с анотация на установените варианти. При търсене на патологични мутации филтрите бяха нагласяни на ниска глобална честота <1% и отчитане само на вариантите с постигнато висококачествено секвениране на нуклеотидната секвенция ( $Q>30$ , минимална дълбочина на секвениране  $>20$ ). Честоти на варианти също така бяха сверявани и с базата данни на Exome Variant Server на NHLBI Exome Sequencing Project. За оценка на варианти с потенциален ефект върху сплайсинга на иРНК беше ползвано приложението Human Splicing Finder v.3.0 (<http://www.umd.be/HSF3/>).

Също така ползвани бяха и базите данни: ClinVar, COSMIC, OMIM, UniProt.

**ClinVar** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) съдържа информация за връзката на определен човешки вариант с конкретен фенотип. Базата данни дава сведения за клиничната значимост на вариантите, като също така цитира и проучванията, в които вариантът е бил изследван, както и заключението на колектива.

**COSMIC** (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) е база данни, в която се регистрират соматични мутации, детектирани в различни видове туморна тъкан.

**OMIM** (Online Mendelian Inheritance in Man) (<http://www.omim.org/>) включва обширен каталог на известните гени и болести с генетична компонента, наблюдавани при човека. Базата данни дава подробна информация за конкретните генетични дефекти при дадено заболяване.

**UniProt** (<http://www.uniprot.org/>) е каталог, съсредоточен върху протеините от различни организми. Включва информация за аминокиселинната последователност, различните генни транскрипти, функционалните домени на протеините, както и за детектирани варианти в секвенцията.

За оценка на потенциалните функционални последици на варианти, които водят до аминокиселинна замяна в протеина и не са анотирани в ClinVar, COSMIC, OMIM, HGMD или в локус специфичните бази данни, е ползвано приложението MetaSVM Pred.

**MetaSVM Pred** (<https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP/>): представлява бинарна обобщена предикция, основана на SVM (Support vector machine, support vector networks), категоризираща конкретния вариант като "T(olerated)" (толеран) или "D(amaging)" (вреден). Границата между двете категории "D" и "T" е 0. Граничната стойност на ранга между "D" и "T" е 0.83357. Оценката на ефекта на варианта обобщава оценките на 10 предиктора: SIFT, PolyPhen-2 HDIV, PolyPhen-2 HVAR, GERP++, MutationTaster, Mutation Assessor, FATHMM, LRT, SiPhy, PhyloP и отчита честотата на варианта наблюдавана в популациите изследвани по проекта 1000 генома (<http://www.1000genomes.org/>). Стойностите за ранга варират от 0 до 1, като по-голяма стойност показва, че еднонуклеотидния вариант е по-вероятно да е вреден (Liu et al. 2011; Liu et al. 2013).

### **3.5. Критерии за класифициране на установените редки и нови генетични варианти**

Съставена е собствена база данни с редки варианти (с популационна честота по-малка от 1%). Секвенирането при пациентите и здравите индивиди е извършено с гении панели, включващи предимно гени, асоциирани с конкретни фенотипи. Секвенционните варианти са класифицирани в 5 категории: патологични, вероятно патологични, бенигнени, вероятно бенигнени и варианти с неизвестно клинично значение, като са приложени следните критерии:

**Патологични варианти** (в гени асоциирани с конкретен болестен фенотип):

А) Варианти, които по предикция водят до загуба на функция на кодиращия протеин (независимо от това дали са съобщавани преди при пациенти със заболяването):

- с изместване на рамката на четене (frameshift)
- с образуване на преждевременен стоп-кодон (nonsense)
- променящи консервативните места за сплайсинг на границата екзон-интрон (в интрон на позиция +1, +2 и -1, -2)
- променящи инициаторния кодон
- променящи обичайния стоп-кодон

Б) Варианти, водещи до замяна на една аминокиселина с друга (missense), отговарящи на едно от следните условия

- с подходящ функционален анализ е потвърдено, че вариантът води до намалена функция на протеина (загуба на функция), или до променена функция на протеина (gain of function)
- има литературни данни, че вариантът води до болестен фенотип
- вариантът е установяван при множество индивиди засегнати от заболяването и показва косегрегация с болестта в много семейства
- потвърдено чрез функционален анализ нарушение на сплайсинга (за интронни и синонимни варианти)

**Вероятно патологични варианти:**

За рецесивни състояния:

- диагнозата е потвърдена чрез биохимичен анализ или фенотипът на пациента е специфичен за заболяването;
- вариантът е локализиран в хомоложната хромозома (транс) спрямо друг известен патологичен или вероятно патологичен вариант;
- вариантът засяга еволюционно консервирана нуклеотидна и/или аминокиселинна позиция;
- вариантът не присъства в dbSNP, EVS (Exome Variant Server) или в друга публична база данни с честота съответстваща на бенигнен вариант;

За доминантни състояния:

- вариантът ко-сегрегира с фенотипа в изследваното семейство;
- изследване на родителите показва, че вариантът е възникнал de novo;

- вариантът не присъства в dbSNP, EVS (Exome Variant Server) или в друга публична база данни с честота съответстваща на бенигнен вариант;

#### **Бенигнени варианти:**

- вариантът е публикуван в dbSNP, EVS, локус специфични бази данни или присъства в собствената база данни с честота по-висока от очакваната за патологичен алел въз основа на разпространението на заболяването в популацията и типа на унаследяване;
- вариантът е наблюдаван в контролна популация с висока честота, несъответна за патологичен вариант;
- има литературни данни в подкрепа на неутралния характер на варианта;

#### **Вероятно бенигнени варианти:**

- вариантът е откриван при множество индивиди без изява на фенотипа в хетерозиготно (за доминантни заболявания) или в хомозиготно състояние (за рецесивни заболявания);
- вариантът е откриван скачен с известен патологичен алел при множество неродствени индивиди;
- вариантът е откриван при членове на семейството не проявяващи фенотипа (за доминантни заболявания);

#### **Варианти с неизвестно клинично значение:**

- ако вариантът не отговаря на критериите за класификация в някоя от другите четири категории, се определя като вариант с неизвестно клинично значение;
- вариантът не е публикуван в HGMD, локус специфични бази данни, не е съобщаван в литературата, dbSNP или EVS;
- вариантът е публикуван в dbSNP или EVS, но алелната честота е недостатъчна да се изключи клинична значимост, като се отчита типа на унаследяване и тежестта на заболяването;
- вариантът е наблюдаван при един индивид и данните за сегрегация и/ или функционален анализ са недостатъчни;
- вариантът е наблюдаван при един индивид, но клиничната информация е недостатъчна;
- варианти, за които информацията е противоречива; вариантите в гени, за които е неизвестно дали са свързани със заболявания;

## 4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 4.1.NGS анализ на здрави индивиди с TruSight One панел

Изследването с NGS технология на редки болести стартира с анализ на ДНК проби на 10 здрави лица, приети за контроли. Целта е да се въведе метода за секвениране от ново поколение чрез платформата на Illumina и да се получат изходни данни за лица от българската популация по отношение броя и вида на генетичните варианти при секвениране на генен панел от 4813 таргетни гена (TruSight One, Illumina). Резултатите от подобно изследване биха били полезни както за оптимизиране условията на работа, проверка на възпроизводимостта на метода (количество и качество на получените секвенции), така и за оптимизиране подхода за анализ на резултатите. Контролната извадка е много малка, за да послужи за определяне на алелни/генотипни честоти, но може да даде ориентир за най-честите полиморфни алелни варианти в нашата популация. Болшинството гени, включени в панела, не са изследвани досега при българи и алелните/генотипните честоти дори на полиморфни варианти в тях са неизвестни.

Изследването показва, че всеки носи средно 3,98% редки варианти. Средно 0,98% от установените варианти не са аотирани в dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) и вероятно част от тях са нови. При всеки средно 0,05% от откритите варианти са аотирани като известни патологични, асоциирани с моногенни заболявания и предразположения, а други 0,05% - с фармакогенетични дефекти (Табл 2, 3). Установени са и варианти, които предразполагат към заболявания, проявяващи се в зряла възраст (Табл 4).

#### 4.1.1. Патологични варианти и фармакогенетични дефекти, установени в контролната група индивиди

В контролната група бяха установени 48 различни варианти, категоризирани като патологични, в гени, асоциирани с конкретен фенотип на моногенно заболяване или предразположение (Табл. 4). Петнадесет от вариантите са асоциирани с автозомно доминантни фенотипи, 29 – с автозомно-рецесивни фенотипи, един – с Х-свързан рецесивен фенотип, а три от вариантите - както с доминантен, така и с рецесивен фенотип.

Пет от вариантите (*ABCA4* p.Val2050Leu, *AMPD1* p.Gln45Ter, *CPN1* p.Gly178Asp, *CYP11B2* p.Val386Ala, *HPD* p.Ala33Thr) са установени при двама от изследваните, два варианта (*ADA* p.Asp8Asn, *COL18A1* p.Asp1440Asn) - при трима и един (*GNPAT* p.Asp519Gly) – при шестима, което показва, че някои алели, определяни като патологични, вероятно са чести в нашата популация. Пет от вариантите вероятно са нови, тъй като не са съобщавани досега в специализираните бази данни: *GJA5* p.Asp266ArgfsTer3, *HARS2* p.Met196ValfsTer2, *NLRP7* p.Gln517Ter, *OTOA* p.Tyr548Ter, *PKP1* c.1295+1G>A.

Изследването на контролите разкри общо 14 различни полиморфни алела в 8 гена, асоциирани с фармакогенетични дефекти (табл. 5). Полиморфни алели в гена *NAT2*, свързани с намалена ензимна активност, бяха установени при всички изследвани контроли, като един от изследваните се оказа носител на 4 минорни алели (един в хомозиготно състояние и други два в хетерозиготно).

**Таблица 2.** Среден брой и характеристика на вариантите, които се носят от здрави индивиди, изследвани с TruSight One панел

№	Общ брой	Редки <1%		Без номер в dbSNP		Известни патологични		Вероятно патологични		Известни фармакогенетични дефекти	
		бр	%	бр	%	бр	%	бр	%	бр	%
1	6165	178	2.88	46	0.74	3	0.04	3	0.04	2	0.03
2	6536	334	5.11	53	0.81	4	0.06	5	0.07	4	0.06
3	8147	354	4.34	80	0.98	4	0.04	9	0.11	5	0.06
4	8533	420	4.92	97	1.13	7	0.08	18	0.21	3	0.03
5	8399	371	4.41	97	1.15	4	0.04	9	0.10	4	0.04
6	7881	250	3.17	54	0.68	5	0.06	16	0.20	3	0.03
7	6788	214	3.15	64	0.94	6	0.08	17	0.25	2	0.02
8	5679	183	3.22	52	0.91	3	0.05	9	0.15	3	0.05
9	7677	273	3.55	84	1.09	2	0.02	7	0.09	7	0.09
10	7795	355	4.55	96	1.23	4	0.05	13	0.16	3	0.03
<b>Средно</b>	<b>7360</b>	<b>293.2</b>	<b>3.98</b>	<b>72.3</b>	<b>0.98</b>	<b>4.2</b>	<b>0.05</b>	<b>10.6</b>	<b>0.14</b>	<b>3.6</b>	<b>0.05</b>

**Таблица 3.** Генетични варианти, според ефекта на генетичното нарушение върху структурата на кодиращия протеин или иРНК (TruSight One панел)

№	Missense	Frame shift	Inframe del / ins	Splice AS / DS	Non-sense	Stop lost	Initiation codon
1	2134	34	22 / 15	2 / 3	18	5	2
2	2250	26	21 / 22	2 / 4	18	7	1
3	2749	38	25 / 27	5 / 3	18	8	1
4	2973	41	26 / 19	4 / 7	23	6	3
5	2876	35	32 / 29	7 / 5	20	9	1
6	2753	34	19 / 20	3 / 3	27	7	4
7	2351	36	17 / 16	4 / 3	21	7	3
8	1973	26	17 / 16	4 / 4	16	6	2
9	2595	37	16 / 19	5 / 2	21	6	3
10	2641	32	24 / 20	7 / 6	17	6	3
<b>Средно</b>	<b>2529.5</b>	<b>33.9</b>	<b>21.9 / 20.3</b>	<b>4.3 / 4</b>	<b>19.9</b>	<b>6.7</b>	<b>2.3</b>

Missense – вариант, водещ до замяна на аминокиселина в полипептидната верига, frameshift – вариант водещ до изместване на рамката на четене, in frame del/ins – инсерционно-делеционен вариант със запазване на рамката на четене, Splice AS/DS – вариант променящ акцепторното (AS) или донорното сплайс място (DS), non-sense – нуклеотидна замяна, водеща до замяна на кодон, кодиращ аминокиселина със стоп-кодон, stop lost – нуклеотидна замяна, водеща до замяна на стоп-кодон с такъв кодиращ аминокиселина, Initiation codon – нуклеотидна замяна, водеща до замяна на старт-кодона с друг;

**Таблица 4.** Патологични варианти, асоциирани с моногенни заболявания, установени при възрастни контроли:

Ген	Хр №	Вариант	Генотип (бр. инд.)		Асоцииран фенотип	Унаследяване	MAF NHLBI ESP6500
			M/N	M/M			
<i>ABCA4</i>	1	c.6148G>C, p.Val2050Leu, rs41292677	2	0	Stargardt disease 1	AP	G: 0.003691
<i>ABCA4</i>	1	c.1964T>G, p.Phe655Cys, rs200692438	1	0	Stargardt disease 1	AP	C: 0.000154
<i>ADA</i>	20	c.22G>A, p.Asp8Asn, rs11555565, rs73598374	3	0	Adenosine deaminase 2 allozyme	AP	T: 0.030801
<i>AMPD1</i>	1	c.133C>T, p.Gln45Ter, rs17602729	2	0	Muscle AMP deaminase deficiency	AP	A: 0.094586
<i>BBS2</i>	16	c.209G>A, p.Ser70Asn, rs4784677	1	0	Bardet-Biedl syndrome 2	AP	T: 0.00554
<i>BTBD</i>	3	c.1368A>C, p.Gln456His, rs80338685	1	0	Biotinidase deficiency	AP	C: 0.001
<i>C8B</i>	1	c.1282C>T, p.Arg428Ter, rs41286844	1	0	Complement component 8 deficiency type 2	AP	A: 0.001198
<i>CACNB4</i>	2	c.311G>T, p.Cys104Phe, rs1805031	1	0	Episodic ataxia, type 5; Epilepsy, generalized idiopathic 9	АД	A: 0.000739
<i>CHIT1</i>	1	c.304G>A, p.Gly102Ser, rs2297950	1	2	Chitotriosidase deficiency	AP	T: 0.285253
<i>COL18A1</i>	21	c.4318G>A, p.Asp1440Asn, rs12483377	3	0	Knobloch syndrome 1	AP	A: 0.071022
<i>COL4A5</i>	X	c.4246C>T, p.Arg1416Cys, rs104886270	1	0	Alport syndrome	XP	T: 0.000095
<i>COL5A1</i>	9	c.1588G>A, p.Gly530Ser, rs61735045	1	0	Ehlers-Danlos syndrome, type 2	АД	A: 0.031601
<i>CPNI</i>	10	c.533G>A, p.Gly178Asp, rs61751507	2	0	Anaphylotoxin inactivator deficiency	AP	T: 0.035445
<i>CREBBP</i>	16	c.2728A>G, p.Thr910Ala, rs143247685	1	0	Rubinstein-Taybi syndrome;	АД	C: 0.002309
<i>CSRP3</i>	11	c.136A>C, p.Ser46Arg, rs137852765	1	0	Familial hypertrophic cardiomyopathy 12	АД	G: 0.000231
<i>CYP11B2</i>	8	c.1157T>C, p.Val386Ala,	2	0	Corticosterone methyloxidase type 1/ type	AP	G: 0.072274

		rs61757294			2 deficiency		
<i>DHCR7</i>	11	c.724C>T, p.Arg242Cys, rs80338856	1	0	Smith-Lemli-Opitz syndrome	AP	A: 0.000154
<i>ERCC4</i>	16	c.2395C>T, p.Arg799Trp, rs121913049	1	0	Xeroderma pigmentosum, type f	AP	T: 0.00077
<i>FOLR1</i>	11	c.493+2T>C, rs144637717	1	0	Neurodegeneration due to cerebral folate transport deficiency	AP	C: 0.002079
<i>GALT</i>	9	c.1132A>G, p.Ile378Val, rs111033819	1	0	Deficiency of UDPglucose- hexose-1-phosphate uridylyltransferase	AP	G: 0.000231
<i>GJA5</i>	1	<b>c.795dupC, p.Asp266ArgfsTer3</b>	1	0	Atrial fibrillation, familial, 11;	AД	na
<i>GNPAT</i>	1	c.1556A>G, p.Asp519Gly, rs11558492	4	2	Rhizomelic chondrodysplasia punctata type 2	AP	G: 0.167154
<i>GNRHR</i>	4	c.317A>G, p.Gln106Arg, rs104893836	1	0	Hypogonadotropic hypogonadism 7 without anosmia: Isolated lutropin deficiency	AP	C: 0.002537
<i>GORAB</i>	1	c.995T>G, p.Leu332Ter, rs145659887	1	0	Geroderma osteodysplasticum	AP	G: 0.000077
<i>HARS2</i>	5	<b>c.586_587delAT, p.Met196ValfsTer2</b>	1	0	?Perrault syndrome 2	AP	na
<i>HEXA</i>	15	c.805G>A, p.Gly269Ser, rs121907954	1	0	Gm2-gangliosidosis, adult	AP	T: 0.000308
<i>HEXB</i>	5	c.185C>T, p.Ser62Leu, rs820878	1	0	Sandhoff disease, infantile type	AP	T: 0.030658
<i>HPD</i>	12	c.97G>A, p.Ala33Thr, rs1154510	2	0	4-Alpha- hydroxyphenylpyruvate hydroxylase deficiency	AД, AP	T: 0.099108
<i>HPS5</i>	11	c.3293C>T, p.Thr1098Ile, rs61884288	1	0	Hermansky-Pudlak syndrome 5	AP	A: 0.027264
<i>INSR</i>	19	c.3034G>A, p.Val1012Met, rs1799816	1	0	Diabetes mellitus type 2	AД	T: 0.006382
<i>KRT81</i>	12	c.846T>A, p.Tyr282Ter, rs138597671	1	0	Monilethrix	AД	T: 0.001307
<i>LPL</i>	8	c.953A>G, p.Asn318Ser, rs268	1	0	Hyperlipidemia, familial combined	AД	G: 0.013378
<i>MEFV</i>	16	c.2084A>G, p.Lys695Arg, rs104895094	1	0	Familial Mediterranean fever	AP	C: 0.00254
<i>NLRP7</i>	19	<b>c.1549C&gt;T, p.Gln517Ter</b>	1	0	Hydatidiform mole, recurrent, 1	AP	na
<i>OTOA</i>	16	<b>c.1644T&gt;G, p.Tyr548Ter</b>	1	0	Deafness, autosomal recessive 22	AP	na

<b>PKP1</b>	1	<b>c.1295+1G&gt;A</b>	1	0	Ectodermal dysplasia/ skin fragility syndrome;	AP	na
<b>RPI</b>	8	c.1118C>T, p.Thr373Ile, rs77775126	1	0	Retinitis pigmentosa 1	АД, AP	T: 0.011687
<b>RYR1</b>	19	c.13673G>A, p.Arg4558Gln, rs118192130	1	0	Central core disease	АД, AP	A: 0.000077
<b>SCN9A</b>	2	c.2971G>T, p.Val991Leu, rs4369876	1	0	Neuropathy, small fiber	АД	A: 0.00357
<b>SCN9A</b>	2	c.2794A>C, p.Met932Leu, rs12478318	1	0	Neuropathy, small fiber	АД	G: 0.003383
<b>SCNN1A</b>	12	c.1654T>C, p.Trp552Arg (p.Trp493Arg), rs5742912	1	0	Bronchiectasis with or without elevated sweat chloride 2	АД	G: 0.017453
<b>SCNN1G</b>	16	c.547G>A, p.Gly183Ser, rs5736	1	0	Bronchiectasis with or without elevated sweat chloride 3	АД	A: 0.012698
<b>SEC23A</b>	14	c.2104A>G, p.Met702Val, rs138568622	1	0	Craniolenticulosutural dysplasia;	AP	C: 0.000308
<b>SH3TC2</b>	5	c.505T>C, p.Tyr169His, rs80359890	1	0	Mononeuropathy of the median nerve, mild: Charcot-Marie-Tooth disease, type 4C;	АД, AP	G: 0.002384
<b>SLC6A20</b>	3	c.596C>T, p.Thr199Met, rs17279437	1	0	Iminoglycinuria, digenic: Hyperglycinuria	AP	A: 0.073244
<b>SLC9A3R1</b>	17	c.673G>A, p.Glu225Lys, rs119486097	1	0	Nephrolithiasis/ osteoporosis hypophosphatemic, 2	АД	A: 0.002384
<b>SPTAI1</b>	1	c.2909C>A, p.Ala970Asp, rs35948326	2	0	Spherocytosis, type 3	AP	T: 0.03613
<b>WFS1</b>	4	c.1123C>T, p.Arg375Cys, rs200095753	1	0	Wolfram-like syndrome, {Diabetes mellitus, noninsulin-dependent, association with};	АД	na

В колонката „Генотип“ е посочен броят на изследваните лица, които са хетерозиготни носители (M/N) и хомозиготи (M/M) по съответния минорен алел. MAF NHLBI ESP6500 – глобална честота на минорния алел публикувана в базата данни на NHLBI Exome Sequencing Project, посоченият нуклеотид съответства на минорния алел в геномната ДНК; na – вариантът не е установяван при лицата изследвани по проекта NHLBI ESP6500; АД – автозомно доминантен тип на унаследяване, AP – автозомно-рецесивен тип на унаследяване, XP – X-свързан рецесивен тип на унаследяване;

**Таблица 5.** Генетични варианти, асоциирани с фармакогенетични дефекти, установени при възрастни контроли.

Ген	Хр №	Вариант	Генотип		Асоцииран ФГД	Унаследяване	MAF
			M/N	M/M			
<i>ADRB1</i>	10	c.1165G>C p.Gly389Arg rs1801253	5	2	Congestive heart failure and beta-blocker response, modifier of		G: 0.2983
<i>ADRB2</i>	5	c.491C>T p.Thr164Ile rs1800888	1	0	Beta-2-adrenoreceptor agonist, reduced response to		T: 0.0040
<i>CYP2C9</i>	10	c.430C>T p.Arg144Cys rs1799853	4	0	Warfarin response	AP	T: 0.0479
<i>CYP2C9</i>	10	c.1075A>C, p.Ile359Leu rs1057910	2	0	Warfarin response, Glipizide poor metabolizer, Tolbutamide poor metabolizer, Phenytoin response	AP	C: 0.0485
<i>CYP2D6</i>	22	c.506-1G>A, CYP2D6*4, rs3892097	1*	0	Debrisoquine, poor metabolism of	AP	T: 0.15105
<i>CYP2D6</i>	22	c.100C>T p.Pro34Ser, CYP2D6*10 rs1065852	1*	0	Debrisoquine, poor metabolism of	AP	A: 0.18853
<i>DPYD</i>	1	c.85T>C p.Cys29Arg rs1801265	2	4	Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency, 5-@FLUOROURACIL TOXICITY	AP	G: 0.2602
<i>ITPA</i>	20	c.94C>A p.Pro32Thr rs111069069, rs1127354	1	0	Inosine triphosphatase deficiency, Thiopurine drug toxicity	AP	A: 0.0895
<i>MTHFR</i>	1	c.1286A>C p.Glu429Ala rs1801131	4	2	MTHFR deficiency, thermolabile type	AP	G: 0.25957
<i>MTHFR</i>	1	c.665C>T p.Ala222Val rs1801133	1	0	MTHFR deficiency, thermolabile type	AP	A: 0.2454
<i>NAT2</i>	8	c.341T>C p.Ile114Thr rs1801280	3	1	Slow acetylator due to N-acetyltransferase enzyme variant	AP	C: 0.2927
<i>NAT2</i>	8	c.590G>A p.Arg197Gln rs1799930	6	0	Slow acetylator due to N-acetyltransferase enzyme variant	AP	A: 0.2650
<i>NAT2</i>	8	c.803G=, p.Arg268= rs1208	3	1	Slow acetylator due to N-acetyltransferase enzyme variant	AP	G: 0.3229
<i>NAT2</i>	8	c.857G>A p.Gly286Glu rs1799931	2	0	Slow acetylator due to N-acetyltransferase enzyme variant	AP	A: 0.02294

В колонката „Генотип“ е посочен броят на изследваните лица, които са хетерозиготни носители (M/N) и хомозиготи (M/M) по съответния минорен алел. ФГД – Фармако-генетичен дефект, MAF – глобална честота на минорния алел публикувана в базата данни на NHLBI Exome Sequencing Project, посоченият нуклеотид съответства на минорния алел в геномната ДНК; АД – автозомно доминантен тип на унаследяване, AP – автозомно-рецесивен тип на унаследяване, ХР – Х-свързан рецесивен тип на унаследяване, \* - двата алела са установени при едно и също лице;

## 4.2. Дискусия на резултатите от NGS изследване на здрави индивиди

Прилагането на масивно паралелно секвениране има потенциала да разкрие едновременно множество генетични варианти в последователността на ДНК, включително такива, които са асоциирани с редки заболявания и през последните години доведе до откриване на нови генетични заболявания (Lee H et al, 2014; Yang Y et al, 2014; Xiaolin Z et al, 2015) и разкриване на неизвестни допреди това генни дефекти в познати гени (Nellist M et al, 2015; Wang Y et al, 2012; Qin W et al, 2010; Ylikallio E et al, 2014).

Изследването на контролни индивиди в нашето проучване чрез таргетно екзонно секвениране на 4813 гени показва възпроизводимост на резултатите, по отношение на обем и качество на генерираните секвенции, но също така разкри някои от проблемите, които съпътстват анализа на получените данни. Установихме, че в зависимост от приложените алгоритми (MSR, BWA, Isaac) за подравняване на секвенциите спрямо референтния геном, се получават различия в броя на установените варианти (главно по отношение на регистрираните in/del варианти). За преодоляване на този проблем и минимизиране на фалшиво-позитивни находки допълнително бяха анализирани районите, показали различия, чрез визуална инспекция на генерираните \*.bam файлове. Някои особености в архитектурата на човешкия геном са източник за генериране на подобни разлики в резултатите, получени при масивно паралелно секвениране, като например хомополимерни райони близо до границите екзон-интрон, микросателитни ДНК последователности, присъствие на псевдогени и копийни варианти.

Изследването на контролите установи наличие на патологични варианти, в гени асоциирани с моногенни заболявания при всичките 10 изследвани лица, но повечето варианти са свързани с рецесивно унаследявани белези и нямат пряко значение за здравето на носещите ги в хетерозиготно състояние. От друга страна, разкриването на рецесивни патологични алели може да даде информация за генетичния товар в популацията, към която принадлежат изследваните. Получената информация е полезна също и в контекста на профилактиране на редките генетични болести в семействата на идентифицираните носители.

При 9 от контролите бяха установени варианти, асоциирани с доминантни фенотипи, като се касае за заболявания изявяващи се в зряла възраст (хипертрофична кардиомиопатия, фамилно предсърдно мъждене), доминантни предразположения към мултифакторни заболявания (захарен диабет тип 2, фамилна комбинирана хиперлипидемия, бронхиектазия, нефролитиаза, дегенерация на ретината, епилепсия) и доминантни фенотипи, които обикновено не водят до инвалидизация (мононевропатия на медианния нерв, Neuropathy, small fiber, Central core disease) и могат да останат клинично неразпознати.

### 4.3.NGS изследване на пациенти с Редки болести

#### 4.3.1. Дизайн на изследването

Разнообразната етиология, вариабилността на клиничните прояви и ниската популационна честота на индивидуалните нозологични единици, причислявани към редките болести, ги прави труден обект за изследване. В същото време, разкриването на етиологията при моногенните редки заболявания, дава шанс на болните за адекватно планиране на лечението (ако такова е възможно) и на семействата им за планиране на репродукцията и избягване раждането на деца с инвалидизиращи нелечими заболявания. Основният критерий за включване на пациенти в настоящото проучване беше наличие на или съмнение за заболяване с моногенна етиология. Обект на изследването са пациенти с различни водещи клинични симптоми и на различна възраст, тъй като искахме да проверим приложимостта на новите технологии за масивно паралелно секвениране при условия максимално близки до ежедневната клинична практика в генетичните лаборатории.

В изследването са включени общо 43 пациенти, чиито диагнози условно могат да се причислят към следните групи заболявания: неврологични и невромускулни, сърдечно-съдови, метаболитни, костно-ставни, белодробни, кожни, множествени малформации и други. Като подход за генетично изследване приложихме масивно паралелно ресеквениране на панели от множество гени (от 94 до 4813 таргетни гени). Безспорно едновременното изследване на множество таргетни гени увеличава шанса за разкриване на генетичен вариант, каузално свързан с фенотипа, но шансът за успех зависи от това, дали съответният ген е наличен в панела и дали технологията позволява установяване на конкретния тип мутация / мутации (ако такава е налична). Независимо, че при прилагане на масивно паралелно секвениране се генерира огромен обем данни във вид на ДНК последователности, методът понастоящем е неприложим за разкриване на тринуклеотидни експанзии и не се ползва рутинно за установяване на генни /екзонни делеции и дубликации. Друго ключово условие за успешно прилагане на тази технология в практиката е критична оценка на връзката между установения генотип и фенотипа на конкретния пациент. Някои редки моногенни болести имат строго специфичен разпознаваем клиничен фенотип и прилагането на съответните клинични критерии е достатъчно надеждно за поставяне на диагнозата. Нещо повече – в някои случаи над 95% от пациентите с конкретен фенотип споделят един и същи генетичен дефект. По-честата ситуация в клиничната практика е обратната – фенотипът е пъстър и не позволява да вместим пациента в рамките на една конкретна диагноза или фенотипът е специфичен, но може да се дължи на различни етиологични фактори (генетични и средови). Ето защо, разпределихме пациентите в две групи, в зависимост от очакваната генетична хетерогенност.

**1 група:** пациенти със специфичен фенотип и клинична диагноза съответстваща на конкретно моногенно заболяване, отговарящо на следните условия:

- не е наблюдавана локусна хетерогенност, но е наблюдавана алелна хетерогенност или има локусна хетерогенност, но броят на локусите, асоциирани със заболяването, е относително малък
- фенотипът на пациента е специфичен за заболяването

- налице са данни от лабораторни, образни и други изследвания, подкрепящи работната клинична диагноза
- фамилните данни съответстват на очаквания тип на унаследяване

В първа група са включени 17 пациенти и 5 здрави родственици на пациенти с диагнози, отговарящи на изброените критерии. В таблица 6 са представени данните за клинична диагноза и ползван генен панел.

**2 група:** пациенти с фенотип, предполагащ локусна хетерогенност и неизвестна диагноза:

- фенотип съответстващ на моногенно заболяване, но данните за фенотипа са непълни или противоречиви
- данните от лабораторни изследвания съответстват частично или не съответстват на работната клинична диагноза
- отхвърлена е началната работна клинична диагноза, въз основа на проведено изследване (лабораторно, образно)

Втора група включва 26 пациенти (табл. 7).

14 от пациентите са изследвани с генен панел, включващ 4813 гена. Изследването показва, че всеки носи средно 4,89% редки варианти. Средно 1,14% от установените варианти не са анотирани в dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) и вероятно част от тях са нови. При всеки средно 0,06% от откритите варианти са анотирани като известни патологични, асоциирани с моногенни заболявания и предразположения, а други 0,06% - с фармакогенетични дефекти. Не се наблюдават значими разлики между контролите и пациентите по отношение на общите характеристики на установените генетични варианти (таблицы 8 и 9).

**Таблица 6.** Пациенти от 1-ва група по клинични диагнози и приложен генен панел.

№	Пол	Инициали /възраст	Клинична диагноза	Ген/и асоцииран/и с фенотипа	Генен панел
<b>Белодробни болести</b>					
1	ж	ТЖ	Кистозна фиброза	<i>CFTR</i>	TSI
2	м	АТ	Кистозна фиброза	<i>CFTR</i>	TSI
<b>Неврологични и невромускулни заболявания</b>					
3	м	ИБ /4 г	DMD	<i>DMD</i>	TSI
4	м	ИМ / 6 г	DMD / BMD	<i>DMD</i>	TSI
13	м	ТДТ / п	Атаксия-телангиектазия	<i>ATM</i>	TSC
<b>Метаболитни болести</b>					
5	ж	МВ / 3 г	Пропионова ацидурия	<i>PCCA, PCCB</i>	TSI
6	ж	ДУА / 7 г	3-метил-глутаконова ацидурия	<i>DNAJC19, SERAC1, AUH, CLPB, OPA3, TAZ</i>	TSI
7	ж	КМК / п	Митохондриална енцефалопатия, дефицит на комплекси I, III и IV	<i>14 гена (към декември 2014 г)</i>	TSI
8	ж	АД / п	Левциноза	<i>BCKDHA, BCKDHB, DBT</i>	TSI
9	м	XX / п	Zellweger spectrum	<i>&gt;12 гена (PEX1, PEX10, PEX11B,</i>	TSO

				<i>PEX12, PEX13, PEX14, PEX16, PEX19, PEX2, PEX26, PEX3, PEX5, PEX6)</i>	
14	м	ХП / 3 г	Гликогеноза	<i>G6PC, AGL, GAA, GBE1, SLC37A4, PYGL, PHKA1, PHKA2, PHKG2, PHKB, LAMP2, PFKM</i>	TSI
15	м	ТД / 6 г	Гликогеноза+	<i>G6PC, AGL, GAA, GBE1, SLC37A4, PYGL, PHKA1, PHKA2, PHKG2, PHKB, LAMP2, PFKM</i>	TSI
16	ж	ЕС / 1 г	Гликогеноза	<i>G6PC, AGL, GAA, GBE1, SLC37A4, PYGL, PHKA1, PHKA2, PHKG2, PHKB, LAMP2, PFKM</i>	TSO
17	ж	ХМ / п	Niemann–Pick type C	<i>NPC1</i>	TSI
<b>Сърдечно-съдови заболявания</b>					
10	м	ФВ / 15 г	Дисекция на аортата	<i>ACTA2, FBN1, MYH11, MYLK, PRKG1, SMAD3, TGFB1, TGFB2</i>	TSO
<b>Костно- ставни заболявания</b>					
11	ж	ИП / 2 г	Osteogenesis imperfecta	<i>COL1A1, COL1A2, CRTAP, P3H1</i>	TSO
<b>Кожни заболявания</b>					
12	ж	МБ / 1г бм	Булозна епидермолиза, дистрофична?	<i>COL7A1, LAMC2, LAMB3, COL17A1, ITGB4, LAMA3, KRT14, KRT5, DSP, PLECI</i>	TSI
<b>Здрави родственици на болни</b>					
1а	ж	ТТ / 32 г	Сестра на болен с MPS-III B (Sanfilippo B)	<i>NAGLU</i>	TSI
2а	ж	ХБ / 33 г	Родител на дете с Интрахепатална холестаза	<i>ATP8B1, ABCB11, ABCB4, TJP2</i>	TSO
3а	м	ВБ / 33 г	Родител на дете с Интрахепатална холестаза	<i>ATP8B1, ABCB11, ABCB4, TJP2</i>	TSO
4а	ж	ЕП / 27 г	Родител на дете с Булозна епидермолиза, тип Herlitz	<i>LAMC2, LAMB3, LAMA3</i>	TSI
5а	м	ВП / 29 г	Родител на дете с Булозна епидермолиза, тип Herlitz	<i>LAMC2, LAMB3, LAMA3</i>	TSI

TSI – TruSight Inherited, TSC – Tru Sight Cancer, TSO – TruSight One

**Таблица 7.** Пациенти от 2-ра група по клинични диагнози и приложен генен панел.

№	Пол	Инициали / възраст	Работна клинична диагноза	Допълнителни данни	Генен панел
<b>Неврологични и невромускулни заболявания</b>					
21	м	ММК / п	Obs. SMA	Не са установени делеции в <i>SMN1</i>	TSO
27	ж	ФИЗ / 3 г	Епилепсия. Специфични разстройства в развитието на двигателната функция Obs. Rett s-me	Не са установени мутации в <i>MECP2</i> и <i>SCN1A</i>	TSO
29	м	МГ / 7 г	Епилепсия	Не са установени мутации в	TSO

				<i>SCN1A</i>	
30	ж	ГМ / 7 г	GEFS+	Не са установени мутации в <i>SCN1A</i>	TSO
43	м	МН / 3 г	Епилепсия. Преходна хиперамиемия	Повишен аланин и цитрулин в кръв; неспецифични промени в профила на ацилкарнитини в кръв	TSI
31	м	БЙ / 6 г	Аутизъм. ИНПР.	Нормален кариотип, нормален метаболитен профил, FgaX(-), SNP-array – дупликация в Xq28 с неизвестен ефект	TSO
36	м	PPP	Спастична квадрипареза	Не е установена мутация <i>PDHX</i> p.R446*	TSI
37	м	ИХС	Спастична квадрипареза	Не е установена мутация <i>PDHX</i> p.R446*	TSI
38	м	ИТМ	Спастична квадрипареза	Не е установена мутация <i>PDHX</i> p.R446*	TSI
39	м	ММ	Спастична квадрипареза, епилепсия	Не е установена мутация <i>PDHX</i> p.R446*	TSI
40	м	ЮС	Спастична квадрипареза, епилепсия	Не е установена мутация <i>PDHX</i> p.R446*	TSI
41	м	СБ	Спастична квадрипареза, епилепсия	Не е установена мутация <i>PDHX</i> p.R446*	TSI
42	м	СМ	Спастична квадрипареза, епилепсия	Не е установена мутация <i>PDHX</i> p.R446*	TSI
<b>Метаболитни заболявания</b>					
22	ж	ПЯ / п	Obs. Болест на Крабе	Отхвърлена болест на Крабе	TSI
23	ж	ДБ / п	Тирозинемия тип 1?	Абнормен профил на органични киселини в урина	TSI
24	ж	ХР / п	Obs. Pompe	Не са установени мутации в гена <i>GAA</i>	TSO
33	м	ИЯ / 5 г	Метаболитно заболяване - неуточнено	Неспецифични промени в метаболитния профил	TSI
34	м	АД / 2 г	ПМС. Метаболитно заболяване - неуточнено	Неспецифични промени в метаболитния профил, хипоплазия на езика	TSI
<b>Костно-ставни заболявания</b>					
18	м	КН / 32	Osteogenesis imperfecta	11 фрактури на дълги кости, нисък ръст, съхранен слух	TSO
28	м	НК / п	Obs. Osteogenesis imperfecta	Наличие на костни деформации, перинатална смърт, но не са установени фрактури при аутопсията	TSO
<b>Множествени малформации</b>					
19	ж	ЖВ / п	Obs. DiGeorge s-me Obs. Noonan s-me	Не са установени патологични микроделеции / микродупликации при SNParray	TSO
25	м	ТОП	ПМС - двустранна аплазия на радиус и палци, едностранна бъбречна агенезия	Не са установени патологични микроделеции / микродупликации при SNParray	TSC
32	м	ИЖ / 5 г	ИНПР. Obs. WBS	Хиперкалциемия, отхвърлен е синдром на Williams-Beuren	TSO

<b>35</b>	м	ЛГ / 7 г	ПМС. ИНПР	АВСД, Dandy-Walker вариант, аCGH – нормален резултат	TSI
<b>Други</b>					
<b>20</b>	ж	АМ / 4 г	Obs. Tuberous sclerosis	Хиперпигментни петна по кожата, единично хипопигментно петно, фебрилен гърч	TSC
<b>26</b>	м	БТ / 3	Изоставане в растежа. Частична аниридия.	Нормален резултат от аCGH	TSO

TSI – TruSight Inherited, TSC – Tru Sight Cancer, TSO – TruSight One, п - починал

**Таблица 8.** Среден брой и характеристика на вариантите, установени при пациенти, изследвани с TruSight One панел

№	Общ брой варианти	Редки <1%		Без номер в dbSNP		Известни патологични		Вероятно патологични		Известни фармакогенетични дефекти	
		бр	%	бр	%	бр	%	бр	%	бр	%
<b>9</b>	8433	464	5.50	94	1.11	4	0.05	11	0.13	4	0.05
<b>10</b>	8304	412	4.96	80	0.96	9	0.11	11	0.13	3	0.04
<b>11</b>	8625	427	4.95	91	1.06	3	0.03	10	0.12	8	0.09
<b>18</b>	8139	329	4.04	83	1.02	7	0.09	10	0.12	5	0.06
<b>19</b>	7854	412	5.25	107	1.36	7	0.09	10	0.13	4	0.05
<b>21</b>	7770	252	3.24	62	0.80	4	0.05	9	0.12	5	0.06
<b>24</b>	8558	441	5.15	95	1.11	3	0.04	11	0.13	5	0.06
<b>26</b>	3794	280	7.38	68	1.79	4	0.11	15	0.40	2	0.05
<b>27</b>	7334	381	5.19	86	1.17	4	0.05	15	0.20	5	0.07
<b>28</b>	7939	352	4.43	83	1.05	2	0.03	18	0.23	3	0.04
<b>29</b>	8307	457	5.50	133	1.60	3	0.04	16	0.19	4	0.05
<b>30</b>	8241	460	5.58	103	1.25	2	0.02	7	0.08	7	0.08
<b>31</b>	8191	366	4.47	94	1.15	4	0.05	11	0.13	6	0.07
<b>32</b>	8126	329	4.05	76	0.94	5	0.06	17	0.21	4	0.05
<b>Средно</b>	<b>7829.6</b>	<b>383.0</b>	<b>4.89</b>	<b>89.6</b>	<b>1.14</b>	<b>4.36</b>	<b>0.06</b>	<b>12.2</b>	<b>0.16</b>	<b>4.64</b>	<b>0.06</b>

**Таблица 9.** Генетични варианти, според ефекта на генетичното нарушение върху структурата на кодиращия протеин или иРНК, установени при пациенти, изследвани с панел включващ 4813 гена

№	Missense	Frameshift	In frame del / ins	Splice AS / DS	Non-sense	Stop lost	Init. codon
<b>9</b>	2867	36	34 / 33	7 / 7	25	7	3
<b>10</b>	2766	34	26 / 36	6 / 4	19	6	5
<b>11</b>	2983	34	36 / 32	5 / 6	26	6	2
<b>18</b>	2750	36	29 / 34	7 / 4	14	7	2
<b>19</b>	2652	33	33 / 27	3 / 5	20	9	2
<b>21</b>	2710	32	14 / 25	4 / 5	21	9	5
<b>24</b>	3012	40	38 / 34	5 / 5	25	9	2

26	1394	12	11 / 15	3 / 3	14	4	2
27	2526	30	31 / 22	6 / 2	20	7	3
28	2693	33	25 / 22	6 / 5	21	7	3
29	2776	39	33 / 34	8 / 4	17	8	2
30	2723	38	40 / 28	9 / 4	15	8	3
31	2757	34	27 / 29	8 / 6	20	9	5
32	2720	35	29 / 34	7 / 2	23	6	3
<b>Средно</b>	<b>2831.5</b>	<b>34</b>	<b>32 / 33.6</b>	<b>6 / 5.6</b>	<b>23.3</b>	<b>6.3</b>	<b>3.3</b>

#### 4.3.2. Патологични и вероятно патологични варианти при пациенти с редки болести

При пациентите от двете групи беше извършено таргетно ресеквениране на генни панели включващи от 94 до 4813 таргетни гени. Дизайнът на панелите позволява анализ на екзоните и екзон-интронните граници, но не включва 5'- и 3'- нетранслируемите райони на гените. За всеки пациент бяха анализирани и класифицирани установените генетични варианти, като за категоризиране на вариантите бяха приложени критериите, описани в раздел Материали и методи. В хода на проведеното изследване беше създадена собствена база данни с анотация на 13507 редки варианти (с глобална популационна честота <1%), включваща хромозомна позиция, референтна последователност, последователност на варианта, тип на варианта, класификация и допълнителна информация за съответния ген, транскрипт, протеин и асоциирано заболяване (ако има такова). Установените патологични и вероятно патологични варианти бяха валидирани чрез секвениране по Сангер. Секвениране по Сангер е приложено и при сегрегационния анализ на вариантите в засегнатите семейства. Сангер секвенирането е извършено в Националната генетична лаборатория, СБАЛАГ „Майчин дом“, Медицински университет София.

Известни патологични и вероятно патологични варианти, асоциирани с клиничния фенотип са установени при 11 от изследваните 17 пациенти от 1-ва група (табл. 10) и при 12 от изследваните 26 пациенти от 2-ра група (табл. 11). 8 от класифицираните като патологични варианти при пациентите от двете групи не са съобщавани досега в медицинската литература, не са публикувани в специализираните бази данни и вероятно са нови (в таблиците тези варианти са отбелязани със задебелен шрифт). Освен това при пациентите от двете групи е установено носителство на известни патологични варианти, които нямат пряка връзка с водещите клинични прояви, но са асоциирани с други моногенни заболявания. Известни патологични и вероятно патологични варианти, които не са пряко свързани с клиничния фенотип са установени при 14 от пациентите от 1-ва група и при 23 от пациентите от 2-ра група (таблицы 12 и 13).

**Таблица 10.** Патологични варианти, асоциирани с клиничния фенотип, установен при пациентите от 1-ва група.

№	Пол	Клинична диагноза	Резултат Ген / вариант	Генотип	Съответствие с кл. фенотип
<b>1</b>	ж	CF	<b><i>CFTR</i>: c.1520_1522delTCT, p.Phe508del и ?</b>	хетерозигот	? само един алел

2	м	CF	<i>CFTR</i> : c.1520_1522delTCT, p.Phe508del и c.4046G>A, p.Gly1349Asp	съставен хетерозигот	да
3	м	DMD	<i>DMD</i> : <b>g.31986568C&gt;A, c.6502G&gt;T, p.Glu2168Ter</b>	хемизигот	да
4	м	DMD / BMD	<i>DMD</i> : g.31496398T>C, c.8762A>G, p.His2921Arg	хемизигот	да/не?
5	ж	Пропионова ацидурия	<i>PCCA</i> : g.100953860A>G c.1209+3A>G,	хомозигот	да
8	ж	Левциноза	<i>BCKDHA</i> : g.41928659G>A, c.979G>A, p.Glu327Lys	хомозигот	да
9	м	Zellweger spectrum	<i>HSD17B4</i> : g.118788316G>A, NM_001199291.1: c.-133G>A, NM_000414.3: c.46G>A, NP_000405.1: p.Gly16Ser, rs137853096	хомозигот	да
10	м	Дисекция на аортата	<i>ACTA2</i> : g. 90699300G>A, c.772C>T, p.Arg258Cys	хетерозигот	да
11	ж	Osteogenesis imperfecta	<i>COL1A1</i> : <b>g.48266792delA, NM_000088.3: c.2775delT, NP_000079.2: p.Gly926ValfsTer182</b>	хетерозигот	да
12	ж	Булозна епидермолиза	<i>COL7A1</i> : g.48626135G>A; c.2527C>T, p.Arg843Ter и g.48630971T>C; c.425A>G, p.Lys142Arg	съставен хетерозигот	да
13	м	Атаксия- телангиектазия	<i>ATM</i> : g.108190745_108190746delAG, c.6412_6413delAG, p.Glu2139IlefsTer6	хомозигот	да
16	ж	Гликогеноза	<i>PHKG2</i> : g.30764780A>T, NM_000294.2: c.458A>T, NP_000285.1: p.Asp153Val и <b>g.30764800_30764802delCTC, NM_000294.2: c.478_480delCTC, NP_000285.1: p.Leu160del</b>	съставен хетерозигот	да
17	ж	Niemann–Pick type C	<i>NPCI</i> : <b>g.21116755T&gt;C, NM_000271.4: c.3127A&gt;G, NP_000262.2: p.Thr1043Ala</b> и g.21118574_21118575delCT, NM_000271.4: c.2972_2973delAG p.Gln991Argfs	съставен хетерозигот	да

**Таблица 11.** Патологични варианти, асоциирани с клиничния фенотип, установени при пациентите от 2-ра група.

№	Пол	Работна клинична диагноза	Резултат ген / вариант	Генотип	Асоцииран фенотип
18	м	Osteogenesis imperfecta	<i>PHEX</i> : g.22132604C>T, NM_000444.4: c.1202C>T, NP_000435.3: p.Pro401Leu, rs145778165	хемизигот	Х-свързан витамин Д резистентен хипофосфатемичен рахит
20	ж	Obs. Tuberous sclerosis	<i>FANCA</i> : p.Ser1088Phe и g.89833576G>C, NM_000135.2:c.2574C>G, p.Ser858Arg	съставен хетерозигот	Анемия на Fanconi тип А
24	ж	Obs. Pompe	<i>HADHA</i> : NM_000182.4: c.1528G>C, NP_000173.2: p.Glu510Gln и NM_000182.4: c.871C>T, NP_000173.2: p.Arg291Ter	съставен хетерозигот	Trifunctional protein deficiency
25	м	ПМС - двустранна аплазия на радиус и палци, едностранна бъбречна агенезия	<i>FANCD2</i> : g.10106488_10106490delCCT, NM_033084.3: c.2097_2099delCCT, NP_149075.2:p.Leu700del	хомозигот	Анемия на Fanconi тип D
26	м	Изоставане в растежа. Частична аниридия.	<i>GHR</i> : NM_000163.4:c.535C>T, p.Arg179Cys, rs121909362	хетерозигот	? Идиопатичен нисък ръст
27	ж	Епилепсия. Специфични разстройства в развитието на двигателната функция Obs. Rett s-me	<i>CLCN1</i> g.143036380_143036393delTACC CTGCGGAGGC, NM_000083.2: c.1436_1449delTACCCTGCGGA GGC, NP_000074.2: p.Pro480HisfsTer24	хетерозигот	? Myotonia congenita, dominant 160800, Myotonia congenita, recessive 255700
30	ж	GEFS+	<i>SCN8A</i> : g.52200885G>A, NM_014191.3: c.5615G>A, NP_055006.1: p.Arg1872Gln	хетерозигот	Epileptic encephalopathy, early infantile, 13, Cognitive impairment with or without cerebellar ataxia
32	м	ИНПР. Obs. WBS	<i>RPS6KA3</i> : g.20195135G>A, NM_004586.2: c.913C>T, NP_004577.1: p.Arg305Ter	хемизигот	Coffin-Lowry syndrome
35	м	ПМС. ИНПР	<i>MKSI</i> : NM_017777.3:	хомозигот	Синдром на Meckel тип 1 и Bardet-Biedl

			<b>c.1115_1117delCCT, NP_060247.2: p.Ser372del</b>	13	
36	м	Спастична квадрипареза	<i>RNASEH2B</i> : g.51519581G>A, NM_024570.3: c.529G>A, NP_078846.2: p.Ala177Thr	хомозигот	С-м на Aicardi- Goutieres тип 2
37	м	Спастична квадрипареза	<i>IDS</i> : g.148564708G>A, NM_000202.5: c.1222C>T, NP_000193.1: p.Pro408Ser	хемизигот	Mucopolysaccharidosis II?
38	м	Спастична квадрипареза	<i>APIS2</i> : <b>g.15864056A&gt;T, NM_003916.3: c.258T&gt;A, NP_003907.3: p.Tyr86Ter</b>	хемизигот	Mental retardation, X- linked syndromic 5

**Таблица 12.** Патологични и вероятно патологични варианти, асоциирани с други генетични заболявания, установени при пациентите от 1-ва група.

№	Пол	Диагноза	Ген, вариант	Генотип	Асоцииран фенотип/ унаследяване
1	ж	Кистозна фиброза	<i>PRSS12</i> Chr 4: g.119203396G>A, NM_003619.3: c.2323C>T, NP_003610.2: p.Arg775Ter, rs201069442	хетерозигот	Mental retardation, autosomal recessive 1, AP
2	м	Кистозна фиброза	<i>ALG6</i> Chr 1: g.63872032T>C, NM_013339.3: c.391T>C, NP_037471.2: p.Tyr131His, rs35383149	хетерозигот	Congenital disorder of glycosylation type 1C, AP
			<i>SUOX</i> Chr 12: g.56398531G>A, NM_000456.2: c.1358G>A, NP_000447.2: p.Gly453Asp, rs76537761	хетерозигот	Sulfite oxidase deficiency, AP
4	м	Прогресивна мускулна дистрофия тип Duchenne	<i>MAN2B1</i> Chr 19: g.12760746G>A, NM_000528.3: c.2248C>T, NP_000519.2: p.Arg750Trp, rs80338680	хетерозигот	Mannosidosis, alpha- types I and II, AP
			<i>MKS1</i> Chr 17: g.56285514_56285516delAGG, NM_017777.3: c.1115_1117delCCT, NP_060247.2: p.Ser372del	хетерозигот	Bardet-Biedl syndrome 13, Meckel syndrome 1, AP
5	ж	Пропионова ацидурия	<i>CFTR</i> Chr 7: g.117251649T>G, NM_000492.3: c.3154T>G, NP_000483.3: p.Phe1052Val,	хетерозигот	Cystic fibrosis, AP

			rs150212784		
			<i>PNPO</i> Chr 17: g.46024036G>A, NM_018129.3: c.674G>A, NP_060599.1: p.Arg225His	хетерозигот	Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase deficiency, AP
6	ж	3-метил-глутаконова ацидурия	<i>COG8</i> Chr 16: g.69368876G>A, NM_032382.4: c.961C>T, NP_115758.3: p.Gln321Ter	хетерозигот	Congenital disorder of glycosylation, type IIh, AP
			<i>NDUFS8</i> Chr 11: g.67799619A>G, NM_002496.3: c.1A>G, NP_002487.1: p.Met1Val	хетерозигот	Leigh syndrome due to mitochondrial complex I deficiency, AP
			<i>CDH23</i> Chr 10: g.73563128G>A, NM_022124.5: c.7823G>A, NP_071407.4: p.Arg2608His, rs202052174	хетерозигот	Deafness, autosomal recessive 12, Usher syndrome, type 1D, AP
7	ж	Мито-хондриална енцефалопатия	<i>SCNN1B</i> Chr 16: g.23360165C>G, NM_000336.2: c.245C>G, NP_000327.2: p.Ser82Cys, rs35731153	хетерозигот	Bronchiectasis with or without elevated sweat chloride 1, АД
8	ж	Левциноза	<i>NBN</i> Chr 8: g.90990521T>C, NM_002485.4: c.511A>G, NP_002476.2: p.Ile171Val, rs61754966	хетерозигот	Aplastic anemia, AP
9	м	Zellweger spectrum	<i>TRIOBP</i> Chr 22: g.38131357G>T, NM_001039141.2: c.5014G>T, NP_001034230.1: p.Gly1672Ter, rs200045032	хетерозигот	Deafness 28, AP
			<i>KCNK18</i> Chr 10: g.118969065_118969066delCT, NM_181840.1: c.410_411delCT, NP_862823.1: p.Phe139TrpfsTer25	хетерозигот	Migraine with aura, 13
			<i>MYBPC3</i> Chr 11: g.47360209G>A, NM_000256.3: c.2170C>T, NP_000247.2: p.Arg724Trp, rs200399246	хетерозигот	Familial hypertrophic cardiomyopathy 4
10	м	Дисекция на аортата	<i>CPT2</i> Chr 1: g.53668099C>T, NM_000098.2: c.338C>T, NP_000089.1: p.Ser113Leu, rs74315294, rs17355168	хетерозигот	Carnitine palmitoyltransferase II deficiency, AP

			<i>IL36RN</i> Chr 2: g.113820124C>T, NM_173170.1: c.338C>T, NP_775262.1: p.Ser113Leu, rs144478519	хетерозигот	Psoriasis 14, pustular
			<i>SI</i> Chr 3: g.164764786A>C, NM_001041.3: c.1730T>G, NP_001032.2: p.Val577Gly, rs121912615	хетерозигот	Sucrase-isomaltase deficiency
			<b><i>RAD50</i></b> <b>Chr 5:</b> <b>g.131953939_131953940delAG</b> <b>, NM_005732.3:</b> <b>c.3342_3343delAG,</b> <b>NP_005723.2:</b> <b>p.Glu1115ThrfsTer11</b>	хетерозигот	Nijmegen breakage syndrome-like disorder, AP
			<i>TGFBI</i> Chr 5: g.135398363G>C, NM_000358.2: c.1998G>C, NP_000349.1: p.Arg666Ser, rs121909217	хетерозигот	Corneal epithelial dystrophy
			<i>ASS1</i> Chr 9: g.133370313C>T, NM_054012.3: c.1030C>T, NP_446464.1: p.Arg344Ter	хетерозигот	Citrullinemia type I, AP
			<i>GDF3</i> Chr 12: g.7842773G>A, NM_020634.1: c.796C>T, NP_065685.1: p.Arg266Cys, rs140926412	хетерозигот	Microphthalmia, isolated, with coloboma 6, AP
			<i>PKDI</i> Chr 16: g.2168022C>A, NM_001009944.2: c.971G>T, NP_001009944.2: p.Arg324Leu, rs199476099	хетерозигот	Polycystic kidney disease, adult type I, АД
11	ж	Osteogenesis imperfecta	<i>MEFV</i> Chr 16: g.3293447C>G, NM_000243.2: c.2040G>C, NP_000234.1: p.Met680Ile, rs28940580	хетерозигот	Familial Mediterranean fever, AP
			<i>HARS2</i> Chr 5: g.140075168C>T, NM_012208.2: c.475C>T, NP_036340.1: p.Arg159Ter	хетерозигот	?Perrault syndrome 2, AP
			<i>NEUROG3</i> Chr 10: g.71332332G>T, NM_020999.3: c.468C>A, NP_066279.2: p.Cys156Ter, rs199756893	хетерозигот	Diarrhea 4, malabsorptive, congenital, AP

			<i>PDE6C</i> Chr 10: g.95381740C>T, NM_006204.3: c.775C>T, NP_006195.3: p.Arg259Ter	хетерозигот	Cone dystrophy 4
			<i>GCH1</i> Chr 14: g.55310817T>C, NM_000161.2: c.671A>G, NP_000152.1: p.Lys224Arg, rs41298442	хетерозигот	Dystonia, dopa-responsive, with or without hyperphenylalaninemia, AP
12	ж	Дистрофична булозна епидермолиза	<i>NPHP3</i> Chr 3: g.132423185C>A, NM_153240.4: c.1381G>T, NP_694972.3: p.Glu461Ter, rs119456961	хетерозигот	Meckel syndrome 7, Nephronophthisis 3, Renal-hepatic-pancreatic dysplasia 1, AP
14	м	Гликогеноза	<i>DHCR7</i> Chr 11: g.71155998T>C, NM_001163817.1: c.1A>G, NP_001157289.1: p.Met1Val, rs104886033	хетерозигот	Smith-Lemli-Opitz syndrome, AP
16	ж	Гликогеноза	<i>F10</i> Chr 13: g.113795286G>A, NM_000504.3: c.424G>A, NP_000495.1: p.Glu142Lys, rs61753266	хетерозигот	Factor X deficiency, AP
			<i>SERPINA6</i> Chr 14: g.94780642A>T, NM_001756.3: c.344T>A, NP_001747.2: p.Leu115His, rs113418909	хетерозигот	Corticosteroid-binding globulin deficiency
			<i>FH</i> Chr 1: g.241661228_241661230dupTTT, NM_000143.3: c.1431_1433dupAAA, NP_000134.2: p.Lys477dup, rs367543046	хетерозигот	Fumarase deficiency, AP
			<i>VWF</i> Chr 12: g.6155900_6155901delAG, NM_000552.3: c.2269_2270delCT, NP_000543.2: p.Leu757ValfsTer22, rs61748465	хетерозигот	von Willibrand disease, type 3, AP
17	ж	Niemann–Pick type C	<i>CD96</i> Chr 3: g.111366452_111366453delTT, NM_198196.2: c.1588_1589delTT, NP_937839.1:	хетерозигот	C syndrome, AP

			<b>p.Phe530LeufsTer46</b>		
			<b><i>PKHD1</i></b> Chr 6: g.51947315delG, NM_138694.3: c.156delC, NP_619639.3: p.Asn53ThrfsTer11	хетерозигот	Polycystic kidney and hepatic disease, AP
			<b><i>KCNJ2</i></b> Chr 17: g.68171457G>A, NM_000891.2: c.277G>A, NP_000882.1: p.Val93Ile, rs147750704	хетерозигот	Atrial fibrillation, familial, 9
			<b><i>ANTXR2</i></b> Chr 4: g.80905972C>T, NM_001145794.1: c.1086+1G>A	хетерозигот	Hyaline fibromatosis syndrome, AP
			<b><i>FOLR1</i></b> Chr 11: g.71906793T>C, NM_016725.2: c.493+2T>C, rs144637717	хетерозигот	Neurodegeneration due to cerebral folate transport deficiency, AP

**Таблица 13.** Патологични и вероятно патологични варианти, асоциирани с други генетични заболявания, установени при пациентите от 2-ра група.

№	Пол	Работна клинична диагноза	Ген / вариант	Генотип	Асоцииран фенотип / унаследяване
18	М	Osteogenesis imperfecta	<b><i>BEST1</i></b> chr 11: g.61730157_61730158 delAA, NM_001139443.1: c.1351_1352delAA, NP_001132915.1: p.Ser452PhefsTer2	хетерозигот	Vitreoretinocho-roidopathy, АД; Bestrophinopathy, AP
			<b><i>GALC</i></b> chr 14: g.88452941T>C, NM_000153.3: c.334A>G, NP_000144.2: p.Thr112Ala, rs147313927	хетерозигот	Krabbe disease, AP
			<b><i>HEXA</i></b> chr 15: g.72643569T>C, NM_000520.4:c.577A>G, NP_000511.2: p.Met193Val	хетерозигот	GM2-gangliosidosis, Tay-Sachs disease, AP
			<b><i>CDC6</i></b> chr 17: g.38450658G>C, NM_001254.3: c.986G>C, NP_001245.1: p.Arg329Thr	хетерозигот	Meier-Gorlin syndrome 5, AP
			<b><i>SEC23B</i></b> chr 20: g.18491519C>T, NM_006363.4: c.40C>T, NP_006354.2: p.Arg14Trp, rs121918222	хетерозигот	Dyserythropoietic anemia, congenital, type II, AP

19	ж	Obs. DiGeorge s-me Obs. Noonan s-me	<b><i>CPT2</i></b> chr 1: <b>g.53666450T&gt;C,</b> <b>NM_000098.2: c.212T&gt;C,</b> <b>NP_000089.1: p.Leu71Pro</b> и chr 1: g.53676371T>C, NM_000098.2: c.1025T>C, NP_000089.1: p.Met342Thr, rs144658100	съставен хетерозигот	CPT II deficiency, lethal neonatal, AP
			<b><i>OTOA</i></b> chr16: g.21747639G>T, NM_144672.3: c.2359G>T, NP_653273.3: p.Glu787Ter, rs200988634	хетерозигот	Deafness, 22, AP
			<b><i>PKD1</i></b> chr 16: g.2168022C>A, NM_001009944.2: c.971G>T, NP_001009944.2: p.Arg324Leu, rs199476099	хетерозигот	Polycystic kidney disease, adult type, АД
			<b><i>NAGA</i></b> chr 22: g.42457056C>T, NM_000262.2: c.973G>A, NP_000253.1: p.Glu325Lys, rs121434529	хетерозигот	Schindler disease, AP
21	м	Obs. SMA	<b><i>MUT</i></b> <b>chr 6: g.49426868delG,</b> <b>NM_000255.3: c.312delC,</b> <b>NP_000246.2:</b> <b>p.Trp105GlyfsTer75</b>	хетерозигот	Methylmalonic aciduria, mut(0) type, AP, нов вариант
			<b><i>GJB2</i></b> chr 13: g.20763686delC, NM_004004.5: c.35delG, NP_003995.2: p.Gly12ValfsTer2, rs1801002, rs80338939	хетерозигот	Deafness, autosomal dominant 3A, Deafness, autosomal recessive 1A, Keratitis-ichthyosis- deafness syndrome
			<b><i>PC</i></b> chr 11: g.66617567G>C, NM_022172.2: c.2739C>G, NP_071504.2: p.Ile913Met, rs145489836	хетерозигот	Pyruvate carboxylase deficiency, AP
			<b><i>MEFV</i></b> chr 16: g.3293447C>G, NM_000243.2: c.2040G>C, NP_000234.1: p.Met680Ile, rs28940580	хетерозигот	Familial Mediterranean fever, AP
22	ж	Метаболитно заболяване. Болест на Крабе	<b><i>SGSH</i></b> chr 17: g.78186041C>T, NM_000199.3:c.778G>A, NP_000190.1:p.Ala260Thr	хетерозигот	Mucopolysaccharidosis type IIIA, AP
23	ж	Тирозинемия тип 1?	<b><i>TAT</i></b> chr 16: g.71604215C>T, NM_000353.2: c.998G>A,	хетерозигот	Tyrosinemia, type II, AP

			NP_000344.1: p.Arg333His		
24	ж	Obs. Болест на Помпе	<i>HBB</i> chr 11: g.5248004G>A, NM_000518.4:c.118C>T, NP_000509.1:p.Gln40Ter rs11549407	хетерозигот	Beta-zero-thalassemia, AP
			<i>AMPD1</i> Chr 1: g.115236057G>A, NM_000036.2:c.133C>T NP_000027.2:p.Gln45Ter rs17602729	хомозигот	Muscle AMP deaminase deficiency, AP
26	м	Изооставане в растежа. Частична аниридия.	<i>ASPM</i> chr 1: g.197069701T>C, NM_018136.4: c.8680A>G, NP_060606.3: p.Arg2894Gly	хетерозигот	Microcephaly 5, primary, AP
			<i>SGCA</i> chr 17: g.48245770C>A, NM_000023.2: c.421C>A, NP_000014.1: p.Arg141Ser, rs35130237	хетерозигот	Muscular dystrophy, limb-girdle, type 2D, AP
27	ж	Епилепсия. Специфични разстройства в развитието на двигателната функция Obs. Rett s-me	<i>AGRN</i> chr1: g.984265C>A, NM_198576.3: c.4124C>A, NP_940978.2: p.Pro1375Gln	хетерозигот	Myasthenic syndrome, congenital, 8, AP
			<i>PRSSI</i> chr 7: g.142458531C>T, NM_002769.4: c.166C>T, NP_002760.1: p.Gln56Ter, rs147366981	хетерозигот	Pancreatitis, hereditary, АД; Trypsinogen deficiency, AP
			<i>PSPH</i> chr 7: g.56087292delC, NM_004577.3: c.275+1delG, rs139106189	хетерозигот	Phosphoserine phosphatase deficiency, AP
			<i>MTR</i> chr 1: g.237025584C>T, NM_000254.2: c.2245C>T, NP_000245.2: p.Pro749Ser, rs142250261	хетерозигот	Homocystinuria-megaloblastic anemia, cblG complementation type, AP
28	м	Obs. Osteogenesis imperfecta	<i>SKI</i> chr 1: g.2237568A>T, NM_003036.3: c.1877A>T, NP_003027.1: p.Lys626Met	хомозигот	Shprintzen- Goldberg syndrome, АД
29	м	Епилепсия	<i>MPO</i> chr 17: g.56350828_56350841 delGGGTTGGGTCCAT, NM_000250.1: c.1555_1568 delATGGAACCCAACCC, NP_000241.1: p.Met519ProfsTer21	хетерозигот	Myeloperoxidase deficiency, AP
			<i>POLR3A</i> chr 10: g.79743726delA,	хетерозигот	Leukodystrophy, hypomyelinating, 7,

			NM_007055.3: c.3381delT, NP_008986.2: p.Phe1127LeufsTer14		with or without oligodontia and/ or hypogonadotropic hypogonadism, AP
			<i>TSEN54</i> chr 17: g.73518201A>T, NM_207346.2: c.1039A>T, NP_997229.2: p.Lys347Ter, rs143604970	хетерозигот	Pontocerebellar hypoplasia type 2A, 4, AP
			<i>WDR72</i> chr 15: g.53901711T>C, NM_182758.2: c.2951A>G, NP_877435.2: p.Gln984Arg	хетерозигот	Amelogenesis imperfecta, type IIА3
30	ж	GEFS+	<i>BSND</i> chr 1: g.55474212G>A, NM_057176.2: c.874G>A, NP_476517.1: p.Glu292Lys	хетерозигот	Bartter syndrome, type 4a, Sensorineural deafness with mild renal dysfunction, AP
			<i>C7orf10, SUGCT</i> chr 7: g.40228168C>T, NM_001193311.1: c.322C>T, NP_001180240.1: p.Arg108Ter, rs137852862	хетерозигот	Glutaric aciduria III, AP
31	м	Аутизм.	<i>ATR</i> chr 3: g.142281732C>T, NM_001184.3: c.512G>A, NP_001175.2: p.Trp171Ter	хетерозигот	?Cutaneous telangiectasia and cancer syndrome, familial, АД; Seckel syndrome 1, AP
			<i>CD36</i> chr 7: g.80300413C>A, NM_001001547.2: c.939C>A, NP_001001547.1: p.Cys313Ter	хетерозигот	Platelet glycoprotein IV deficiency, AP
			<i>GIGYF2</i> chr 2: g.233712225_233712226insCG, NM_001103147.1: c.3691_3692insCG, NP_001096617.1: p.Gln1232HisfsTer25	хетерозигот	{Parkinson disease 11}, АД
			<i>NDUFS2</i> chr 1: g.161183265G>A, NM_004550.4: c.1212G>A, (p.=), rs145959971	хетерозигот	Mitochondrial complex I deficiency, AP
			<i>PTPRF</i> chr 1: g.44079289G>A, NM_002840.3: c.3974G>A, NP_002831.2: p.Gly1325Asp	хетерозигот	?Breasts and/or nipples, aplasia or hypoplasia of, 2, AP
32	м	ИНПР. Obs. WBS	<i>NDUFA11</i> chr 19: g.5896466C>A, NM_001193375.1: c.311G>T, NP_001180304.1: p.Arg104Leu,	хетерозигот	Mitochondrial complex I deficiency, AP

			rs199842745		
			<i>CFTR</i> chr 7: g.117144344C>T, NM_000492.3: c.91C>T, NP_000483.3: p.Arg31Cys, rs1800073	хетерозигот	Cystic fibrosis, AP
33	М	Метаболитно заболяване - неуточнено	<i>MMACHC</i> chr 2: g.45973216_45973217insA, NM_015506.2: c.270_271insA, NP_056321.2: p.Arg91LysfsTer14	хетерозигот	Methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type, AP
			<i>CFTR</i> chr 7: g.117251649T>G, NM_000492.3: c.3154T>G, NP_000483.3: p.Phe1052Val, rs150212784	хетерозигот	Cystic fibrosis
			<i>F8</i> chr X: g.154156921C>T, NM_000132.3: c.5144G>A, NP_000123.1: p.Arg1715Gln	хемизигот	Hereditary factor VIII deficiency disease, XP
34	М	ПМС. Метаболитно заболяване - неуточнено	<i>POMT1</i> chr 9: g.134394834C>G, NM_007171.3: c.1611C>G, NP_009102.3: p.Ser537Arg, rs150367385	хетерозигот	Muscular dystrophy-dystroglycanopathy, AP
			<i>DYNC2H1</i> chr 11: g.103006615A>G, NM_001080463.1: c.2512A>G, NP_001073932.1: p.Thr838Ala	хомозигот	Short-rib thoracic dysplasia 3 with or without polydactyly, AP
35	М	ПМС. ИНПР	<i>PRSS12</i> chr 4: g.119234443G>A, NM_003619.3: c.1402C>T, NP_003610.2: p.Arg468Ter	хетерозигот	Mental retardation, 1, AP
			<i>PLEC</i> chr 8: g.144996976C>T, NM_201380.2: c.7532G>A, NP_958782.1: p.Arg2511Gln, rs201417343	хетерозигот	Epidermolysis bullosa simplex, АД, AP
			<i>CDH23</i> chr 10: g.73437218C>T, NM_022124.5: c.1520C>T, NP_071407.4: p.Ser507Leu, rs201584731	хетерозигот	Deafness, 12, Usher syndrome, type 1D, AP, ДГ
36	М	Спастична квадрипареза	<i>GBA</i> chr 1: g.155205634T>C, NM_001005741.2: c.1226A>G, NP_001005741.1: p.Asn409Ser, rs76763715	хетерозигот	Gaucher disease, type I, AP;
			<i>MMACHC</i> chr 2: g.45973128G>A, NM_015506.2: c.182G>A,	хетерозигот	Methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC

			NP_056321.2: p.Arg61Gln, rs201777449		type, AP
			<i>DYNC2H1</i> chr 11: g.103026190G>C, NM_001080463.1: c.3704G>C, NP_001073932.1: p.Arg1235Thr	хетерозигот	Short-rib thoracic dysplasia 3 with or without polydactyly, AP
			<i>CLCN7</i> chr 16: g.1498996C>T, NM_001287.5: c.1768G>A, NP_001278.1: p.Ala590Thr	хетерозигот	Osteopetrosis 2, АД, Osteopetrosis 4, AP
			<i>MEFV</i> chr 16: g.3293310A>G, NM_000243.2: c.2177T>C, NP_000234.1: p.Val726Ala, rs28940579	хетерозигот	Familial Mediterranean fever, AP
37	м	Спастична квадрипареза	<i>PTEN</i> chr 10: g.89720730G>A, NM_000314.4: c.881G>A, NP_000305.3: p.Ser294Asn	хетерозигот	VATER association with macrocephaly and ventriculomegaly, AP?; PTEN hamartoma syndromes, АД
			<i>CPT1A</i> chr 11: g.68542863G>A, NM_001876.3: c.1496C>T, NP_001867.2: p.Ala499Val	хетерозигот	CPT deficiency, hepatic, type IA, AP
			<i>CLCN7</i> chr 16: g.1498996C>T, NM_001287.5: c.1768G>A, NP_001278.1: p.Ala590Thr	хетерозигот	Osteopetrosis, 2, АД; Osteopetrosis, 4, AP
			<i>ARSA</i> chr 22: g.51065404A>C, NM_001085426.2: c.542T>G, NP_001078895.2: p.Ile181Ser, rs74315457	хетерозигот	Metachromatic leukodystrophy, AP
38	м	Спастична квадрипареза	<i>VPS13B</i> chr 8: g.100568695G>T, NM_017890.4: c.4838G>T, NP_060360.3: p.Gly1613Val	хетерозигот	Cohen syndrome, AP
			<i>SMPD1</i> chr 11: g.6414531T>G, NM_000543.4: c.1177T>G, NP_000534.3: p.Trp393Gly, rs120074125	хетерозигот	Niemann-pick disease, intermediate, protracted neurovisceral, AP
			<i>CPT1A</i> chr 11: g.68542863G>A, NM_001876.3: c.1496C>T, NP_001867.2: p.Ala499Val	хетерозигот	CPT deficiency, hepatic, type IA, AP
			<i>DYNC2H1</i> chr 11: g.103026190G>C, NM_001080463.1: c.3704G>C,	хетерозигот	Short-rib thoracic dysplasia 3 with or without polydactyly,

			NP_001073932.1: p.Arg1235Thr		AP
39	М	Спастична квадрипареза, епилепсия	<i>PYGM</i> chr 11: g.64525251C>T, NM_005609.2: c.660G>A, (p.=), rs142234258	хетерозигот	McArdle disease, AP
40	М	Спастична квадрипареза, епилепсия	<i>PLEC</i> chr 8: g.144998219G>A, NM_201380.2: c.6289C>T, NP_958782.1: p.Arg2097Cys	хетерозигот	Epidermolysis bullosa simplex, АД, AP
			<i>CPT1A</i> chr 11: g.68542863G>A, NM_001876.3: c.1496C>T, NP_001867.2: p.Ala499Val	хетерозигот	CPT deficiency, hepatic, type IA, AP
			<i>VDR</i> chr 12: g.48240458C>T, NM_001017536.1: c.1039G>A, NP_001017536.1: p.Val347Ile, rs144756403	хетерозигот	Rickets, vitamin D-resistant, type IIA, AP
			<i>NPC2</i> chr 14: g.74953134C>T, NM_006432.3: c.88G>A, NP_006423.1: p.Val30Met, rs151220873	хетерозигот	Niemann-Pick disease, type C2, AP
			<i>PYGM</i> chr 11: g.64525251C>T, NM_005609.2: c.660G>A, (p.=), rs142234258	хетерозигот	McArdle disease, AP
			<i>G6PD</i> chr X: g.153762634G>A, NM_000402.3: c.653C>T, NP_000393.4: p.Ser218Phe, rs5030868	хемизигот	G6PD Mediterranean, XP
41	М	Спастична квадрипареза, епилепсия	<i>ETHE1</i> chr 19: g.44031251G>T, NM_014297.3: c.79C>A, NP_055112.2: p.Gln27Lys	хетерозигот	Ethylmalonic encephalopathy, AP
42	М	Спастична квадрипареза, епилепсия	<i>DYNC2H1</i> chr 11: g.103026190G>C, NM_001080463.1: c.3704G>C, NP_001073932.1: p.Arg1235Thr	хетерозигот	Short-rib thoracic dysplasia 3 with or without polydactyly, AP
			<i>ABCA3</i> chr16: g.2369821G>T, NM_001089.2: c.634C>A, NP_001080.2: p.Leu212Met, rs139695699	хетерозигот	Surfactant metabolism dysfunction, pulmonary, 3, AP
			<i>TAT</i> chr 16: g.71603836T>C, NM_000353.2: c.1046A>G, NP_000344.1: p.Asn349Ser, rs138304751	хетерозигот	Tyrosinemia, type II, AP

43	М	Епилепсия. Преходна хипер- амониемия	<i>CPS1</i> chr 2: g.211469907G>T, NM_001122633.2: c.1936G>T, NP_001116105.1: p.Ala646Ser, rs142693704	хетерозигот	Carbamoylphosphate synthetase I deficiency, AP
----	---	---	--	-------------	--

#### 4.3.3. Патологични и вероятно патологични варианти при родственици на пациенти с редки болести

В три семейства, в които пробандите не бяха достъпни за генетичен анализ, бяха изследвани здрави родственици от първа степен на болните. И в трите семейства пробандите са загинали от моногенни заболявания, които според приложените критерии ги отнасят към 1-ва група. Патологични и вероятно патологични варианти, асоциирани с конкретния фенотип, бяха установени и в трите семейства (табл. 14).

**Таблица 14.** Патологични и вероятно патологични варианти, установени при здрави родственици на болни.

№	Диагноза на пробанда	Роднинска връзка с пробанда	Резултат ген, вариант, генотип
1а	MPS-III B (Sanfilippo B)	сестра	<i>NAGLU</i> : chr17: g. 40695196A>G, NM_000263.3:c.1172A>G, NP_000254.2:p.Tyr391Cys, хетерозигот
2а	Прогресивна интрахепатална холестаза	майка	? Вероятна делеция на <i>ABCB11</i>
3а	Прогресивна интрахепатална холестаза	баща	<i>ABCB11</i> chr2: g.169787209A>T, NM_003742.2:c.3377T>A, NP_003733.2:p.Leu1126Ter, хетерозигот
4а	Булозна епидермолиза	майка	<i>LAMB3</i> : c.1133-22G>A, хетерозигот
5а	Булозна епидермолиза	баща	<i>LAMB3</i> : c.1133-22G>A, хетерозигот

#### 4.4. Обсъждане на резултатите от NGS анализа на пациенти с Редки генетични болести

През последните години секвенирането от ново поколение прогресивно заменя традиционните технологии за ДНК диагностика. Вместо традиционния подход за изследване „ген-по-ген“, технологията позволява едновременно „прочитане“ на големи набори от гени. Нещо повече, научният прогрес бързо разширява групата на "генетичните заболявания". В сравнение с предходната "революция" в молекулярна диагностика - въвеждането на микрочипове като инструмент за установяване на геномни копияни

варианти - NGS засяга много повече аспекти на рутинната генетична диагностика (de Vries BBA, Pfundt R, Leisink M et al, 2005). Рязкото намаляване на цената, съчетано с увеличен добив на данни за кратък период от време, превърна задача, като секвениране генома на един индивид, от проект изискващ многогодишните усилия на множество лаборатории, в „лабораторен тест“, който може да се осъществи в една лаборатория за обозримо кратък период. Основното предизвикателство по отношение на секвенирането от ново поколение не е самата технология, а интерпретацията на данните, получени с тази технология и ползването им в контекста на конкретно клинично приложение.

NGS анализът на пациентите с клинични симптоми на редки генетични заболявания показва, че приложението на новите технологии има капацитета да подобри съществено генетичната диагностика на болестите, които се характеризират с алелна и локусна хетерогенност. При изследваните пациенти този анализ разкри нови генни мутации с патологичен ефект и съпътстващи неочаквани абнормни находки, свързани със странични клинични проблеми.

В хода на настоящото проучване са изследвани общо 43 лица засегнати от различни заболявания с предполагаема моногенна етиология. Пациентите бяха разпределени в две групи в зависимост от очакваната генетична хетерогенност. В 1-ва група бяха включени лицата, чиито клинични симптоми и съответно работни диагнози, са еднозначно асоциирани с известни моногенни заболявания без локусна хетерогенност или с ограничена локусна хетерогенност, докато във 2-ра група бяха включени пациенти с подозиран моногенен дефект, но на практика неизвестна диагноза и очаквана изразена локусна хетерогенност (> 20 различни гена). Сравнението на резултатите в двете групи показва, че по-голям шанс за достигане до етиологична диагноза имат пациентите с клинично разпознаваем фенотип на заболявания с относително хомогенна генетична етиология (еднозначна генетична диагноза е установена при ~70% в група 1 (12 от 17 изследвани) срещу ~38 % във 2-ра група (10 от 26 изследвани). Патологични генни варианти, съответстващи на конкретна диагноза на моногенно заболяване, асоциирани с клиничните симптоми са установени общо при 51% от изследваните пациенти. При пациенти № 9, 10 и 16, като и при здравите родственици на болни (1а, 3а, 4а и 5а) резултатът от анализа позволи прецизиране на диагнозата и провеждане на адекватна генетична консултация. При 4 (~23%) пациенти от 1-ва група, етиологичната причина за болестния фенотип не беше установена (пациенти № 6, 7, 14 и 15). При пациент №1 беше намерен само един патологичен алел, асоцииран с клиничния фенотип, в хетерозиготно състояние, което при болести с автозомно рецесивен тип на унаследяване не дава възможност еднозначно да се потвърди или отхвърли работната клинична диагноза. Резултатът на пациент №1 е фалшиво негативен и ако данните от ДНК секвенционния анализ се интерпретират независимо от фенотипа, този резултат би довел до погрешно заключение, че пациент №1 е само носител на муковисцидоза, но не болен.

#### **4.4.1. Обсъждане на установените патологични ДНК варианти при пациенти от 1-ва група**

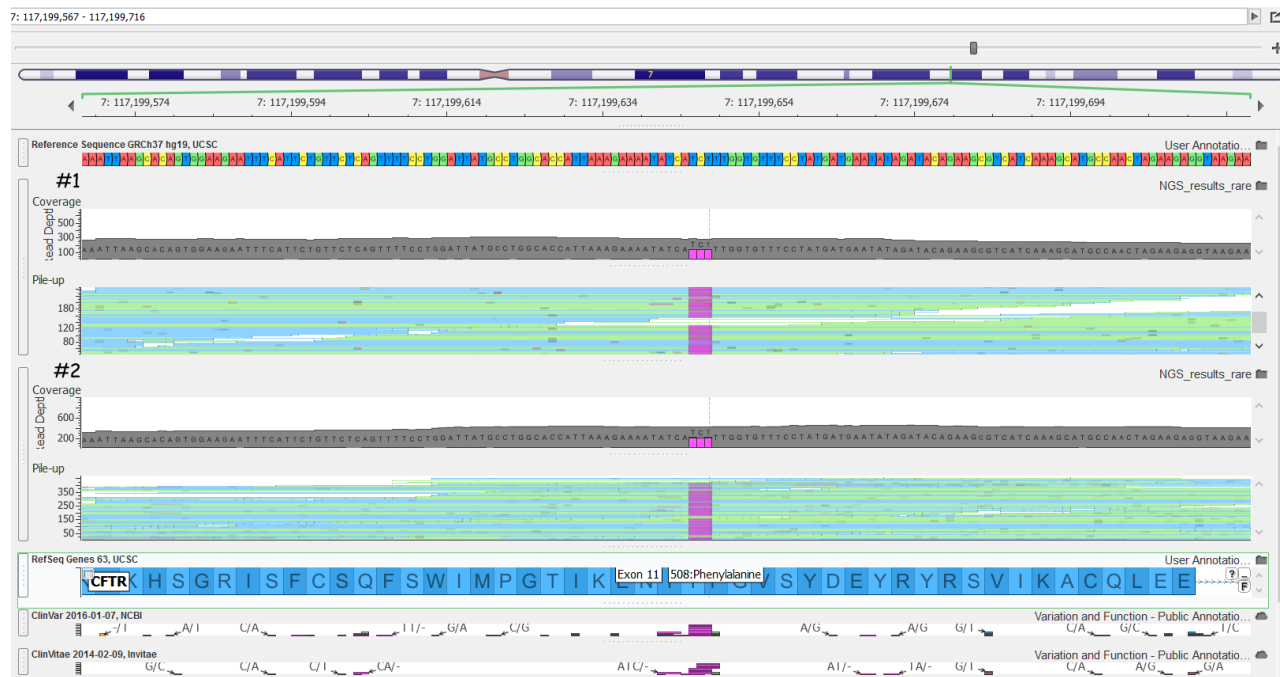
- *Патологични варианти в гена CFTR, при пациенти с фенотип на Кистозна фиброза*

Пациенти 1 и 2 са с клинична диагноза Муковисцидоза. При ДНК скрининг за мутации в *CFTR* гена и при двамата пациенти е установена само по една мутация, асоциирана с болестния фенотип (p.Phe508del) в хетерозиготно състояние.

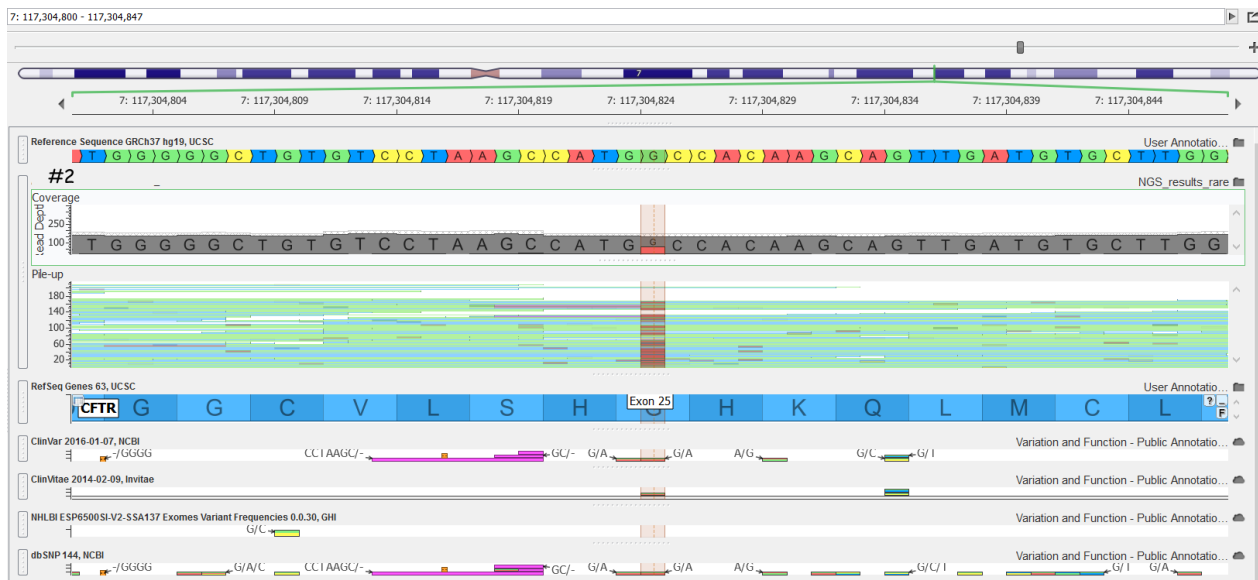
ДНК секвенционният анализ от ново поколение доведе до установяване и на втората патогенна мутация при пациент 2 - *CFTR*: p.Gly1349Asp. Резултатът е потвърден със секвениране по Сангер. Мутацията е известна и е съобщавана при пациенти с муковисцидоза. Замяната на глицин с аспаргат в позиция 1349 на *CFTR* протеина нарушава структурата на втория нуклеотид-свързващ домен (*NBD2*) и се отнася към клас 3 мутациите (Logan, J., 1994).

На фигура 8 е представен екзон 11 на *CFTR* гена при пациенти 1 и 2. Делетираните нуклеотиди са маркирани. На фигура 9 е представен екзон 25 на гена *CFTR* при пациент 2. Замененият нуклеотид е маркиран.

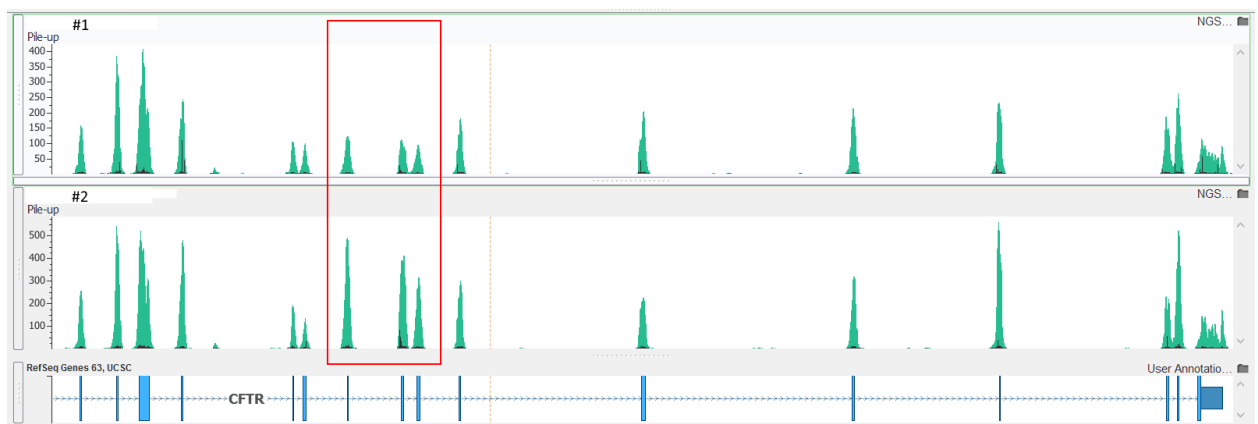
При ДНК анализа чрез секвениране на пациент 1 не беше установена втора патологична мутация в кодиращата последователност на гена *CFTR*. Последващо изследване чрез MLPA (в НГЛ) установи хетерозиготна делеция на 18-ти до 20-ти екзони на гена *CFTR* при пациента. Audrezet и съавт. (2004) при изследване на кохорта от 39 подробно характеризирани пациенти с класическа форма на муковисцидоза и поне един неизвестен алел, намират големи пренареждания на *CFTR* гена от типа на екзонни делеции / дупликации в 16% от изследваните. При сравнение на данните от секвенирането на пациент 1 с данните на други пациенти, изследвани със същия генен панел се установява разлика в съотношението на броя прочити за екзоните, обхванати от делецията и съседните екзони с нормален брой копия (фигура 10). Вероятно в бъдеще данните от NGS анализ ще могат да се ползват за разкриване на генни / екзонни делеции / дупликации.



Фигура 8 Мутация в *CFTR*: p.Phe508del



**Фигура 9** Мутация *CFTR*: p.Gly1349Asp



**Фигура 10.** Показва визуално данните от секвенирането за пациенти 1 и 2 в участъка от 12-ти до 27-ми екзон на гена *CFTR*. С червено са оградени екзоните, обхванати от делецията при пациент 1 (екзон 18-20). В зелено са представени ДНК фрагментите на пациенти № 1 и 2, картирани спрямо референтната ДНК последователност на гена *CFTR*.

- **Патологични варианти в гена *DMD* при пациенти с фенотип на мускулна дистрофия**

Двама от изследваните пациенти (3 и 4) от 1-ва група са момчета с клинични данни за мускулна дистрофия тип Дюшен и негативен резултат от проведен ДНК анализ за делеции/дупликации в *DMD* гена и за най-честите мутации в *CAPN3* гена.

При пациент 3 е установена точкова мутация в дистрофиновия ген *DMD*: g.31986568C>A, c.6502G>T, p.Glu2168Ter в хемизиготно състояние.

Мутацията представлява замяна на цитозин с аденин в позиция 31986568 в X-хромозомата. Вариантът води до възникване на преждевременен стоп-кодон в 45-ти екзон, вследствие на замяна на първата база в кодон 2168, кодиращ аминокиселината глутамин

(Gln). Мутацията не е регистрирана досега. Вариантът е класифициран като патологичен, тъй като формирането на стоп-кодон в кодиращата последователност би довело до синтез на белтъчен продукт със скъсена аминокиселинна верига. Мутацията засяга централния домен на дистрофина (спектрин подобен мотив 17). Други нонсенс мутации в *DMD* гена са съобщавани при пациенти с вариабилен по тежест фенотип на дистрофинопатия (Bulman, D. E., et al, 1991; Tran, V. K., et al, 2007; Buzin, C. H., et al, 2005; Ginjaar, I. B., et al, 2000; Winnard, A. V., et al, 1992; Roberts, R. G., et al, 1992). Клиничните симптоми на пациент №3 са типични за прогресивна мускулна дистрофия тип Дюшен: мускулна слабост с предимно засягане на проксималните мускулни групи, лесна уморяемост, повишена серумна креатинкиназа - >1000 UI/l и задълбочаване на симптомите с напредване на възрастта. На фигура 11 е представен 45-ти екзон на *DMD* гена с генна мутация при пациент №3. Замененият нуклеотид е маркиран.

При пациент 4 е установен генетичен вариант в *DMD* гена, водещ до замяна на единична аминокиселина с друга в полипептидната верига на дистрофина: chrX: g.31496398T>C, NM\_004006.2:c.8762A>G, NP\_003997.1:p.His2921Arg. На фигура 12 е представена мутацията в 59-ти екзон на *DMD* гена. Замененият нуклеотид е маркиран.



**Фигура 11** Мутация в дистрофиновия ген *DMD*: g.31986568C>A, c.6502G>T, p.Glu2168Ter



**Фигура 12** Мутация в дистрофиновия ген *DMD*: chrX: g.31496398T>C, NM\_004006.2:c.8762A>G, NP\_003997.1:p.His2921Arg. при пациент 4

Установеният вариант *DMD*: p.His2921Arg е в хемизиготно състояние. Генната мутация представлява замяна на тимидин с цитозин в позиция 31496398 на X-хромозомата, водеща до замяна на аминокиселината хистидин (His) с аргинин (Arg) в позиция 2921 на белтъчния продукт на гена *DMD*. Вариантът е регистриран в OMIM като патологичен, асоцииран с фенотип на „Мускулна дистрофия тип Бекер“ (OMIM: 300377.0063; dbSNP: 1800279; Lenk U., et al, 1994). Допускаме, че е възможно мутацията да е бенигнен вариант, тъй като се открива с честота над 1% при европейците изследвани по проекта NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), като 48 от тях са мъже хемизиготи. При пациент 4 не бяха установени известни патологични варианти в ДНК последователността на други гени, асоциирани с фенотип на мускулна дистрофия. Все пак панелът ползван при секвенирането не включва всички гени, чиито мутации се асоциират с фенотип на мускулна дистрофия и анализът не може да изключи наличие на екзонни делеции / дупликации в гените с нормална ДНК последователност.

При същия пациент е установено хетерозиготно носителство на 2 патологични варианта в гени, асоциирани с други автозомно-рецесивни моногенни заболявания:

а) *MAN2B1*:c.2248C>T: конкретният вариант в гена *MAN2B1* е асоцииран с фенотип на дефицит на алфа-манозидаза и е описан при хомозиготни пациенти със заболяването (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV000001755.1/>).

б) *MKS1*: p.Ser372del: вариантът е с екстремно ниска глобална популационна честота и е открит в хомозиготно състояние при пациент (№35) с тежък клиничен фенотип от спектъра на синдрома на Meckel, включващ вентрикуларен септален дефект на сърцето, аномалия на ЦНС, дисморфизъм и интелектуален дефицит.

При двамата изследвани пациенти с фенотип на мускулна дистрофия тип пояс-крайник са установени варианти в кодиращата последователност на дистрофиновия ген, подкрепящи клиничната диагноза: мисенс мутация в екзон 59 при пациент 4, свързана с мускулна

дистрофия тип Бекер и нова патологична нонсенс мутация в екзон 45 при пациент 3. Вариантите са потвърдени чрез секвениране по Сангер в Националната генетична лаборатория (НГЛ).

- **Патологичен вариант *ATM*, p.Glu2139IlefsTer6**

Вариантът е установен при пациент 13 в хомозиготно състояние. Пациент №13 от група 1 е момче, починало на 10 годишна възраст, с типични клинични прояви на Атаксия-телангиектазия. Генетичният анализ е извършен с ДНК проба, изолирана от тъкан включена в парафин. При пациента е установен един патологичен вариант в гена *ATM* (NM\_000051.3:c.6412\_6413delAG, p.Glu2139IlefsTer6) в хомозиготно състояние. Вариантът представлява делеция на две нуклеотидни бази (A и G) в позиция 108190745-108190746 на 11-та хромозома (фигура 13). Делецията засяга нуклеотидната последователност на 44-ти екзон на гена. Вариантът води до замяна на аминокиселината глутамат (в позиция 2139 на протеина) с изолевцин, изместване на рамката на четене, образуване на преждевременен стоп-кодон в новата рамка на четене. Промяната засяга функционално важен район на протеина – FAT домена. Вариантът е намиран при пациенти с класически фенотип на Атаксия-телангиектазия (McConville et al., 1996). Естеството на варианта предполага, че е патогенен и в хомозиготно състояние би довел до заболяване. При ДНК анализа на пациент №13 прави впечатление общо по-малкия добив на данни и съответно по-малък брой прочити в таргетните райони (средно около 30, срещу средно 50-100 при останалите изследвани контроли и пациенти), както и по-малката средна дължина на секвенираните ДНК фрагменти – всичко това са особености, които вероятно се дължат на обработката на тъканта с формалин преди включването и в парафин.



**Фигура 13** Мутация *ATM*, p.Glu2139IlefsTer6 при пациент 13.

При пациента са установени няколко полиморфни бенигнни варианта (rs664982 T/T, rs664143 G/G, rs72110550 -/-, rs659243 G/G) в участъка от 31-ви до 63-ти екзон на *ATM*, като всички те се откриват в хомозиготно състояние. Пациентът е хетерозиготен по полиморфния вариант rs672655 A/G, който е локализиран в 15-ти интрон. Тази находка би

могла да означава, че пациентът не е същински хомозигот, а носи втори патогенен алел, който е делеция обхващаща значителна част от гена *ATM*. Патологичният вариант е потвърден чрез Сангер секвениране на екзон 44 и двамата родители са изследвани за носителство на мутацията. Вариантът *ATM*, p.Glu2139IlefsTer6 е установен само при единия родител. Не е провеждан MLPA или qPCR анализ за установяване на вътрегенни делеции / дупликации на *ATM*. Смята се, че големите пренареждания на *ATM* гена са рядко срещани (Wright, J. Et al, 1996, Concannon, P. et al, 1997), но е възможно подобен тип патологични алели да са с по-висока честота у нас.

Девет от пациентите от група 1 са изследвани чрез NGS във връзка с проявен фенотип на метаболитно заболяване (пациенти 5, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 16 и 17). Патологични варианти, потвърждаващи клиничната диагноза са установени при 5 от изследваните. При четирима пациенти (един с 3-метил-глутаконова ацидурия (6), един с Митохондриална енцефалопатия, дефицит на комплекси I, III и IV (7) и при двама с Гликогеноза (14 и 15) не бяха установени патологични варианти, асоциирани с фенотипа в гените от панела TruSight Inherited.

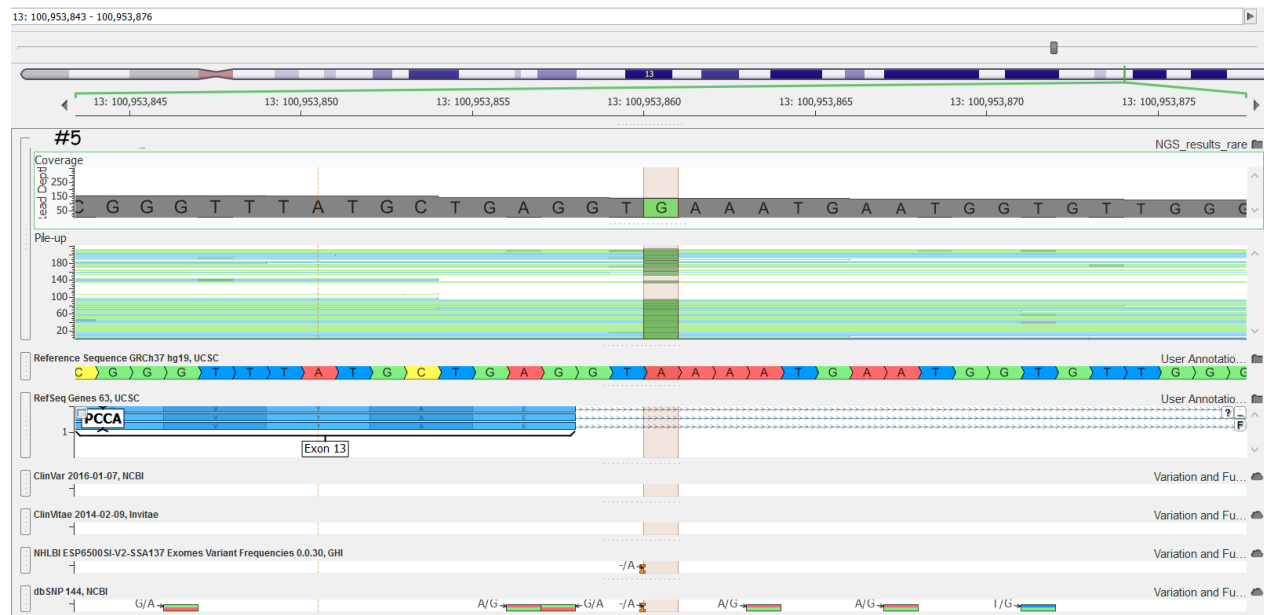
При пациентите с метаболитни заболявания се очаква прилагането на методи за молекулярна ДНК диагностика, дори ако се прилага традиционната стратегия на изследване „ген-по-ген“, да доведе до разкриване на подлежащия генетичен дефект. Това очакване се основава на факта, че за голяма част от метаболитните болести с разпознаваем фенотип, най-честите подлежащи генетични дефекти са вече известни.

- **Патологичен вариант *PCCA*: g.100953860A>G c.1209+3A>G**

Вариантът е установен в хомозиготно състояние при момиче на 2 години и 10 месеца (пациент 5). Клиничните симптоми включват мускулна хипотония, гърчове, атаксия, лицев дисморфизъм, остеопороза, регистрирана е метаболитна ацидоза и хиперамониемия. При проведен метаболитен скрининг са установени промени в профила на аминокиселини и ацилкарнитини в кръв и в профила на органични киселини в урина, съответстващи на пропионова ацидемия. Пропионовата ацидемия (OMIM # 606054) е една от най-честите органични ацидемии и се дължи на дефицит на ензима пропионил-СоА карбоксилаза (*PCC*, E.C.6.4.1.3). Заболяването се унаследява автозомно-рецесивно, като причина за фенотипа са мутации в един от двата гена, *PCCA* (OMIM 232000) или *PCCB* (OMIM 232050), кодиращи съответно  $\alpha$  и  $\beta$  субединиците на ензима. Заболяването може да бъде фатално с презентация в неонаталния период, макар че при някои пациенти изязвата е по-късна и протичането е по-леко (Fenton et al.2001). Пропионовата ацидемия е хетерогенна на генетично ниво, особено при пациенти от бялата раса. В гена *PCCA* не са установени преобладаващи мутации, докато болестните алели в гена *PCCB* са относително малко на брой.

При пациентката е установена хомозиготна замяна на аденин с гуанин в позиция 100953860 на 13-та хромозома: *PCCA* (*Propionyl-CoA carboxylase, alpha subunit*): c.1209+3A>G. Установеният вариант е известен патологичен и се смята, че нарушава процеса на съзряване на мРНК на гена *PCCA*, като води до отпадане на екзон 13 и намален синтез на белтъчни молекули със съхранена ензимна активност (Lourdes R. et al., 2006). Мутацията *PCCA*: c.1209+3A> G е транзиция, засягаща консенсусната последователност на 5'-донорното сплайс място на екзон 13. При изследване на cDNA е наблюдавано

„пропускане“ на екзон 13, което предполага синтез на скъсен протеин с вътрешна делеция на 48 аминокиселини. Тази мутация е била установена при двама пациенти от турски произход и при един пациент от Афганистан. При пациентката не са доказани други патологични мутации в гените *PCCA* и *PCCB*. Конкретната мутация е свързана с вариабилен клиничен фенотип и относително по-леко протичане на заболяването, тъй като при носителите на този вариант е установено образуване на малко количество нормални мРНК молекули дори и при хомозиготи (Desviat LR et al 2006). На фигура 14 е представен участъкът от екзон 13 и 5' границата екзон-интрон на гена *PCCA* при пациент 5. Замененият нуклеотид е маркиран.

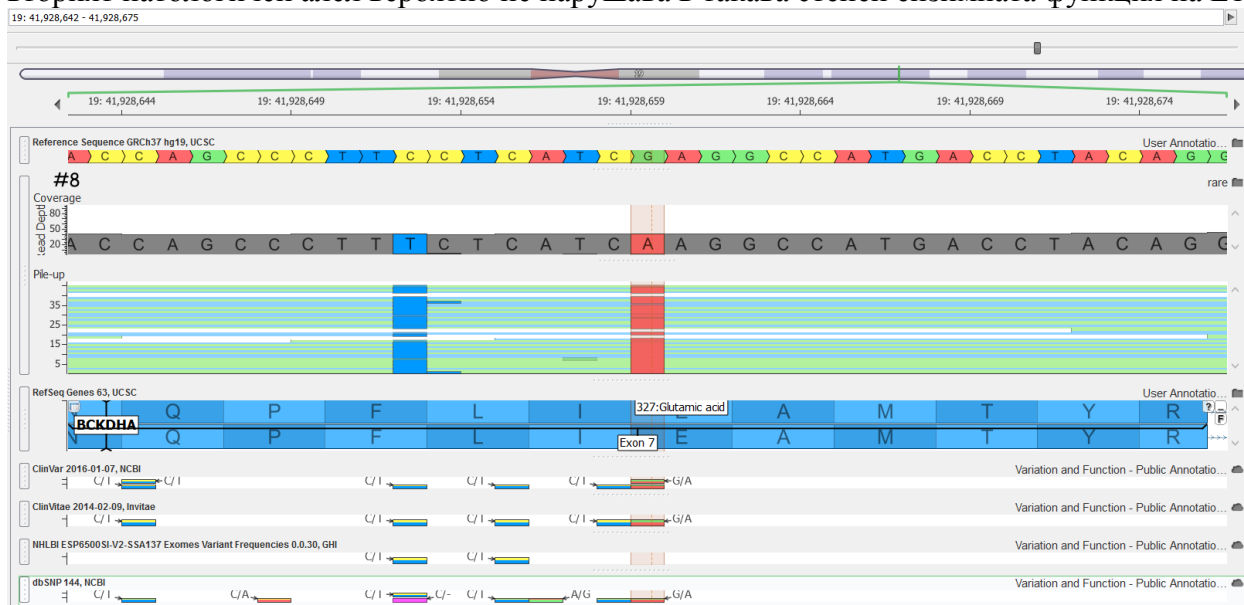


**Фигура 14** Мутация *PCCA*: с.1209+3A>G при пациент 5

- **Патологичен вариант *BCKDHA*: g.41928659G>A, с.979G>A, p. Glu327Lys**

Вариантът е установен при пациент №8. При пациентката е установена хомозиготна замяна на нуклеотида гуанин с аденин в кодиращата последователност на гена *BCKDHA* в позиция 41928659 на 19-та хромозома. Генът *BCKDHA* кодира E1-алфа субединицата на дехидрогеназния комплекс, който катализира окислително декарбоксилиране на алфа-кето киселините с разклонена верига (получени от изолевцин, валин и левцин) (Wynn, 1998.). Комплексът се състои от 3 каталитични компонента: E1 - хетеротетрамерна декарбоксилаза от две алфа и две бета субединици ( $\alpha 2$ - $\beta 2$ ), E2 – дихидролипоил-трансацилаза съставена от 24 еднакви субединици и E3 – дихидролипоамид-дехидрогеназа, която е хомодимер. E1 е тиамин пирофосфат-зависим ензим. Комплексът включва също и два регулаторни ензима: киназа и фосфорилаза. Патологичните варианти във всеки от гените *BCKDHA*, *BCKDHB* и *DBT*, кодиращи съответно E1 $\alpha$ , E1 $\beta$  и E2 каталитичните компоненти на дехидрогеназния комплекс на алфа-кетокиселините с разклонена верига са причина за заболяването левциноза (MSUD, Урина с мирис на кленов сироп). В зависимост от това, в кой от гените се откриват мутации, генетичните подтипове на заболяването са: тип Ia (MIM# 608348) – при мутации в *BCKDHA*; тип Ib (MIM# 248611) - при мутации в *BCKDHB*, тип II (MIM# 248610) – при мутации в *DBT* и тип III (MIM# 238331) – при мутации в *DLD* (кодиращ E3 субединицата) (Chuang, 2001).

Мутацията открита при пациент №8 е позната и е наблюдавана при един съставен хетерозигот с вариантна форма на заболяването и остатъчната ензимна активност около 2,5% от нормалната (Rodríguez-Pombo P, 2006). Нуклеотидната замяна води до промяна в консервативен район на белтъчния продукт на гена *BCKDHA*: на 327-ма позиция в аминокиселинната верига глутамин се заменя с лизин. Смята се, че вариантът нарушава  $\alpha$ - $\alpha'$  взаимодействието в ензимния комплекс. На фигура 15 е представен участъкът от екзон 7 на гена *BCKDHA* при пациентката. При пациент 8 симптомите на заболяването са регистрирани още през първата седмица след раждането и са включвали мускулна хипотония, летаргия, хипогликемия и странна миризма на урината. При проведенения селективен метаболитен скрининг е установен профил характерен за заболяването Левциноза и е започнато лечение. Независимо, че в резултат на лечението е постигнато подобрене на метаболитните отклонения (нормализиране на стойностите на валин и намаляване на стойностите на левцин и изолевцин в кръвта), детето е починало. Ранната презентация на симптомите, както и ранната смърт на пациентката показват, че установеният патологичен вариант p.Glu327Lys, вероятно е асоцииран с най-тежката неонатална форма на заболяването. По-лекият фенотип, регистриран при пациентката на Rodríguez-Pombo P (2006), вероятно се дължи на това, че тя е била съставен хетерозигот и вторият патологичен алел вероятно не нарушава в такава степен ензимната функция на E1.



**Фигура 15** Вариант *BCKDHA*, p.Glu327Lys при пациент 8. Замененият нуклеотид е маркиран в червено.

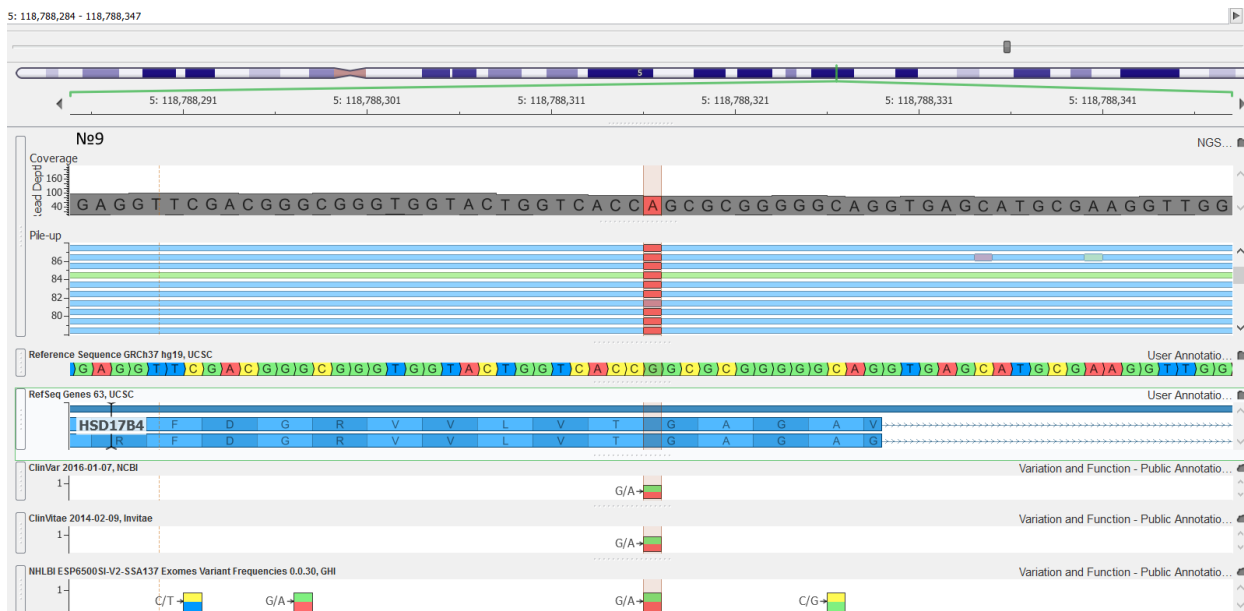
- **Патологичен вариант *HSD17B4*: g.118788316G>A, NM\_001199291.1: c.-133G>A, NM\_000414.3: c.46G>A, NP\_000405.1: p.Gly16Ser, rs137853096**

Вариантът е открит при пациент 9. Пациент 9 е момче от турски етнически произход, родено от трета бременност, протекла с хиперемезис. Детето е родено на термин с нормални ръст и тегло (2890 г / 50 см), без данни за перинатална асфиксия. От раждането са налице подчертана мускулна хипотония, липса на неонатални рефлексии, клонични гърчове и орални автоматизми. При ТФЕ и КТ на ЦНС е регистриран мозъчен оток и

идиректни данни за агенезия на Corpus callosum. Установен е дисморфизъм: долохоцефална конфигурация на главата, голяма фонтанела 3x3 см, отворена малка фонтанела, дълъг тесен гръден кош. При селективен метаболитен скрининг са установени екстремно повишени стойности на мастните киселини с много дълга верига в кръв (C26:0 – 19,85  $\mu\text{mol/l}$ ; C26:0/C22:0 – 4,55; C24:0/C22:0 – 1,76). Симптомите и находките от метаболитния скрининг съответстват на пероксизомно заболяване от спектъра на Zellweger. Детето е починало на възраст 11 месеца.

Нарушенията от спектъра на Zellweger са група редки генетични мултисистемни болести, които се дължат на дефекти в биогенезата на пероксизомите или по-рядко на дефицит на единични пероксизомни ензими. Фенотипната изява е вариабилна: синдром на Zellweger е най-тежката форма на заболяването, неонаталната адренолевкодистрофия е междинна форма, и инфантилната болест на Refsum е най-леката форма. Симптомите включват неврологични дефицити, мускулна хипотония, загуба на слуха, нарушения в зрението, чернодробна и бъбречна дисфункция. Заболяването обикновено води до тежки животозастрашаващи усложнения още по време на най-ранното детство, макар че някои пациенти с по-лека форма могат да доживеят до зряла възраст. При пациент 9 не са установени патологични варианти в гените, асоциирани с дефекти в биогенезата на пероксизомите, но се установи мутация в ген кодиращ пероксизомен ензим - *HSD17B4*.

Патологичният вариант представлява хомозиготна нуклеотидна замяна на гуанин с аденин в позиция 118788316 на 5-та хромозома. Промяната засяга кодиращата последователност на гена *HSD17B4* и води до замяна на гуанин с аденин в кодон 16 (на ниво мРНК) и до продукция на протеин с аминокиселинна замяна (глицинът на 16-та позиция е заменен със серин). Вариантът е известен и е наблюдаван при пациенти с дефицит на D-бифункционалния протеин в пероксизомите (<http://www.omim.org/entry/261515>). Генът *HSD17B4* кодира ензим участващ в бета-окислението на мастните киселини в пероксизомите. Мултифункционалният протеин 2, познат още като D-бифункционален протеин, катализира втората (хидратация) и третата (дехидрогениране) реакции на пероксизомното бета-окисление на мастните киселини. Двете ензимни активности на протеина, еноил-СоА-хидратаза и D-3-хидроксиацил-СоА дехидрогеназа, са есенциални за окислението на широк кръг от пероксизомни субстрати (висши мастни киселини (с много дълга верига), мастни киселини с разклонена верига, прекурсори на жлъчните киселини)(van Grunsven EG et al, 1998; van Grunsven EG et al, 1999). Конкретният вариант, засяга структурата на NAD(+) свързващ домен и води до пълна загуба на D-3-хидроксиацил-СоА дехидрогеназната активност на ензима. D-бифункционалният протеин катализира формирането на 3-кетоацил-СоА междинни метаболити от мастните киселини с права и 2-метил-разклонена верига и скъсяването на холестерола при образуване на жлъчни киселини. Клиничните прояви на дефицита на D-бифункционалния протеин са подобни на тези при болестите с нарушена биогенеза на пероксизомите (включително X-свързана адренолевкодистрофия, синдром на Zellweger и неонатална адренолевкодистрофия). Заболяването е тежко и се характеризира с мускулна хипотония с ранно начало, гърчове, лицев дисморфизъм, загуба на слуха, нарушено зрение, изоставане в невропсихичното развитие (тежка степен), полимикрогирия, хипо-/аплазия на Corpus callosum, дисмиелинизация, забавено провеждане на импулсите в периферните нерви, повечето пациенти загиват преди 2-годишна възраст. На фигура 16 е представен участъкът от екзон 1 на гена *HSD17B4* при пациент 9. Вариантът е потвърден със секвениране по Сангер и е установен в хетерозиготно състояние при всеки от родителите.



**Фигура 16** Мутация *HSD17B4* p.Gly16Ser при пациент 9.

- **Патологични варианти в гена *PHKG2* p.Asp153Val и p.Leu160del**

Вариантите са установени при пациент 16. Пациент 16 е момиче на 1 г. с клинична диагноза чернодробна гликогеноза. Детето е от български етнически произход, родено от втора нормално протекла бременност, с нормални тегло и ръст при раждането и с нормално ранно развитие. При преглед по повод фебрилитет (без други оплаквания) е установена хепатомегалия. Детето е хоспитализирано като е потвърдено наличието на хепато-спленомегалия. Обективно са установени: макулозен обрив по тялото, увеличена подкожна мастна тъкан, четирипръстна бразда на едната длан, ставна свръхподвижност, кукленски фациес. От проведените лабораторни изследвания са установени данни за тромбоцитопения, левкоцитопения с неутропения и лимфоцитоза, цитолиза и холестаза (ALAT – 316-496 IU/L; ASAT – 617-722 IU/L; GGTP – 250 IU/L; LDH – 680-1047 IU/L), повишени триглицериди и алфафетопротейн в кръв, нормални стойности в кръвта на глюкоза, билирубин, холестерол, креатинин, общ белтък и албумин, електролити, амилаза, пикочна киселина, алфа1-антитрипсин. При образни изследвания (УЗИ и КТ) е регистрирана хепатомегалия, увеличена плътност на чернодронбия паренхим, с данни за дифузен процес, без данни портална хипертония, спленомегалия – с повишена плътност на паренхима, останалите коремни органи (панкреас, бъбреци, надбъбреци) са с нормална топика и размери. Проведена е чернодробна биопсия и хистологичният резултат е потвърдил съмнението за гликогеноза.

При проведения ДНК анализ чрез секвениране с панела TruSight One бяха установени два вероятно патологични варианта в гена *PHKG2*: p.Asp153Val и p.Leu160del, в хетерозиготно състояние (съставен хетерозигот).

Генът *PHKG2* кодира чернодробната и тестикуларната изоформа на гама-субединицата на ензима фосфоорилазокиназа. Патологичните варианти в гена се проявяват фенотипно при хомозиготи и при съставни хетерозиготи като автозомно рецесивна форма на гликогеноза тип IXc (Glycogen storage disease IXc, <http://omim.org/entry/613027>). Клинично

заболяването се характеризира с натрупване на гликоген в черния дроб, забавен растеж по време на детството, но достигане на нормален ръст при възрастни, хипогликемия и кетоза при гладуване, хепатомегалия, спленомегалия, чернодробна фиброза, която може да прогресира до цироза, повишени чернодробни трансминази, повишени серумни триглицериди (Bali, D. S. et al. 2014.; Albash B et al, 2014). Активността на ензима в мускулите е умерено понижена до нормална. Може да има забавено моторно развитие, но като цяло няма засягане на мускулите и сърцето. Симптомите се проявяват в ранното детство, като има тенденция за нормализиране на биохимичните отклонения с възрастта. При пациентката двата варианта засягат последователността на 6-ти екзон на гена. Единият вариант е трансверзия на А с Т и води до аминокиселинна замяна в белтъчния продукт - р.Asp153Val. Вариантът е известен и е с екстремно ниска популационна честота (по данни на ExAC MAF=0.000008236(T)). Функционалните предиктори го оценяват като потенциално патогенен (MetaSVM Pred: Damaging, със скор 1), което не е изненадващо като се има предвид, че това е активния център на ензима. Вторият вариант не е съобщаван досега. Втората мутация е делеция на три двойки бази, запазваща рамката на четене, но водеща до загуба на левцин на 160-та позиция в протеина. От резултата на пациентката се установи, че тя е съставен хетерозигот. При установяване на варианти с близка геномна локализация, както е в случая, е възможно да се определи фазата на скаченост, дори и без да бъдат изследвани родителите, което е едно от предимствата на масивното паралелно секвениране в сравнение със секвенирането по Sanger. На фигура 17 е представен участъкът от на екзон 6 на *PHKG2* при пациентката.



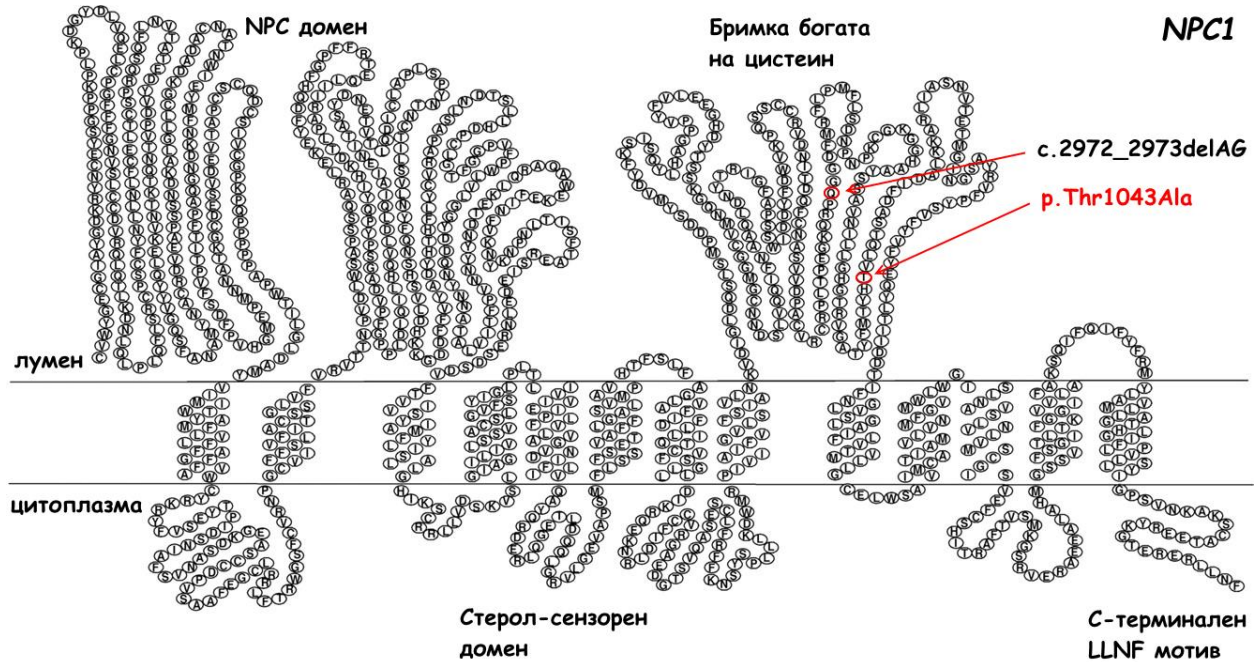
**Фигура 17** Съставно хетерозиготно носителство на *PHKG2* p.Asp153Val и p.Leu160del при пациент 16.

- Патологични варианти в гена *NPC1*: p.Thr1043Ala и c.2972\_2973delAG (p.Gln991Argfs)

Патологичните варианти са установени при пациент 17. Пациент 17 е момиче починало от усложненията на болестта Niemann-Pick тип С. Болестта на Niemann-Pick е мултисистемно заболяване от групата на лизозомните болести на натрупването, при което се наблюдава широка гама от симптоми с варираща тежест. Болестта на Niemann-Pick се подразделя на четири основни типа, в зависимост от подлежащия генетичен дефект: тип А, тип В, тип С1 и тип С2. Въз основа на тежестта на симптомите и възрастта на появата им, отделните типове се подразделят на тежки инфантилни, по-леки ювенилни и адултни форми. Тип С е биохимично, генетично и клинично различен от типовете А и В, които се дължат на пълн или частичен дефицит на ензима кисела сфингомиелиназа. Симптомите при тип С1 и С2 са много сходни и двата типа са неразличими на клинично ниво. При тип С първите симптоми най-често се проявяват по време на детството (2-4 год), но презентацията може да бъде на всяка възраст (Shulman LM et al, 1995; Spiegel R et al, 2009). Отличителен белег е прогресивната неврологична симптоматика, която води до тежка инвалидизация и преждевременна смърт. Неврологичните симптоми включват малкомозъчна атаксия, дизартрия, дисфагия, тремор, епилепсия (парциална и генерализирана), вертикална супрануклеарна парализа, инверсия на съня, атонични пристъпи, дистония, спастичност, хипотония, птоза, микроцефалия, прогресивна деменция, психоза. В крайните стадии на заболяването болните са приковани на легло, с пълна офталмоплегия, загуба на способността да извършват волеви движения и тежка деменция. При болните често се открива хепатоспленомегалия, но този симптом може да отсъства при формите с късно начало. Тип С е генетично хетерогенен. Vanier и Millat (2003) посочват, че приблизително 95% от пациентите с болест на Niemann-Pick тип С имат мутации в гена *NPC1*, който кодира голям мембранен гликопротеин локализиран предимно в ендозомите, докато останалите имат мутации в гена *NPC2*, който кодира малък лизозомен холестерол-свързващ протеин. Идентичните биохимични промени, наблюдавани в *NPC1* и *NPC2* мутанти (натрупване на неестерифициран холестерол) предполагат, че двата протеина функционират координирано и участват във вътреклетъчния транспорт на холестерол, гликолипиди и други субстанции (Vanier и Millat, 2003).

При пациентката са установени два хетерозиготни варианта в гена *NPC1*: единият е известен патологичен (p.Gln991ArgfsTer15), а вторият е нов вероятно патологичен (p.Thr1043Ala). Вариантът g.21118574\_21118575delCT (p.Gln991ArgfsTer15) представлява хетерозиготна делеция на две нуклеотидни двойки в кодиращата последователност на 20-ти екзон на гена, което на ниво информационна РНК води до изместване на рамката на четене, замяна на глутамин на 991-ва позиция с аргинин и образуване на по-ранен стоп-кодон в новата рамка на четене. Вариантът е съобщаван при пациенти от еврейски (Ashkenazi) произход с тежка форма на заболяването и начална изява по време на феталното развитие (Spiegel R et al, 2009). Вторият вариант, g.21116755T>C (p.Thr1043Ala), представлява хетерозиготна нуклеотидна замяна на тимин с цитозин в позиция 21116755 на 18-та хромозома. Замяната засяга кодиращата последователност на 21-ви екзон на гена *NPC1* и води до замяна на треонин с аланин на 1043-та позиция в протеина (фигура 18). Вариантът не е съобщаван досега в медицинските бази данни за патологични варианти, не е наблюдаван при никой от индивидите изследвани по проектите NHLBI Exome Sequencing Project и 1000genomes, засяга функционално важен район на протеина и според предикцията на ефекта може да наруши функцията на NPC1 протеина. Това дава основания вариантът да бъде класифициран като вероятно

патологичен. На фигури 19 и 20 са представени екзони 20 и 21 на *NPC1* гена при пациентката.



**Фигура 18** Локализация на аминокиселините, засегнати от мутации при пациент 17. Ползван е топологичния модел на *NPC1* на JP Davies и YA Ioannou (2000).



**Фигура 19** Мутация *NPC1* c.2972\_2973delAG, p.Gln991Argfs при пациент 17.



**Фигура 20** Мутация *NPC1* p.Thr1043Ala при пациент 17

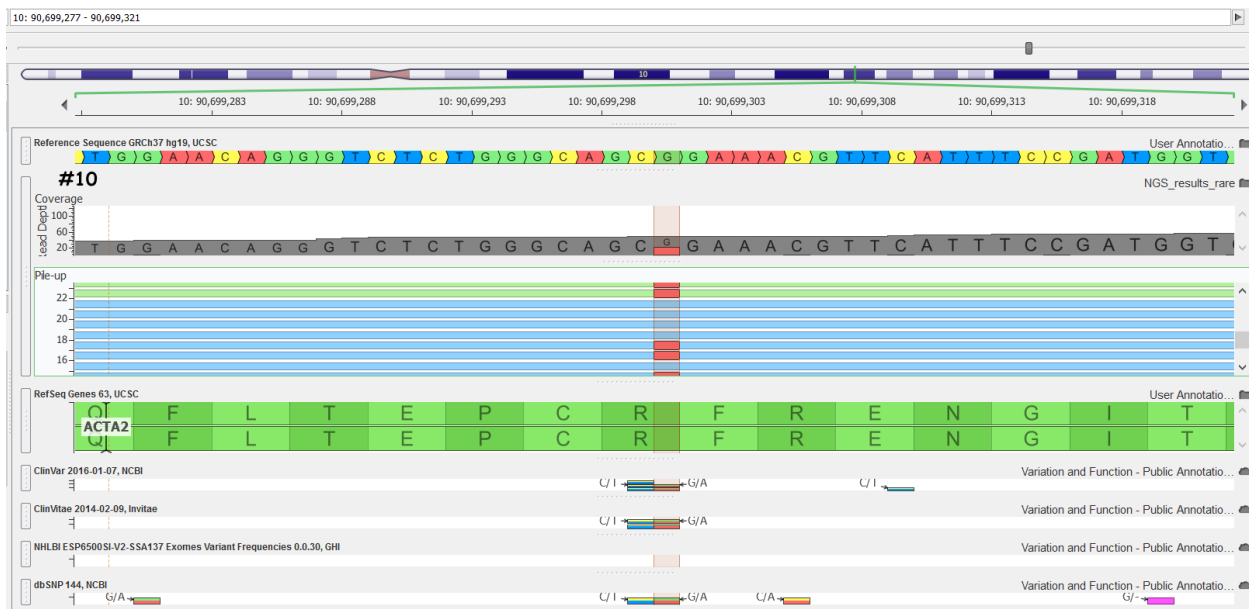
- **Патологичен вариант *ACTA2* p.Arg258Cys**

Вариантът е открит при пациент 10 в хетерозиготно състояние. Пациент 10 е момче на 15 години, родено от втора нормално протекла бременност и раждане, с нормални тегло и ръст при раждането (3600 г / 53 см). Опериран е на 6-месечна възраст по повод персистиращ артериален канал. Редовно проследяван до 7-годишна възраст в детска кардиологична клиника на НКБ – без отклонения в кардиологичия статус. Пациент 10 е с диагноза Дисекация на аортата трети тип. Няма данни за фамилна обремененост със сърдечно-съдови заболявания. До момента на заболяването младежът не е имал оплаквания, има нормално физическо и невропсихическо развитие, спортува активно (вдигане на тежести). Заболял е остро – с внезапна болка в гърба, съпроводена с изтръпване на левия крак. Приет е по спешност в болница, където въз основа на проведена КТ и ехокардиография е поставена диагноза дисекация на торакалната аорта и съмнение за тромбоза на илиачните артерии, впоследствие състоянието е усложнено със спинален инфаркт.

Смята се, че годишно аортната дисекация засяга 2-3,5 души на всеки 100000 население. Мъжете са по-често засегнати от жените: 65% от пациентите с аортна дисекация са мъже. Средната възраст на изява е 63 години (Hiratzka LF, Bakris GL, Beckman JA; et al. (April 2010). В зависимост от локализацията дисекациите на аортата се подразделят на проксимални и дистални. Аневризмите и дисекацията на аортата обикновено са в резултат на дегенеративни промени в аортната стена. Аневризмата и дисекацията на торакалния отдел на аортата се свързват предимно с характерен хистологичен вид – с некроза на медията или "кистозна некроза на медията тип Erdheim", при което се наблюдава дегенерация и фрагментиране на еластични влакна, загуба на гладкомускулни клетки и натрупване на базофилна субстанция, докато дегенерацията водеща до аневризма на коремната аорта, обикновено се причинява от комбинация от фактори, включващи

възраст, атеросклероза, хипертония, и инфекциозни, възпалителни или автоимунни процеси. Известно е, че некрозата на медията и съответно аневризмата / дисекцията на торакалната аорта се наблюдават при някои болести с малостойност на съединителната тъкан, като например синдром на Марфан и съдовия тип (тип IV) на синдром на Ehlers-Danlos. По-често, обаче, некрозата на медията се среща при индивиди, които нямат други белези на ясно определен синдром. Несиндромната дисекция на аортата е генетично хетерогенна и понастоящем са известни поне 7 локуса, асоциирани със заболяването: 11q23.3-q24 (AAT1), 5q13-q14 (AAT2), *MYH11* (AAT4, 16p13.11), *ACTA2* (AAT6, 10q23.31), *MYLK* (AAT7, 3q21.1), *PRKG1* (AAT8, 10q11.2-q21.1) и *MFAP5* (AAT9, 12p13.31).

При пациент 10 мутацията *ACTA2* p.Arg258Cys се установява в хетерозиготно състояние. Алфа-актинът на гладките мускули в аортата (кодиран от *ACTA2*) е една от шестте различни изоформи на актин, идентифицирани в гръбначните. Изоформите на актина имат сходни аминокиселинни последователности и са консервирани в еволюцията. Другите актинови изоформи са: актинът на скелетната мускулатура (*ACTA1*), на сърдечния мускул (*ACTC1*), на гладката мускулатура в червата (*ACTG2*), и цитоплазмените бета (*ACTB*) и гама (*ACTG1*) (*Vandekerckhove* и *Weber*, 1979). Главната функция на гладкомускулните клетки в съдовете е съкращението, което регулира кръвното налягане и дебит. Контрактилната сила зависи от цикличното взаимодействие между алфа-актина на гладкомускулните съдови клетки, кодиран от *ACTA2* и тежката верига на бета-миозин, кодирана от гена *MYH11*. *Guo et al.* (2007) показват, че несинонимните мутации в *ACTA2* са причина за 14% от наследствените форми на аневризми и дисекция на възходящата гръдна аорта (AAT6). Конкретният вариант е познат и е наблюдаван при пациенти с фамилна форма на аневризма на торакалната аорта (AAT6). В едно семейство от европейски произход с фамилна форма на торакална аневризма с дисекция на аортата *Guo et al.* (2007) идентифицирали транзиция 820G-A в екзон 7 на гена *ACTA2*, която води до замяна на Arg258 с хистидин (R258H). Подобно на пациент 10 един от болните в семейството е имал персистиращ артериален канал. При някои, пациенти носители на този вариант, се проявява фенотип на болестта тоуатоуа тип 5; (MYMY5), която се изразява в мозъчно-съдова болест дължаща се на стеноза на терминалните участъци на вътрешните каротидни артерии (*Guo, D.-C et al*, 2009). На фигура 21 е представен екзон 7 на *ACTA2* гена при пациент 10. Вариантът е потвърден със секвениране по Сангер и не е установен при никой от родителите на пациент 10, което съответства на липсата на данни за фамилност.



Фигура 21 Мутация ACTA2 p.Arg258Cys при пациент 10.

- **Патологичен вариант COL1A1 c.2775delT (p.Gly926ValfsTer182)**

Вариантът е установен при пациент №11. Пациент 11 е момиче на 2 г. с клинична диагноза Osteogenesis imperfecta – в течение на 18 месеца са регистрирани 4 фрактури с различна локализация (ключица, предмишница, бедрена кост и тибия), провокирани от минимална травма с последващо правилно зарастване. При детето не са установени други отклонения от физикалния статус и няма данни за фамилност. Заболяването е клинично и генетично хетерогенно - има най-малко осем клинични форми на остеогенезис имперфекта (класирани от тип I до тип VIII) и са известни поне 14 гена, чиито мутации асоциират с подобен фенотип (*P3H1*, *CRTAP*, *SPARC*, *COL1A2*, *BMP1*, *TMEM38B*, *IFITM5*, *SERPINH1*, *WNT1*, *SP7*, *PP1B*, *SERPINF1*, *FKBP10*, *COL1A1*). Остеогенезис имперфекта е група с генетични заболявания, които засягат предимно костите. Терминът "osteogenesis imperfecta" означава несъвършено образуване на кости. Основна характеристика на заболяването е намалената здравина на костите и наличието на фрактури, често провокирани от незначителна травма или дори без очевидна причина. При тежките форми фрактурите могат да настъпят още по време на вътреутробното развитие. Тип I е най-леката форма на заболяването, а тип II е най-тежката летална форма. Симптомите при другите типове на това заболяване попадат някъде между тези две крайности. Все по-често генетичните изследвания се използват за определяне на различните форми на остеогенезис имперфекта.

При пациент 11 е установена трункираща несъобщавана досега мутация в гена *COL1A1* в хетерозиготно състояние. Генът *COL1A1* кодира  $\alpha 1$ -проколагеновите фибрили на колаген тип 1. Колаген тип 1 е основният колаген в костите, кожата и сухожилията. Изграден е от три спирално завити полипептидни вериги (две  $\alpha 1$  и една  $\alpha 2$ ). Патологичните мутации в гена *COL1A1* са причина за три различни автозомно доминантни заболявания: Caffey disease (OMIM: 114000), Ehlers-Danlos syndrome (classic OMIM 130000; и тип VIIA, OMIM 130060), Osteogenesis imperfecta (type I, OMIM 166200; type II, OMIM 166210; type III,

OMIM 259420; type IV, OMIM 166220), като това, какъв ще бъде фенотипът, се определя главно от вида на мутантния алел. Мутациите, които по предикция водят до образуване на преждевременен стоп-кодон, изместване на рамката на четене или разрушават консервативните места за сплайсинг, са най-често срещаните видове дефекти при пациентите с фенотип на Osteogenesis imperfecta тип I (Willing M et al, 1993,1996). Вариантът установен при пациентката представлява делеция на аденин на позиция 48266792 в 17-та хромозома (фигура 22), водеща до изместване на рамката на четене и образуване на преждевременен стоп в новата рамка на четене (g.48266792delA, c.2775delT, p.Gly926ValfsTer182). Вариантът при пациентката съответства на клиничния фенотип Osteogenesis imperfecta тип I. Вариантът е потвърден чрез секвениране по Сангер.



**Фигура 22** Мутация *COL1A1*: g.48266792delA, NM\_000088.3: c.2775delT, NP\_000079.2: p.Gly926ValfsTer182 при пациент 11.

- **Патологични варианти в гена *COL7A1* p.Arg843Ter и p.Lys142Arg**

Вариантите в гена *COL7A1* са установени при пациент 12. Пациент 12 е момиче на 1 година с клинична диагноза Булозна епидермолиза. Проявите на заболяването са типични и включват образуване на булозни лезии по кожата при минимална травма (като триенето при допира на дрехи до тялото). Протичането на заболяването при пациентката съответства на дистрофична форма на булозна епидермолиза. При проведен имунохистохимичен анализ на кожна биопсия е установено силно намалено количество на колаген тип VII.

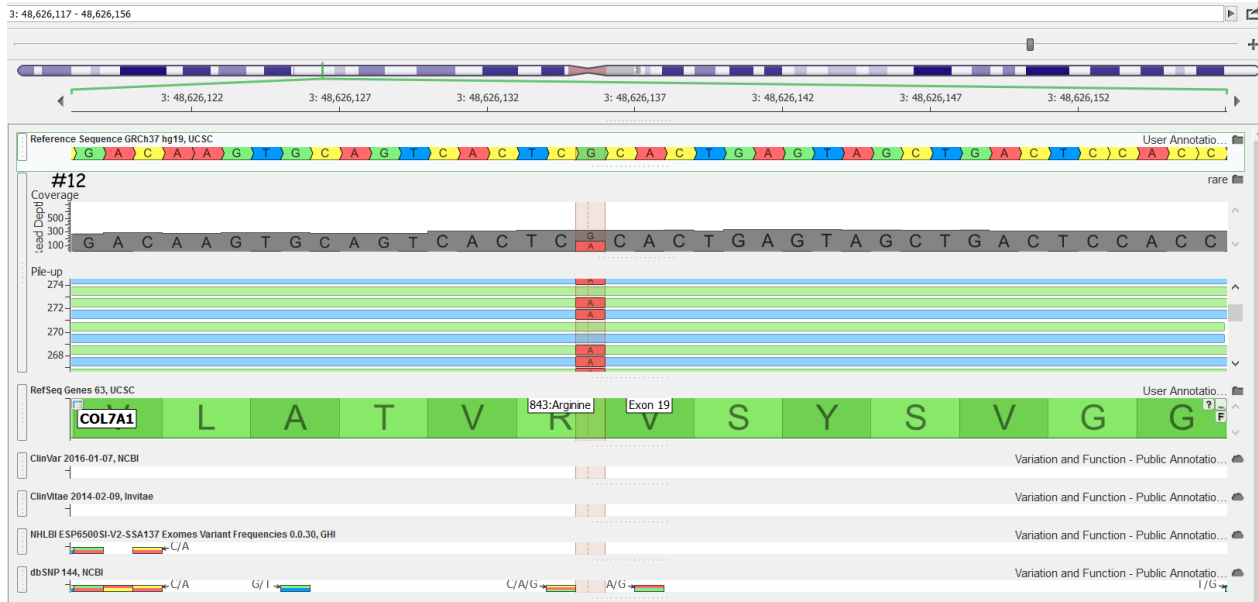
Колаген тип VII е хомотример, който е важен структурен елемент на дермоепидермалната гранична зона в кожата и осигурява свързването между дермата и епидермиса. Подобно на другите типове фибриларни колагени, има тройноспирална структура, като спиралния домен е приблизително 1,5 пъти по-дълъг от този на колаген тип I. Патологичните варианти на гена *COL7A1*, кодиращ  $\alpha 1$ -проколагеновите фибрили на колаген тип VII, се проявяват фенотипно като различни по тежест автозомно-доминантни и автозомно-

рецесивни форми на булозна епидермолиза (EBD inversa, #226600; EBD, Bart type, #132000; Epidermolysis bullosa dystrophica, AD, #131750; Epidermolysis bullosa dystrophica, AR, #226600; Epidermolysis bullosa pruriginosa #604129, Epidermolysis bullosa, pretibial, #131850).

При пациентката е установено съставно хетерозиготно носителство на два известни патологични варианта в гена *COL7A1*: p.Arg843Ter и p.Lys142Arg. Вариантът p.Lys142Arg в 3-ти екзон е един от най-често наблюдаваните и се среща при около 12% от пациентите с мутации в гена *COL7A1*. Вариантът води до аминокиселинна замяна, но се смята, че нарушава и съзряването на иРНК. Вторият вариант в екзон 19, p.Arg843Ter, представлява замяна на кодон за аминокиселина със стоп-кодон и вероятно води до NMD или до синтез на протеин със скъсена полипептидна верига. Съставно хетерозиготно носителство на същите два патологични варианта е наблюдавано при пациент с тежка форма на автозомно рецесивна дистрофична булозна епидермолиза (Kahofer P et al, 2003; Kern JS et al, 2006), което съответства на фенотипа на пациент 12. На фигури 23 и 24 са представени мутациите в 3-ти и 19-ти екзон на *COL7A1* при пациент 12. Вариантите са потвърдени със секвениране по Сангер и е установено хетерозиготно носителство при родителите на пациентката.



Фигура 23 Мутация *COL7A1*, p.Lys142Arg при пациент 12



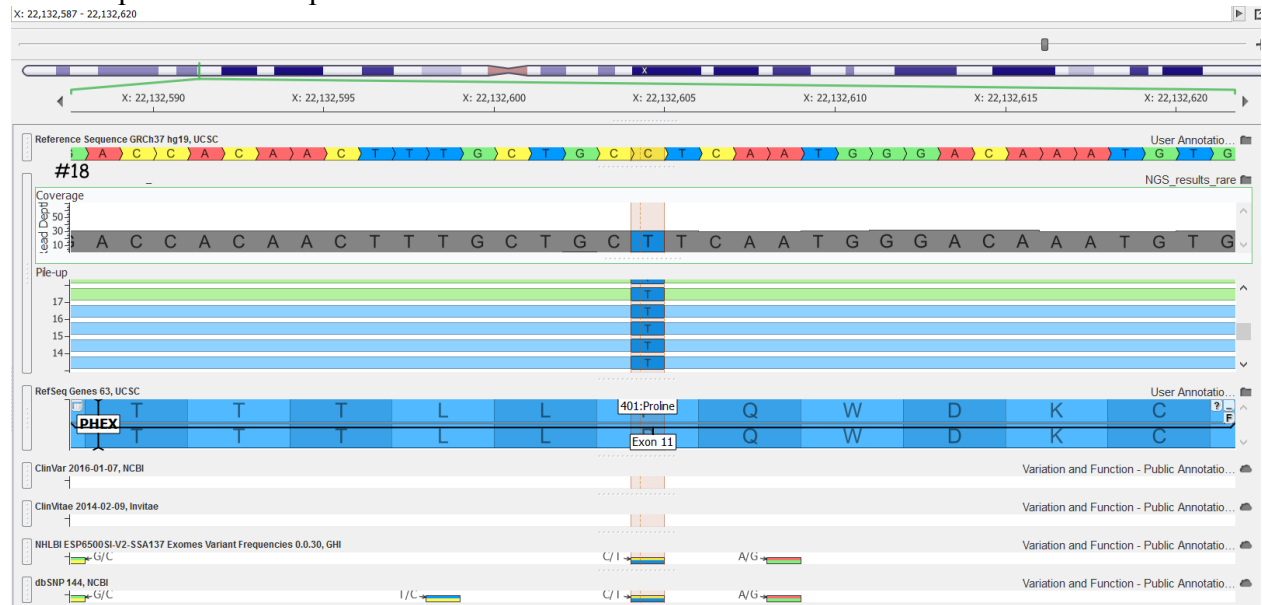
Фигура 24 Мутация *COL7A1*, p.Arg843Ter при пациент 12

#### 4.4.2. Обсъждане на установените патологични ДНК варианти при пациенти от 2-ра група

- **Вероятно патологичен вариант *PHEX* p.Pro401Leu (rs145778165)**

Вариантът е установен в хемизиготно състояние при пациент 18. Пациент № 18 е мъж на 32 години с поставена в юношеска възраст клинична диагноза Osteogenesis imperfecta. До 16 годишна възраст пациентът е имал 11 фрактури – 8 на долни крайници и 3 на горни, установена е намалена костна плътност, повишена серумна алкална фосфатаза, при еднократно изследване е регистрирано повишено ниво на паратироидния хормон в серум. След пубертета не е имал фрактури. Окончателният ръст е 158 см, има асиметрия на долните крайници, като десният крак е по-къс с 8 см, бедрата и подбедриците са скъсени, походката е с накуцване. По данни на пациента в семейството му няма други болни, няма братя и сестри, родителите не са имали фрактури, майка му е с нисък ръст. Повод за изследването беше начална бременност при съпругата му и опасенията на двамата партньори за унаследяване на заболяването в децата им. Проведеният ДНК секвенционен анализ с панела TruSight One не установи наличие на патологични мутации, асоциирани с Osteogenesis imperfecta в гените *LEPRE1* (OI, type VIII, # 610339), *CRTAP* (OI type VII, # 605497), *COL1A2* (OI, type II, type III, type IV, # 120160), *BMP1* (OI, type XIII, # 112264), *IFITM5* (OI, type V, # 614757), *SERPINH1* (OI, type X, # 600943), *SP7* (OI, type XII, # 606633), *PPIB* (OI, type IX, # 123841), *SERPINF1* (OI, type VI, # 172860), *FKBP10* (OI, type XI, # 607063) и *COL1A1* (OI, type I, type II, type III, type IV, # 120150), но показва хемизиготна мутация в гена *PHEX*: g.22132604C>T, NM\_000444.4:c.1202C>T, p.Pro401Leu. Генът *PHEX* е локализиран в X-хромозомата и кодира фосфат регулираща неутрална ендопептидаза (<http://omim.org/entry/300550>; <http://omim.org/entry/307800>). Патологичните мутации в гена се проявяват като X-свързан доминантен хипофосфатемичен рахит. Заболяването се характеризира с повишено излъчване на

фосфат в урината, намалена минерализация на костите (остеомалация, рахит), болки в ставите и костите, деформации на костите (по-изразени на долните крайници), хипофосфатемия, повишена серумна алкална фосфатаза, нормални или леко повишени стойности на паратхормон в серума, нормален серумен калций, нормални или долно гранични нива на 1,25-дихидроксивитамин D3 в серума. Болестта засяга както мъже, така и жени, но симптомите са по-изразени при мъжете. Конкретният вариант е известен, много рядък и не е съобщаван досега като патологичен. Аминокиселинната замяна е в екстрацелуларния домен на протеина. Според софтуер за предикция на ефекта може да се очаква аминокиселинната замяна да нарушава функцията на белтъка. На фигура 25 е представен участъкът от екзон 11 на гена *PHEX* при пациента. Вариантът е наблюдаван при трима индивиди изследвани по NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) – две жени (хетерозиготни носители) и един мъж (хемизигот), за които няма данни за фенотипа и не е откриван в хомозиготно състояние. По данни на The Exome Aggregation Consortium (ExAC) честотата на минорния алел е 0.00004559 и сред изследваните индивиди не са установени хемизиготи. Изследване на излъчването на фосфати в урината при пациент №18 показва стойности двукратно надвишаващи нормалните (81 mmol, при горна граница на нормата до 42 mmol за 24 часа), което е типична находка при пациентите с хипофосфатемичен витамин D резистентен рахит и е в подкрепа на патогенността на установения при секвенирането вариант в гена *PHEX*. Вариантът е потвърден чрез секвениране по Сангер.



**Фигура 25** Вариант *PHEX*: p.Pro401Leu, rs145778165 при пациент 18

- **Патологични варианти *FANCA* p.Ser1088Phe и p.Ser858Arg**

Вариантите са установени при пациент №20 в хетерозиготно състояние. Семейството беше насочено за консултация и генетично изследване по повод предполагаема диагноза Туберозна склероза при 3-годишната им дъщеря (пациент 20).

Детето е родено от 1-ва нормално протекла бременност. Родителите са млади, здрави, не съобщават за фамилна обремененост с генетични заболявания или вродени аномалии.

Детето е родено на термин по нормален механизъм и е с правилно ранно физическо и интелектуално развитие. На възраст 3 години момичето получава фебрилен гърч и е хоспитализирано в детска неврологична клиника. При физикалния преглед е установено наличие на множество (>30) хиперпигментни окръглени петна с диаметър около 1 см пръснати по торса и крайниците и едно хипопигментно петно с неправилна форма с диаметър около 1 см под дясната мамила. При проведените образни изследвания (рентгенография на глава и УЗИ на коремни органи) не са установени отклонения. Детето е с грацилен хабитус като теглото и ръстът са в норма за възрастта. Съчетанието на епилепсия и наличие на хипер / хипопигментни петна е често срещано при пациенти с Туберозна склероза, както и при други факоматози и дава основание за провеждане на изследвания в тази насока. Бащата на детето също има хиперпигментно петно с неправилна форма и размери 3x4 см на едното бедро.

При детето беше проведен ДНК таргетен секвенционен анализ на панел включващ 94 гена (TruSight Cancer, Illumina), в това число двата известни гена за Туберозна склероза (*TSC1*, *TSC2*), неврофиброматоза тип 1 (*NF1*) и тип 2 (*NF2*), ксеродерма пигментозум и Анемия на Фанкони. При анализа не бяха установени патологични мутации в гените *TSC1*, *TSC2*, *NF1*, *NF2*, но се установиха две известни мутации в гена *FANCA*, асоциирани с Анемия на Фанкони. И двата варианта са в хетерозиготно състояние и водят до замяна на аминокиселини в белтъчния продукт на гена: p.Ser858Arg в екзон 27 (Фигура 26) и p.Ser1088Phe в екзон 33 (Фигура 27).



Фигура 26 Мутация *FANCA*: p.Ser858Arg

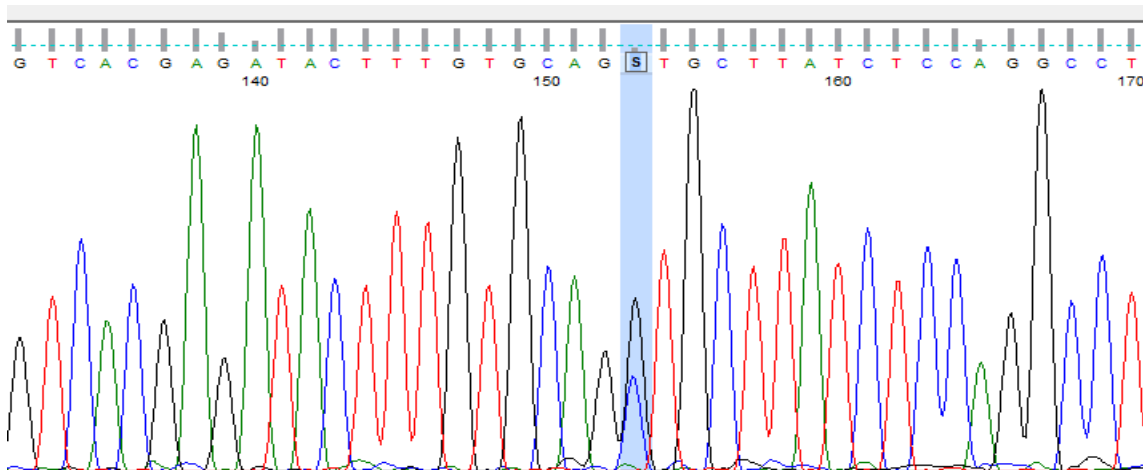


**Фигура 27.** Мутация *FANCA*: p.Ser1088Phe

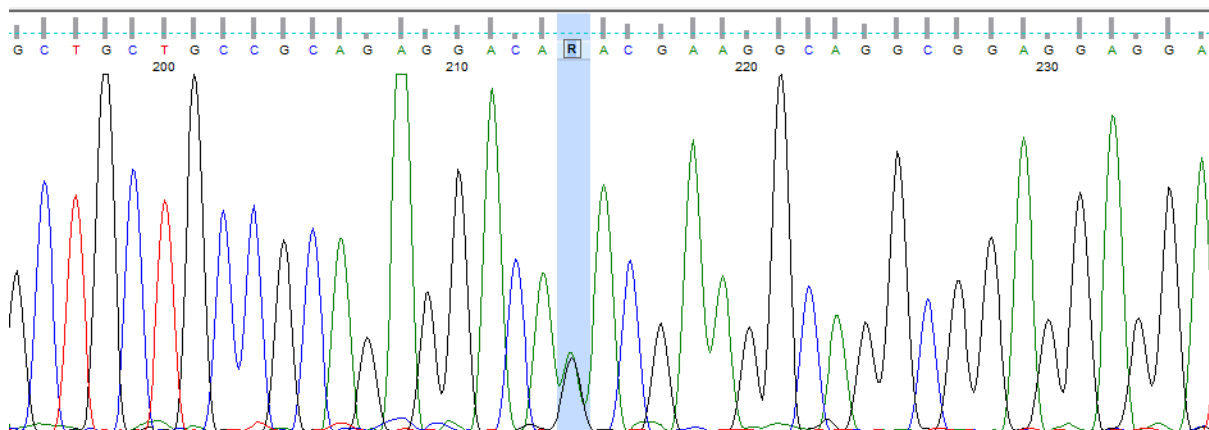
Резултатът от NG секвенционния анализ беше потвърден и чрез секвениране по Sanger.

И двата варианта се срещат с честота над 1% в някои популации, публикувани са в локус-специфичните бази данни, наблюдавани са при пациенти с Анемия на Фанкони и независимо от честотата им се смята, че са причинно свързани с болестния фенотип (Wijker M1, et al., 1999; Tamary H, et al., 2000; Rogers, CD., et al., 2004; Savino M et al, 2003). При пациентката беше проведен тест за хромозомна нестабилност, който показва повишена чувствителност към кластогени (DEB и митомицин C). Тестът се смята за специфичен и позволява пресимптоматична диагностика на заболяването.

При родителите на детето се установи хетерозиготно носителство на вариантите: p.Ser858Arg в екзон 27 при майката и p.Ser1088Phe в екзон 33 при бащата (фигура 28).

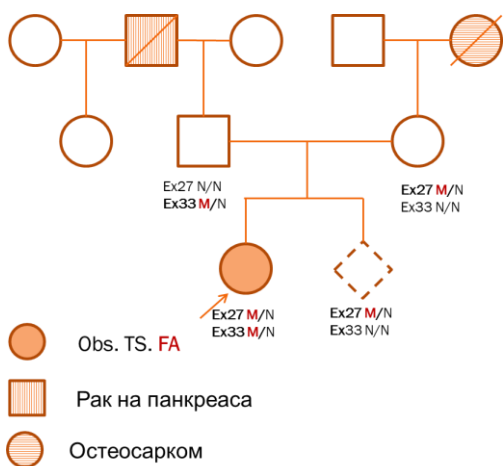


Ex27: p.Ser858Arg



Ex33: p.Ser1088Phe

**Фигура 28** Генни мутации в гена *FANCA* p.Ser858Arg в екзон 27 при майката и p.Ser1088Phe в екзон 33 при бащата, диагностицирани по Сангер



**Фигура 29** Родословие на семейството на пациент 20. Фамилно изследване за мутации в гена *FANCA*

- **Патологични варианти *HADHA* p.Glu510Gln и p.Arg291Ter**

Вариантите са установени в хетерозиготно състояние при пациент 24. Пациент 24 е момиче починало на 7 месечна възраст със съмнение за болест на Pompe. Изследване на кръвна проба на детето е показало нормална активност на  $\beta$ - галактозидаза, което отхвърля работната клинична диагноза. Детето е родено от първа нормално протекла бременност, три седмици преди термин, с ниски тегло и ръст (2000 г / 45 см). Родителите са далечни братовчеди, бащата е носител на бета-таласемия. През първите дни след раждането детето е в незадоволително общо състояние, с акроцианоза, клинично незряло, оточно, с неравномерно дишане и иктер, наложили провеждане на кислородотерапия и фототерапия. Отбелязано е наличие на две преаурикуларни висулки на дясното ухо. Изписано е девет дни след раждането, поради ниското тегло, но през този период не е наддало, тъй като е повръщало ежедневно. В къщи детето било добре, на естествено хранене, като ежедневно повръщало, понякога на фонтан. През следващите месеци е наддавало нормално на тегло и ръст, но било отбелязано забавено моторно развитие. При рутинно изследване на кръв на 5 мес. възраст са установени ниски стойности на хемоглобин – 78 g/l, и детето е хоспитализирано за диагностично уточняване. При

изследване на кръвна натривка е установена тежка микро-анизоцитоза и хипохромия, леко понижено серумно желязо ( $5\mu\text{mol/l}$ ), установен е прото-мезосистолен шум на сърцето (2/6 ст при структурно нормално сърце), ехографско изследване на коремни органи е показало нормален образ на черен дроб, далак и бъбреци. Състоянието е преценено като „апластична анемия от други външни агенти“ и е назначена терапия с малтофер. На фона на лечението детето започнало да повръща, станало отпуснато, унесено и реагирало вяло на дразнителни. При хоспитализацията е установен общо намален мускулен тонус, без данни за менингеално дразнене, дихателна честота – 48/мин, везикуларно дишане без хрипове, ритмична сърдечна дейност, СЧ – 130 удара/мин, черен дроб на 4,5 см под ребрената дъга. От лабораторните изследвания е с данни за понижен хемоглобин, умерена анизо-микроцитоза, ретикулоцитоза (28%), намален албумин, горно гранични стойности на серумното желязо, увеличен билирубин, увеличени стойности на чернодробните трансамини. Провеждано е лечение с антибиотици, метилпреднизолон, имуновенин и е отбелязано подобрене на лабораторните показатели. Два дни след дехоспитализацията, детето е хоспитализирано отново за уточняване на анемичния синдром и персистиращата от раждането мускулна хипотония. По време на престоя е констатирано влошаване на чернодробните показатели, при ехокардиография е установена ДКМП и с картина на полиорганна недостатъчност детето е починало. Ходът на заболяването и съчетанието от клинични симптоми насочват към диагноза метаболитно заболяване. При пациент №24 е проведено изследване с генен панел TruSight One и са установени два известни патологични варианта в гена *HADHA*.

Генът *HADHA* кодира алфа-субединицата на митохондриалния трифункционален протеин, който катализира последните три стъпки на митохондриалното бета-окисление на дълговерижните мастни киселини. Митохондриалният мембранно-свързан хетерокомплекс е изграден от четири алфа- и четири бета-субединици, като алфа субединиците имат 3-хидроксиацил-СоА-дехидрогеназна и еноил-СоА-хидратазна активности. Мутациите в гена *HADHA* са причина за дефицит на трифункционалния протеин или LCHAD дефицит. Гените за алфа- и бета-субединиците на митохондриалния трифункционален протеин са локализирани в съседство, като са ориентирани един срещу друг.

Вариантът p.Glu510Gln (rs137852769) представлява нуклеотидна замяна на цитозин с гуанин в позиция 26418053 на 2-ра хромозома. Промяната засяга кодиращата последователност на гена *HADHA* и води до замяна на кодон 510 (кодиращ аминокиселината глутамат) с кодон за глутамин и до промяна на полипептидната верига. Вариантът има глобална популационна честота 0.001203 и е най-честият патологичен алел наблюдаван при пациенти с LCHAD дефицит (<http://www.omim.org/entry/609016>). Вторият вариант p.Arg291Ter (rs137852775) представлява нуклеотидна замяна на гуанин с аденин в позиция 26437359 на 2-ра хромозома. Промяната води до замяна на кодон 291 (кодиращ аминокиселината аргинин) със стоп-кодон и вероятно води до NMD или до продукция на скъсен функционално неактивен протеин. Вариантът е известен и е наблюдаван при пациенти с дефицит на трифункционалния митохондриален протеин (<http://www.omim.org/entry/609015>).

Заболяването се характеризира с лактатна ацидоза, кардиомиопатия, задръжка във физическото и невро-психичното развитие, чернодробна и дихателна недостатъчност, мускулна слабост, при инфантилната форма на заболяването прогресията е бърза и води

до смърт в ранна възраст. Патологичните варианти в екзон 9 и 15 са показани на фигури 30 и 31.



Фигура 30 Мутация *HADHA* p.Arg291Ter при пациент №24.



Фигура 31 Мутация *HADHA* p.Glu510Gln при пациент №24.

При пациент 24 са установени патологични варианти в други гени, които биха могли да имат модифициращ ефект върху основния фенотип. При пациентката е установен един известен полиморфен патологичен вариант в гена *AMPD1* p.Gln45Ter (rs17602729) в хомозиготно състояние. Вариантът представлява замяна на гуанин с аденин в позиция 115236057 на 1-ва хромозома и води до замяна на кодон 45 (кодиращ глутамин) със стоп-кодон (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV000019933.28/>). Мутацията е наблюдавана при пациенти с автозомно-рецесивна форма на миопатия в резултат на дефицит на ензима миоаденилат деаминаза (<http://www.omim.org/entry/615511>). Заболяването се

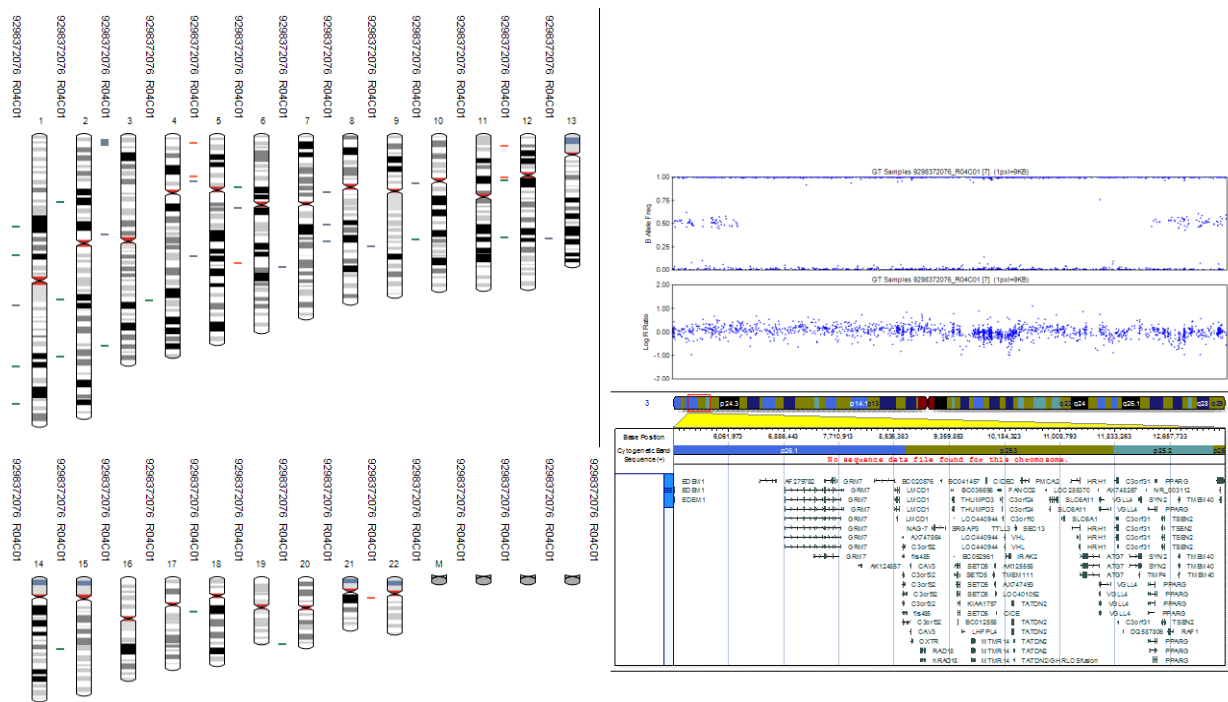
характеризира с мускулна слабост, хипотония и при някои пациенти с рабдомиолиза и повишена креатинкиназа в серума. Фенотипът е вариабилен. Заболяването се смята за относително лека форма на миопатия и някои от патологичните алели (включително вариантът установен при пациентката) са чести сред европейци (MAF = 0,130961). Честотата на варианта в Българската популация е неизвестна. Все пак е възможно хомозиготното носителство на този вариант да е утежило протичането на основното заболяване при пациентката. При пациентката също така е установено носителство в хетерозиготно състояние на известен патологичен алел на бета-глобиновия ген, асоцииран с бета-0-таласемия: *HBB* p.Gln40Ter (rs11549407), което може да обясни наблюдаваната хемолитична анемия. Вариантът представлява замяна на гуанин с аденин в позиция 5248004 на 11-та хромозома, която води до замяна на кодон 40 (кодиращ аминокиселината глутамин) със стоп-кодон. Вариантът е известен още като „beta0-39“ и е една от най-честите патологични мутации наблюдавани при пациенти с  $\beta$ -таласемия (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/15402/>, <http://www.omim.org/entry/141900>). Находката не е неочаквана, като се има предвид фамилната анамнеза за носителство на бета-таласемия при бащата. При пациентката не е установен втори патологичен или вероятно патологичен вариант в гена *HBB*.

Този случай е поучителен в няколко аспекта: а) анамнеза за наличие на кръвнородство между родителите не означава, че детето им, страдащо от рецесивно заболяване, е унаследило един и същи патологичен алел от всеки от тях; б) фенотипно здравите хора носят повече от един патологичен рецесивен алел и децата на двойки с кръвнородство между партньорите може да са в риск за повече от едно моногенно заболяване; в) фенотипът на пациента винаги е комплексен – резултат от съчетание на множество моногенно обусловени белези.

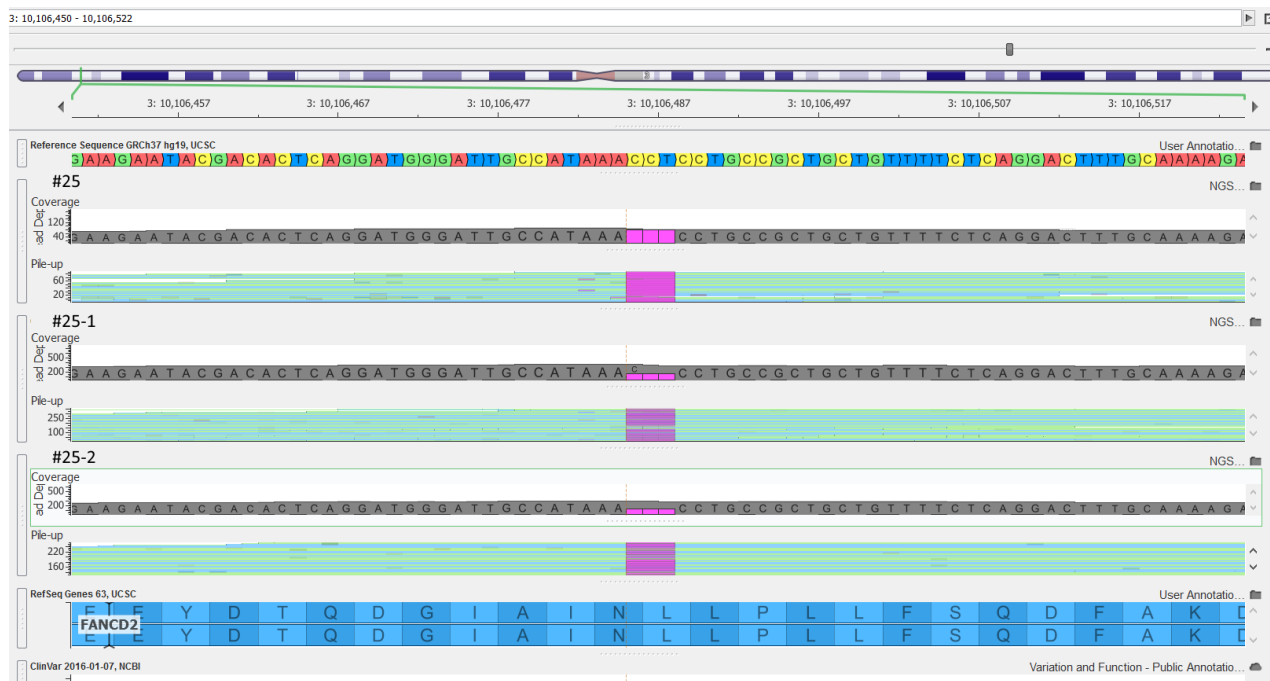
- **Патологичен вариант *FANCD2* p.Leu700del**

Вариантът е установен в хомозиготно състояние при пациент 25 (фетус с ПМС) и в хетерозиготно състояние при двамата му родители. Повод за провеждане на генетични изследвания е установяването на аномалии на плода при ултразвуков преглед (УЗИ) за оценка на фетална морфология в 24 г.сед. в хода на нормално протичаща втора бременност на семейството. При УЗИ е установена двустранна тежка хипоплазия на радиусите, валгусна деформация на китките и двустранна липса на палци на ръцете, аплазия на десния бъбрек и гранично изоставане в растежа на плода. Първата бременност на семейството е завършила с раждане на здраво момче, родителите са от български произход, млади, здрави и не съобщават за роднинска връзка помежду им (но са от едно и също малко населено място). С цел изясняване на причините за аномалиите беше проведен микрочипов SNP-аргау анализ на плода. При микрочиповия анализ не бяха установени патологични микроделеции / микродупликации в ДНК на плода, но се установи район със загуба на хетерозиготност в късото рамо на 3-та хромозома с дължина >6 Мб: arr[hg19] 3p26.1p25.3p25.2(6206901-12352468)x2hmz (фигура 32). В района са картирани общо 52 гена, от които 13 са асоциирани със заболявания, а 3 (*CIDEC*, *JAGN1* и *FANCD2*) - с автозомно-рецесивни заболявания. Един от трите гена, асоциирани с рецесивни заболявания е генът *FANCD2*. Патологичните мутации в този ген се изявяват фенотипно като заболяването анемия на Fanconi тип D2, за което е характерно съчетаването на костномозъчна недостатъчност (панцитопения) изявяваща се в детска

възраст с вродени аномалии на крайниците, уринарния тракт и сърцето и предразположение към онкологични заболявания. При установяване на хромозомни райони с голям размер, демонстриращи хомозиготност по еднонуклеотидните полиморфизми в района, както е при плода, би могло да има изява на заболяването, поради съчетаване на рецесивни патологични мутантни алели в хомозиготно състояние. За доизясняване на находката проведехме секвениране от ново поколение с панела TruSight CapSeq, който включва освен гена *FANCD2* и други 15 гени, чиито мутации асоциират с този фенотип. При секвенирането на ДНК на плода установихме нова неописвана досега хипоморфна мутация в гена *FANCD2*: g.10106488\_10106490delCCT, NM\_033084.3:c.2097\_2099delCCT, NP\_149075.2:p.Leu700del в хомозиготно състояние (фигура 35). Мутацията представлява делеция на три нуклеотида в последователността кодираща екзон 23 на гена. Делецията запазва рамката на четене, но води до загуба на левцин на 700-но място в белтъчния продукт. Същата мутация беше установена и при двамата родители в хетерозиготно състояние (фигура 33). Тази форма на анемия на Fanconi се среща при 3-6% от всички пациенти с това заболяване. Малформациите са чести при пациенти с FA-D2, и хематологичните прояви се появяват по-рано и прогресират по-бързо в сравнение с всички други пациенти с анемия на Fanconi (Kalb R et al, 2007).



**Фигура 32** На фигурата е показан „виртуалният“ кариотип на плода генериран при SNParray анализа с Human CoreExome-12 и районът със загуба на хетерозиготност в 3p25.2-p26.1.



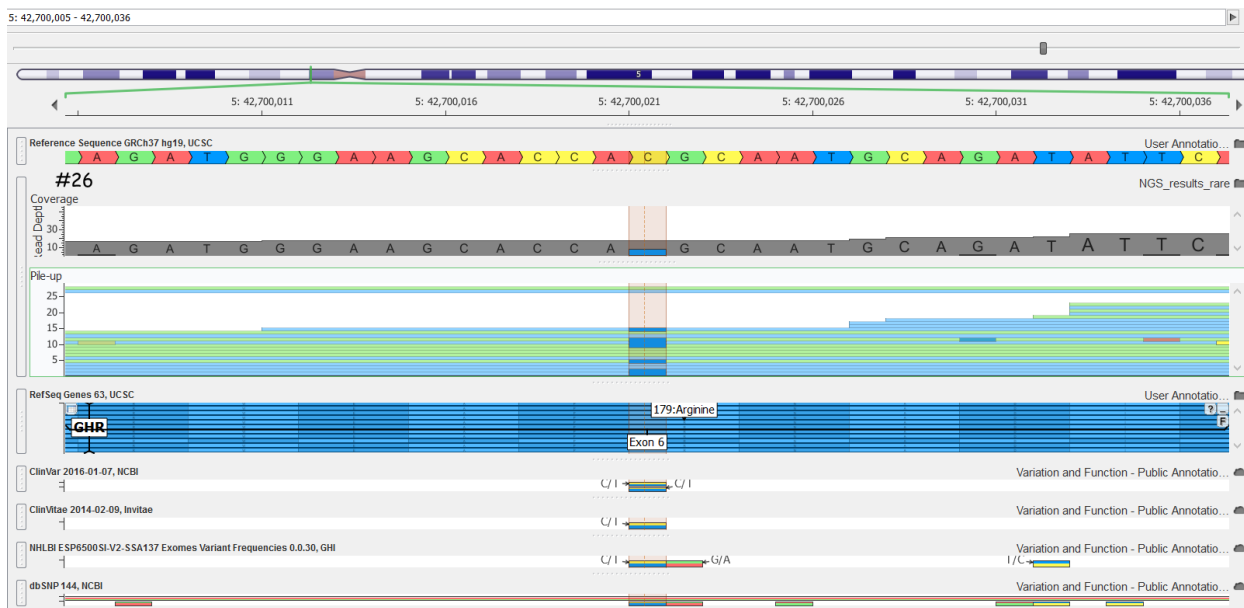
**Фигура 33.** Мутация *FANCD2*: p.Leu700del. Делетираните бази са маркирани в розово. Най-горе е ДНК последователността на плода (#25) – с хомозиготна делеция, под нея съответно на бащата (#25-1) и майката (#25-2) – с хетерозиготна делеция.

- **Патологичен вариант *GHR p.Arg179Cys (rs121909362)***

Вариантът е установен в хетерозиготно състояние при пациент 26. Пациент 26 е момче на 3 години. Детето е родено от трета патологична бременност (майка със саркоидоза; с данни за интраутеринна ретардация на плода от V m.l. и олигохидрамнион), чрез цезарово сечение в 37 г. сед. с ниски ръст и тегло при раждането (1700 г / 38 см). Отглеждано е в кувьоз през първите 2,5 месеца след раждането. Задръжката във физическото развитие не била преодоляна в следващите години и теглото и ръстът са <3 перцентил за възрастта. Установени са дисморфични белези: изпъкнали фронтални тубери, дребно лице, хипотелоризъм, ниско разположени ушни миди, страбизъм, двустранна колобома на ириса (ангажира външен долен квадрант), страбизъм, грацилен хабитус, плоскостъпие, клинодактилия на 5-ти пръст на ръцете. При ехокардиография е установено структурно нормално сърце с лекостепенна хипертрофия на ендокарда на двете камери. МРТ на ЦНС на 3 г. е показала лекостепенна перивентрикуларна левкомалация, умерена необструктивна комуницираща вътрешна хидроцефалия, лека атрофия и елевация на церебеларния вермис. Ехографско изследване на коремните органи е показало нормален резултат. При един от болничните престои е регистриран намален отговор към растежен хормон по време на сън. Детето е с изоставане в невропсихичното развитие – КОР=35. Проведените генетични изследвания на кариотип, aCGH (4x44K, Agilent), метилиране на 11p15 (H19DMR) и 7q32 (MEST) са показали нормални резултати.

При пациент 26 е проведен ДНК анализ чрез секвениране с панела TruSight One. Установен е един известен патологичен вариант в гена, кодиращ рецептора за растежен

хормон в хетерозиготно състояние (*GHR* p.Arg179Cys, фигура 34). Вариантът представлява хетерозиготна нуклеотидна замяна на цитозин с тимин в позиция 42700021 на 5-та хромозома, която води до замяна на аминокиселина в полипептидната верига на рецептора: аргининът на позиция 179 се заменя с цистеин. Вариантът е известен и е наблюдаван при пациенти с нечувствителност към растежен хормон (Goddard A et al, 1995). Патологичните варинати в гена *GHR* са причина за доминантни и рецесивни форми на задръжка в растежа (автозомно- доминантна форма Growth hormone insensitivity, partial OMIM#604271, автозомно-рецесивна форма Laron dwarfism OMIM#262500). При пациента не е установен втори патологичен или вероятно патологичен вариант в гена. Установеният вариант може да обясни задръжката в растежа, но няма отношение към очното заболяване и останалите фенотипни прояви. Независимо от установяването на вариант, който може да се свърже с фенотипа, етиологията не е изяснена напълно.



Фигура 34 Мутация *GHR* p.Arg179Cys, rs121909362 при пациент 26.

- **Патологичен вариант *CLCN1* c.1436\_1449delTACCCTGCGGAGGC (p.Pro480HisfsTer24)**

Вариантът е установен при пациент 27 в хетерозиготно състояние. Пациент 27 е момиче на 3 години родено от втора бременност. Първото дете на семейството е момче с вродена миотония. Пациентката е с диагноза: Grand mal припадъци (с малки припадъци (petit mal) или без тях), неуточнени; и придружаващо заболяване: Специфични разстройства в развитието на двигателната функция. Детето е родено на термин по нормален механизъм с тегло 4000 г, изплакала веднага. До 6 месечна възраст е държала ръцете свити в юмруци. На 6 месечна възраст по време на сън при фебрилитет 38°C получила пристъп с треперене на десни крайници и клепач на дясното око, който продължил 25-30 минути. Детето било хоспитализирано и била назначена антиконвулсивна терапия. Направена КТ на главен мозък показала нормален образ на ЦНС. Проведено ЕЕГ – „пароксизмална абнормност от бавни комплекси с променлива амплитуда“. В следващите месеци периодично получавала

пристъпи с широко отваряне на очите, задръжка на дишането, изпъване на тялото и крайниците, стягане на челюстта и посиняване на устните за около 30 секунди, имала периоди от по няколко дни без пристъпи, както и множество пристъпи в един ден (до 12). При фебрилитет били регистрирани тонични пристъпи с продължителност 20-30 минути, подобни на първия описан. Отчетено е изоставане в невропсихичното развитие – на 6 месеца: не се обръщала от гръб на корем, не е постигнат седеж, не хваща и не посяга към играчки, няма емоционален контакт с близките си, на 11 месеца – не е отчетен прогрес в психо-моторното развитие, на 3 г. – не са овладени тазови резервоари, не говори. При последващо ЕЕГ (на 1 г) са установени епилептични модифицирани сънни елементи с максимум темпоро-фронтално двустранно. При проведена МРТ е установена изолирана хемимегаленцефалия в ляво окципитално. Поради задръжката в НПР и наличие на аутистични елементи в поведението е изказано съмнение за синдром на Rett. ДНК анализ за търсене на мутации в *MECP2* гена, както и изследване за с-м на Angelman са дали негативен резултат.

Изследваната с панела TruSight One при пациентката установи един известен патологичен вариант в гена *CLCN1*: p.Pro480HisfsTer24 в хетерозиготно състояние. Генът *CLCN1* кодира каналчетата за хлоридни йони, които регулират възбудимостта на мускулните влакна (<http://www.omim.org/entry/255700>). Патологичните варианти в гена са асоциирани с автозомно-рецесивна и автозомно-доминантна форма на вродена миотония (*Myotonia congenita, dominant, OMIM#160800*; *Myotonia congenita, recessive, OMIM#255700*). Вариантът представлява делеция на 14 бази в последователността, кодираща 13-ти екзон на гена, което води до изместване на рамката на четене, формиране на стоп-кодон в новата рамка и води до NMD или синтез на протеин със скъсена полипептидна верига. Конкретно този вариант се свързва с автозомно-рецесивната форма на заболяването и с по-тежък клиничен фенотип (Becker PE, 1977; Dupre N et al., 2009). Като се има предвид ранното начало и тежестта на симптомите, при пациентката вероятно се касае за рецесивната форма на заболяването. При проведения ДНК анализ чрез NG секвениране не е установен втори известен патологичен или вероятно патологичен вариант в екзоните и екзон-интронните граници на гена *CLCN1*. При изследване на пациенти с рецесивна вродена миотония е установен само един мутантен алел Raja Rayan et al. (2012) установяват екзонни делеции / дупликации при 6,7% от изследваните. При пациентката не е извършен анализ за установяване на екзонни делеции / дупликации в гена *CLCN1*. Наскоро е установено, че *CLCN1* се експресира и в ЦНС и е изказана хипотеза, че носителството на патологични варианти в *CLCN1* гена може да се изяви фенотипно като епилепсия рефрактерна на терапия (Chen TT et al, 2013). На фигура 35 е представен участъкът от екзон 13 на гена *CLCN1* при пациентката. Вариантът е потвърден със секвениране по Сангер и е установен в хетерозиготно състояние при бащата и при братя на пациентката. Братът на пациентката е диагностициран с вродена миотония, но е с нормално невропсихично развитие. Бащата на пациентката е имал „фебрилни гърчове“ като дете, но също е с нормален интелект и не са установени отклонения в неврологичния статус. И при двамата е налице хипертрофия на мускулите на подбедриците. Патологичният вариант в гена *CLCN1* само частично обяснява фенотипните прояви при пациент 27 и допускаме, че носителство на варианти в други гени вероятно оказва модифициращ ефект върху фенотипа.



**Фигура 35** Мутация *CLCN1* с.1436\_1449delTACCCTGCGGAGGC при пациент 27

- **Патологичен вариант *SCN8A* p.Arg1872Gln**

Вариантът е установен в хетерозиготно състояние при пациент 30. Пациент 30 е момиче на 7 г. родено от първа нормално протекла бременност, без фамилна обремененост за неврологични заболявания. Детето е с диагноза Криптогенна епилепсия: левостранни фронтоцентротемпорални псевдоабсанси с вторично генерализирани тонично-клонични пароксизми и първично генерализирани тонично-клонични пароксизми. При пациентката са налице умерена задръжка в психо-моторното развитие (говор – единични думи) и някои дисморфични белези (рядко разположени зъби на долната челюст, ретрогнатия с неправилна захапка, хипертрофични гингиви, хипопигментно петно с неправилна форма 1x3 см на десния глезен и хиперпигментно петно 3x3 см на дясна китка), не може да тича, изкачва стълби, като се държи за перилата. Проведените генетични изследвания за с-м на Angelman и за мутации в *SCN1A* гена са показали нормални резултати. Отбелязано е влошаване на находката в ЕЕГ, въпреки стриктно провежданата терапия.

При пациент 30 е установен един известен патологичен вариант, който може да се свърже с наблюдавания клиничен фенотип. Вариантът представлява хетерозиготна нуклеотидна замяна на гуанин с аденин в позиция 52200885 на 12-та хромозома. Промяната засяга кодиращата последователност на гена *SCN8A* и води до замяна на гуанин с аденин в позиция 5615 (на ниво иРНК) и до продукция на протеин с аминокиселинна замяна (аргинин на позиция 1872 е заменен с глутамин). Генът *SCN8A* кодира  $\alpha$ -субединицата (Nav1.6) на волтаж-зависимите натриеви канали във възбудните неврони на централна и периферна нервна система (<http://www.omim.org/entry/600702>). Мутацията засяга С-терминалния вътреклетъчен домен на протеина, който участва във взаимодействия с други протеини, като калмодулин, G-протеини,  $\beta$ -субединицата и някои антиепилептични лекарства (фенитоин). Вариантът е известен и е наблюдаван при пациент с ранна епилептична енцефалопатия и задръжка в невропсихичното развитие (Ohba C et al, 2014). Патологичните варианти на гена *SCN8A* в хетерозиготно състояние се проявяват фенотипно като автозомно доминантна форма на ранна епилептична енцефалопатия (EIEE13, <http://www.omim.org/entry/614558>). При описаните досега пациенти мутациите в

гена *SCN8A* са възникнали *de novo*. Вариантът е потвърден чрез секвениране по Сангер при пациентката и не е установен при никой от родителите, което съответства на негативната фамилна анамнеза при пациентката и потвърждава доминантния характер на мутацията. Заболяването се характеризира с епилептични гърчове от различен тип (абсансни, фебрилни, генерализирани тонично-клонични), които трудно се поддават на медикаментозен контрол, началото на заболяването е в ранна възраст, при някои от пациентите е наблюдавана церебрална и церебеларна атрофия, задръжка в невропсихичното развитие с последващ тежък интелектуален дефицит. На фигура 36 е представен участъкът от екзон 27 на гена *SCN8A* при пациентката.



**Фигура 36** Мутация *SCN8A* p.Arg1872Gln при пациент 30.

- **Патологичен вариант *RPS6KA3* p.Arg305Ter**

Вариантът е установен в хемизиготно състояние при пациент 32. Пациент 32 е момче на 5 г. родено от първа патологично протекла бременност (с кървене в първи триместър), с нормални ръст и тегло при раждането (3010 г / 50 см). Родителите са млади, здрави, от български етнически произход. Неонаталният период е протекъл без усложнения. Когато било на два месеца родителите забелязали, че не задържа главичка и е отпуснат. Хоспитализиран е неколkokратно в клиниката по генетика на СБАЛДБ. Установени са дисморфични стигми: хипертелоризъм, епикант, депресия в основата на носа, дебела долна устна, малка брадичка, дълъг изгладен филтрум, *rectus excavatum*, къси пръсти с изтънени дистални фаланги. При проведените изследвания е установено: ТФЕ – лека дилатация на предните рога на латералните вентрикули, неразширени външни ликворни пространства; ехокардиография – дисфункция на митралната клапа с промени в поддържащия апарат с лекостепенна митрална стеноза и митрална инсуфициенция; лабораторни изследвания – преходна хиперкалциемия и калциурия през първата година. При проведена МРТ е установена лекостепенна хидроцефалия от оклузивен тип (коригирана оперативно), непълна стеноза на мозъчния акведукт и хипоплазия на *Corpus callosum*. При детето е налице лекостепенна задръжка в невро-психичното развитие

(IQ=69). Съчетанието от дисморфични белези, хиперкалциемията и изоставането в НПП насочили към вероятна диагноза синдром на Williams-Beuren. При около 96% от пациентите с типичен фенотип на синдром на Williams-Beuren установяването на микроделеция в 7q11.23 може да потвърди диагнозата (Lowery MC et al, 1995). При пациент 32 изследване чрез MLPA за установяване на делеции / дупликации във WBS локуса е показало нормален брой копия.

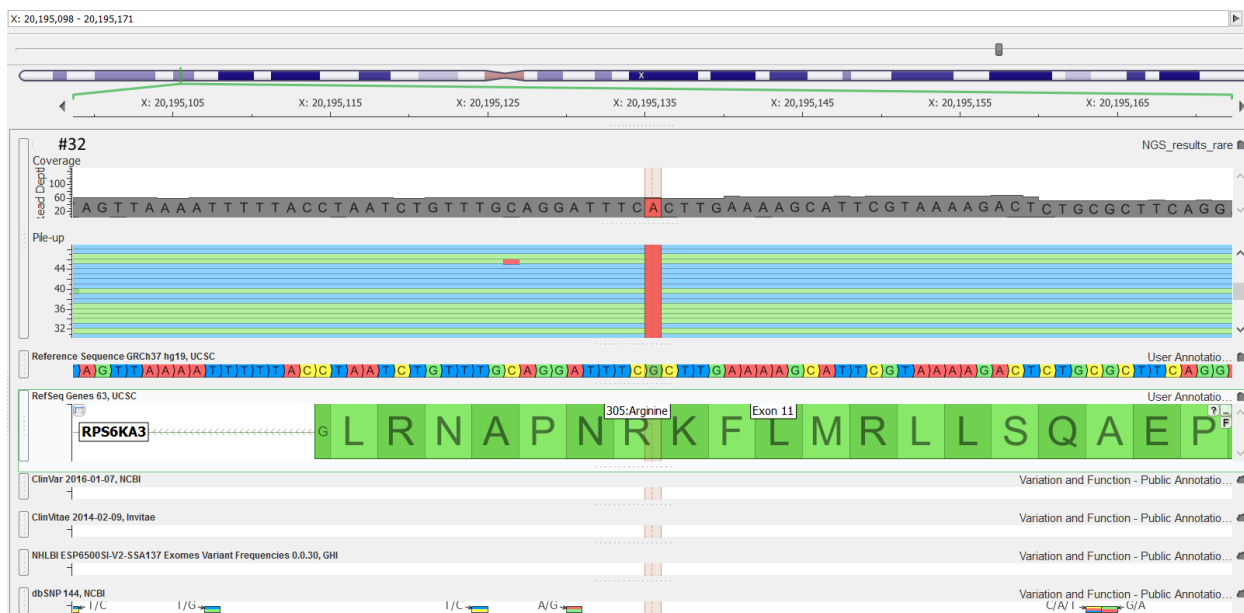
Изследването чрез секвениране с панела TruSight One установи хемизиготна мутация в *RPS6KA3* гена, която може да се свърже с наблюдавания фенотип. Вариантът представлява нуклеотидна замяна на гуанин с аденин в позиция 20195135 на X-хромозомата (фигура 38). Промяната засяга кодиращата последователност на гена *RPS6KA3* и води до замяна на кодон 305 (кодиращ аминокиселината аргинин) със стоп-кодон на ниво мРНК и до NMD или до продукция на скъсен функционално неактивен протеин.

Генът *RPS6KA3* кодира един от членовете на RSK (рибозомна S6 киназа) семейството на регулираните от растежни фактори серин / треонин кинази, известни също като p90(rsk). RSK протеините съдържат 2 функционални киназа каталитични домени: N-терминален киназен домен подобен на киназите от AGC семейството и C-терминален киназен домен подобен на CaMK киназното семейство. Двата киназни домена са свързани със 100-аминокиселинна линкерна област, съдържаща PDK (PDPK1) докинг сайт. В отговор на растежни стимули (растежни фактори, хормони и невротрансмитери) MAPK протеините (например, ERK1) директно фосфорилират RSK, които впоследствие фосфорилират много други субстрати. Смята се, че RSK протеините имат важна роля за прогресията на клетъчния цикъл, клетъчната преживяемост и диференциация (Marques Pereira P et al, 2010).

Вариантът установен при пациент 32 не е документиран досега в медицинската литература и базите данни за патологични варианти. Патологичните варианти в гена *RPS6KA3*, в резултат на нон-сенс мутации (както е при пациента) и мутации с изместване на рамката на четене се проявяват фенотипно като X-свързана доминантна форма на синдром на Coffin-Lowry (<http://www.omim.org/entry/303600>). Заболяването най-често е резултат от de novo възникнали мутации и повечето случаи са спорадични. Синдромът на Coffin-Lowry се характеризира с лицев дисморфизъм (груби черти на лицето, изразени надочни дъги, хипертелоризъм, антимонголоидно разположени очни цепки, дебели устни, проминиращи чело и брадичка, едър нос, едри медиални резци, високо небце), задръжка в невропсихичното развитие, нисък ръст, изоставане в костната възраст, дилатация на мозъчните вентрикули, забавено затваряне на голямата фонтанела, недостатъчност на митралната клапа на сърцето, мускулна хипотония и засягане на костно-ставния апарат (сколиоза / кифоза, Coxa valga, плоскостъпие). На фигура 37 е предствен фенотипът на пациент 32. Вариантът е потвърден чрез секвениране по Сангер при пациента и не е установен при неговата майка.



**Фигура 37** Фенотип на пациент №32: груби черти на лицето, широко проминиращо чело, хипертелоризъм, антимонголоидни очни цепки, филтрум с изгладен релеф, пълни устни, проминираща брадичка.



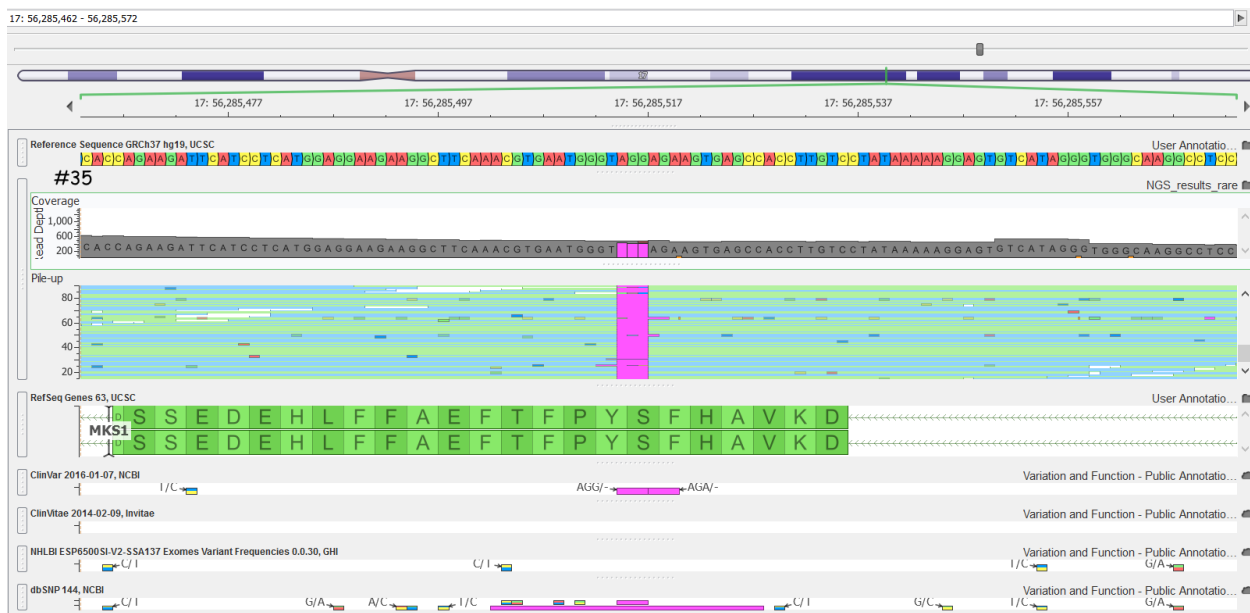
**Фигура 38** Мутация *RPS6KA3*: p.Arg305Ter при пациент 32.

- **Патологичен вариант *MKS1* p.Ser372del**

Вариантът е установен при пациент 35 в хомозиготно състояние. Пациент 35 е момче на 6 години с полималформативен синдром и задръжка в невро-психичното развитие. Детето е родено от втора нормално протекла бременност, като при раждането е установено увеличено количество околоплодна течност. Поради наличие на дисморфични белези и хипербилирубинемия детето е било хоспитализирано. Дисморфичните белези включват: проминиращо чело, широка основа на носа, депресия на основата на носа, антевертирани ноздри, дълъг филтрум, хипертелоризъм, коси асиметрични очни цепки,страбизъм, сарит quadratum, къса шия, високо небце, рядко разположени зъби на долната зъбна редица, пектус екскаватум, къси крайници, с брахидактилия и дистално изтънени фаланги, външните полови органи са от мъжки тип, с микропенис и двустранно асансьорни

тестиси. При детето е установен вроден сърдечен порок – непълен АВСД, който е коригиран оперативно на 4 годишна възраст. Изостава във физическото и невропсихичното си развитие, КoP<50. Проходил на 2 годишна възраст с чужда помощ, на 6 години – ходи самостоятелно, но походката е нестабилна. Речта е ограничена до думите „мама“ и „баба“, няма контрол на тазовите резервоари. От ЯМР на ЦНС е установена вентрикуломегалия, ангажираща латералните, трети и в най-голяма степен четвърти мозъчни вентрикули, хипоплазия на вермиса с агенезия на каудалните му дялове и с широка комуникация между 4-ти мозъчен вентрикул и ретроцеребеларната цистерна, ретроцеребеларната, препонтинната и премедуларната цистерни са дилатирани, проминентна загуба на сигнал в дорзалната част на 3-ти мозъчен вентрикул и по хода на Силвиевия акведукт, двете церебеларни хемисфери са ротирани напред и медиално, като фолиите са апонирани брахиа понтис, понса и медулата са с редуциран напречник, арахноидните пространства по конвекситета бифронтално са дилатирани, плитка лява костна орбита, дясната вена на Розентал и вена Галени са дилатирани. Находката е интерпретирана като вариант на Dandy-Walker аномалия. Проведените при детето лабораторни изследвания за вродени инфекции, метаболитен скрининг, кариотип и aCGH (1x1M) са показали нормални резултати. ДНК секвенционният анализ с панела TruSight Inherited diseases, Illumina установи нова неописвана досега хомозиготна мутация в гена *MKS1*: c.1115\_1117delCCT, p.Ser372del. *MKS1* (Meckel syndrome 1) е един от трите, принадлежащи към семейството на съдържащите B9 домен протеини. Към същото семейство се отнасят още B9D1 (B9 domain-containing protein 1) и B9D2 (B9 domain-containing protein 2). Всичките три, съдържащи B9 домен протеини, участват в цилиогенезата и формирането на реснички в клетките на бозайниците (Bialas et al, 2009). Мутацията, установена при пациент 35, е делеция на три нуклеотидни двойки със запазване на рамката на четене, водеща до загуба на серин на 372-ра позиция в белтъчния продукт. Продуктът на *MKS1* гена е протеин съставен от 559 аминокиселини, като аминокиселините от 311 до 439 образуват консервативния B9 домен. Загубата на серин на 372-ро място вероятно е патологична и може да се очаква да наруши функцията на протеина. При пациент с фенотип на Bardet-Biedl syndrome 13 Leitch et al. (2008) са описали хипоморфни мутации в гена *MKS1*, една от които е делеция на фенилаланин на 371 позиция със запазване на рамката на четене. Мутация, като наблюдаваната при нашия пациент – p.Ser372del, но соматична, е установявана в туморна клетъчна линия от мантелно клетъчен лимфом (Silvia Veà et al, 2013). Герминативни патологични мутации на гена *MKS1* са описвани при пациенти с фенотип на поне 3 различни моногенни рецесивни заболявания: синдром на Meckel тип 1, синдром на Bardet-Biedl тип 13 и синдром на Joubert (Marta Romani et al, 2014). Морфологичните промени в ЦНС и съпътстващите неврологични симптоми, както и някои от дисморфичните белези, наблюдавани при пациент 35, наподобяват тези, откривани при пациенти със синдром на Joubert, докато хипогенитализмът по-често се открива при пациенти със синдром на Bardet-Biedl. Находката при пациент №35 е още едно потвърждение за голямото разнообразие на клиничния фенотип при мутации в гените свързани с цилиогенезата.

На фигурата 39 е представен екзон 13 на гена *MKS1* при пациент 35. Делетираните нуклеотиди са маркирани.



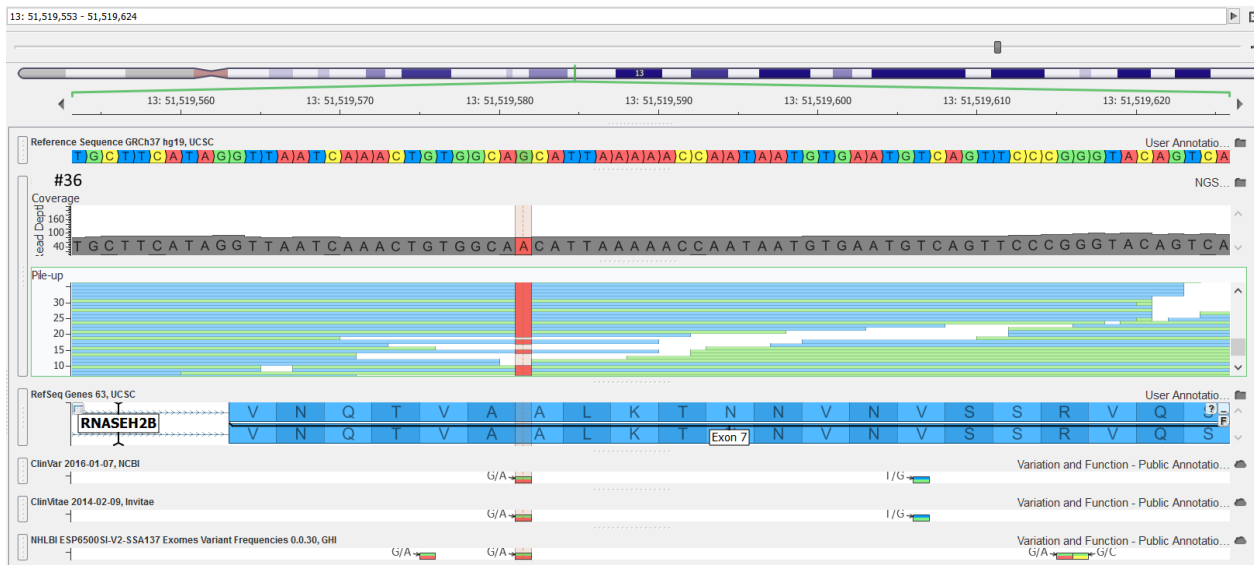
**Фигура 39** Мутация *MKS1* p.Ser372del при пациент №35.

Седем от пациентите от 2-ра група са от ромски етнически произход и са с диагноза спастична квадриплегия, която при четирима (пациенти 39, 40, 41, 42) е съпроводена и от епилепсия. През 2014 г. голям колектив от български и австралийски учени публикува резултати от изследване сред български роми, касаещо етиологията на вродената лактатна ацидоза при пациенти от този етнос, като в 50% от случаите е установена една и съща нонсенс мутация (*PDHX* p.Arg 446\*) в хомозиготно състояние (Ivanov IS et al, 2014). При пациентите с този дефект е намерено характерно съчетание на неврологични симптоми – спастична квадриплегия и епилепсия. Седемте пациенти са били изследвани в НГЛ чрез ДНК секвениране за пируват дехидрогеназен дефицит, свързан с мутации в *PDHX* гена, но не е била установена най-често срещаната сред ромите мутация p.R446X в гена *PDHX*.

Проведеният от нас анализ на пациентите е извършен чрез таргетно екзонно секвениране от ново поколение с TruSight Inherited Disease панел на 552 гена, асоциирани с тежки рецесивни заболявания.

- **Патологичен вариант *RNASEH2B* p.Ala177Thr**

Вариантът е установен при пациент 36 във хомозиготно състояние. Този вариант се характеризира със замяна на гуанин (G) с аденин (A) в позиция 51519581 на 13-та хромозома, което води до замяна на аланин (Ala) с треонин (Thr) в позиция 177 на белтъчния продукт на гена. На фигура 40 е представен екзон 7 на гена *RNASEH2B*. Замененият нуклеотид е маркиран.



**Фигура 40** Мутация в гена *RNASEH2B*: p.Ala177Thr при пациент 36

Генът *RNASEH2B* кодира бета субединицата на човешкия ензим рибонуклеаза H2 комплекс, който медира отделянето на рибонуклеотиди от РНК:ДНК дуплекси. Протеинът съдържа 308-амино киселини и се експресира във всички тъкани (Crow et al., 2006). Вариантът е известен и е най-често наблюдаваната мутация при пациенти със синдром на Aicardi-Goutieres тип 2 (<http://omim.org/entry/610326>; <http://omim.org/entry/610181>). Според литературни данни (Crow, Y. J., et al., 2006), в засегнатите членове на 7 семейства със синдром на Aicardi-Goutieres 2, е установена хомозиготна замяна на гуанин с аденин (с.529G>A) в екзон 7 на гена *RNASEH2B*, в резултат на което аланинът на 177-ма позиция е заменен с треонин. Семействата са с различен етнически произход (алжирски, марокански, ирландски, италиански, френско-канадски, и немски). В седем други семейства е установено съчетано хетерозиготно носителство на A177T мутацията с друга патогенна мутация в гена *RNASEH2B*. От общо 36-мутантни алели, 20 (55%) са A177T, доказани в 18 семейства с Aicardi-Goutieres синдром.

При пациент 36 началото на симптомите е от 8-9 месечна възраст, когато станал по-вял, настъпил регрес в моторните умения и спрял да пълзи. Клиничните симптоми включват: квадрипирамиден синдром: парези и парализи - движи четирите крайника, липсва контрол на главата, не може да седи самостоятелно, не може да ходи самостоятелно при запазена опора в долни крайници; мускулният тонус е спастично повишен, по-изразен за долни крайници; СНР - двустранно оживени с анизорефлексия Д>Л; спонтанен патологичен рефлекс на Бабински - положителен двустранно, положителен рефлекс на Росолимо двустранно; клонуси на ходилата двустранно; без епилептични пристъпи и нормално ЕЕГ. МРТ на главен мозък е с данни за дифузни, относително дискретни промени в интензитета на бялото мозъчно вещество супра- и субтенториално в зоните на понса и нуклеа дентати, съмнение за дисмиелинизация. До момента на геномния анализ с NGS технология, етиологията на спастичната квадрипареза остава неясна. Секвенирането от ново поколение изяснява генетичната причина за наблюдаваната клиника и променя клиничната диагноза в синдром на Aicardi Goutieres.

Може да се заключи, че клиничната презентация със спастична квадрипареза, по-изразена в долните крайници е характерна фенотипна изява при пациенти с мутацията A177T на гена *RNASEH2B* (Crow, Y. J., et al., 2006).

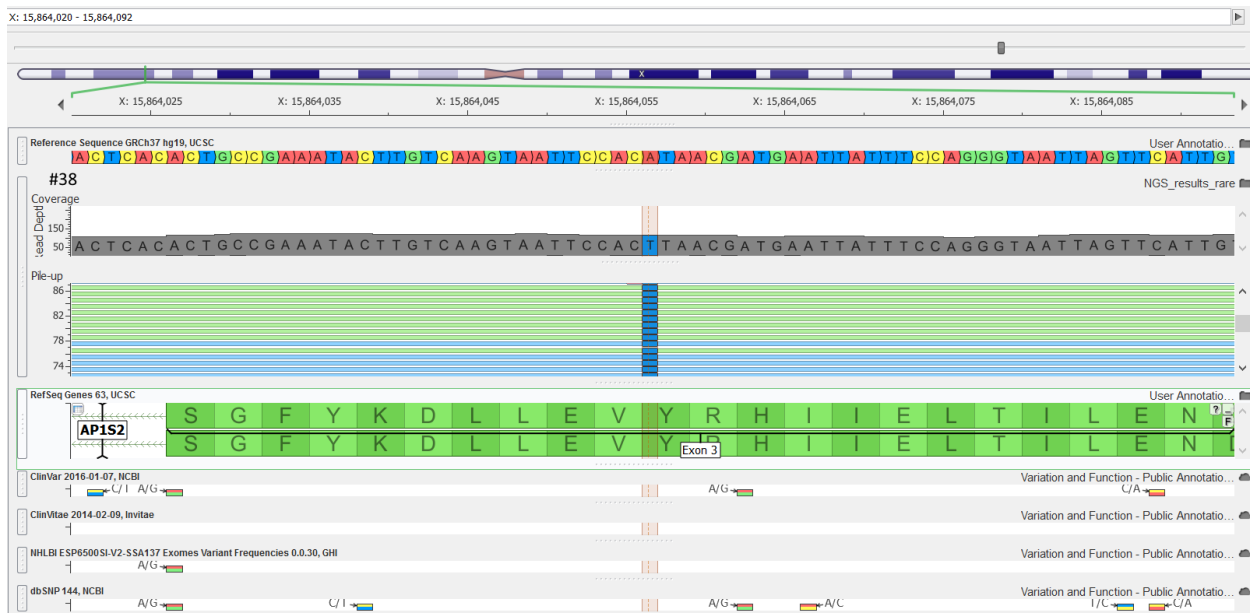
- **Патологичен вариант *APIS2* p.Tyr86Ter**

Вариантът е установен при пациент 38 в хемизиготно състояние. Генът *APIS2* кодира сигма-2-субединицата на хетеротетрамерен адапторен протеин-1 комплекс (AP1 - Adaptor-related protein complex 1, sigma-2 subunit). AP1 се намира в цитозолната страна на покритите везикули в апарата на Golgi. AP1 комплексът опосредства асемблирането на клатрин и разпознаването на сигнали от трансмембранните рецептори за сортиране (Cacciagli et al., 2014). Мутации в гена *APIS2* са наблюдавани при пациенти със синдромно X-свързано рецесивно изоставане в умственото развитие (Mental retardation, X-linked syndromic 5). Проявите на заболяването включват мускулна хипотония в детска възраст, забавено двигателно развитие, затруднена походка в зряла възраст, дискретен лицев дисморфизъм и при някои пациенти хидроцефалия (<http://omim.org/entry/300630>; Saillour, Y., et al., 2007.; Tarpey, P. S., et al., 2006.; Turner, G., et al., 2003).

При пациент №38 началото на заболяването датира от първите месеци след раждането. Клиничните симптоми включват тежко изоставане в нервно-психическото развитие и спастична квадрипареза, като на възраст 27 години самостоятелната походка е невъзможна. Пациентът има здрави родители, един здрав брат и един брат с подобни на неговите клинични симптоми, но изразени в по-слаба степен. Фамилните данни съответстват на X-свързано рецесивно унаследяване.

Идентифицираната мутация в *APIS2* представлява замяна на аденин с тимидин в позиция 15864056 на X-хромозомата, която води до промяна на кодон 86 (кодиращ аминокиселината тирозин) в стоп-кодон (фигура 41). Мутацията не е описвана досега. Вариантът е класифициран като патогенен, тъй като се вписва в мутационния спектър на патологичните варианти установявани в гена *APIS2* – всички описани досега патологични варианти са мутации водещи до изместване рамката на четене или до формиране на преждевременен стоп. Вариантът е потвърден чрез секвениране по Сангер и е установен и при болния брат на пациента.

При пациент № 38 е установено също и хетерозиготно носителство на известна патологична мутация в гена *SMPD1* (Sphingomyelin phosphodiesterase 1, acid lysosomal), NM\_000543.4:c.1177T>G, NP\_000534.3:p.Trp393Gly, асоциирана с интермедиерна протрахирана невро-висцерална форма на болестта на Niemann-Pick, тип A/B (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/2991/>). Вариантът е една от познатите “ромски” мутации, асоциирани със заболяването.



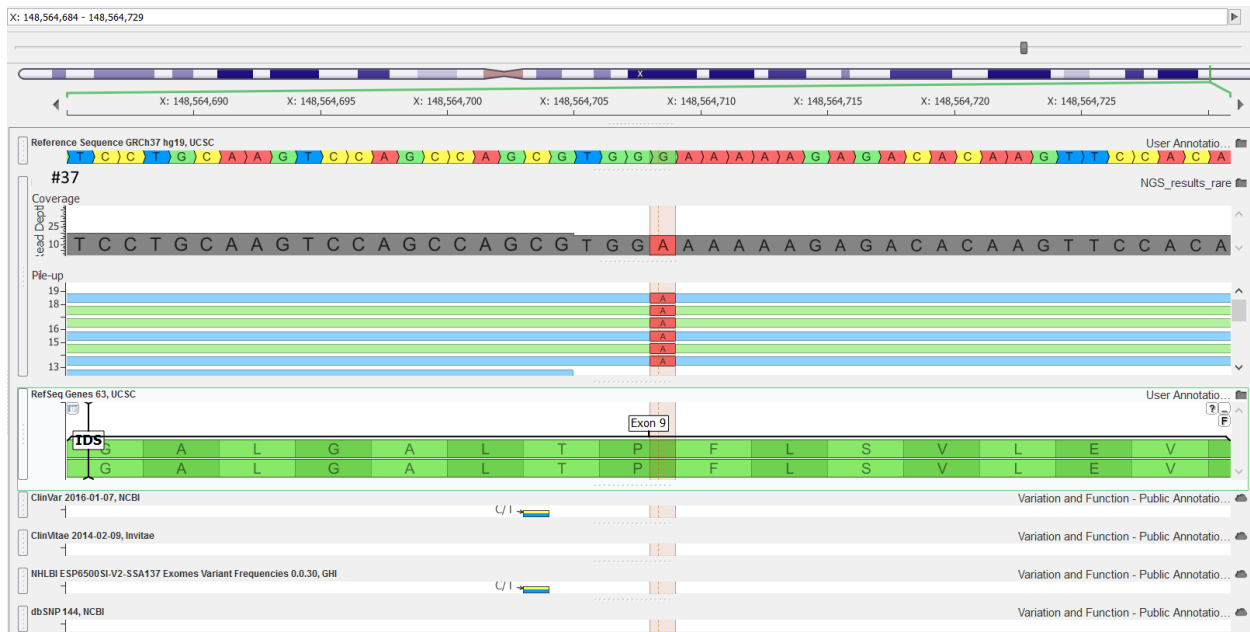
**Фигура 41** Мутация в гена *AP1S2*: p.Тур86Тег при пациент 38

- **Вероятно патологичен вариант *IDS* p.Pro408Ser**

Вариантът е установен при пациент 37 в хемизиготно състояние. На фигура 42 е представен екзон 9 на гена *IDS*. Замененият нуклеотид е маркиран.

Генът *IDS* кодира ензима идуронат 2-сулфатаза (ЕО 3.1.6.13), който участва в разграждането на гликозаминогликаните хепаран-сулфат и дерматан-сулфат (Bielicki, 1990) в лизозомите. Мутацията се характеризира със замяна на гуанин с аденин в позиция 148564708 на X-хромозомата и води до промяна в аминокиселинната последователност на белтъчния продукт на гена *IDS* (замяна на пролин със серин в екзон 9). Вариантът не е съобщаван досега в литературата и не е наблюдаван при нито един от индивидите, изследвани по проекта NHLBI Exome Sequencing Project (ESP).

При всички бозайници (с изключение на птичечовка), за които има данни, на тази позиция в полипептидната верига на ензима присъства пролин. Въз основа на софтуерна предикция (MetaSVM Pred) на ефекта може да се очаква, че мутацията нарушава функцията на протеина.



**Фигура 42** Мутация в гена *IDS*: chrX: g.148564708G>A, NM\_000202.5:c.1222C>T, NP\_000193.1:p.Pro408Ser при пациент 37

Патологичните мутации в гена *IDS* са причина за X-свързана рецесивна форма на мукополизахаридоза и се проявяват фенотипно при хемизиготи като синдром на Hunter (Mucopolysaccharidosis II). Заболяването се характеризира с макроцефалия, груби черти на лицето, помътняване на корнеята, нисък ръст, мултиплена дизостоза, хепатоспленомегалия, рецидивиращи инфекции (отити, пневмонии), задръжка в невропсихичното развитие, флекссионни контрактури на крайниците. Заболяването е прогресивно, отлагането на мукополизахариди води до развитие на сърдечна недостатъчност и при тежките форми болните загиват преди 15 годишна възраст. При лабораторни изследвания се установява повишено излъчване на мукополизахариди в урината и намалена активност на идуронатсулфатаза в левкоцити и кожни фибробласти. При пациент №37 началото на заболяването е от раждането и симптомите включват изоставане в нервно-психическото развитие, изоставане във физическото развитие (на 6-годишна възраст - тегло 7600 г и ръст 85 см), шийна хипотония, спастична квадрипареза, генерализирана хипертрихоза, дисморфизъм (мегацефална конфигурация на черепа, диспластични уши, високо небце) и рецидивиращи пневмонии. Образното изследване на ЦНС с МРТ е показало данни за исхемична енцефалопатия. Изследване на аминокиселини и ацилкарнитини в кръв е показало нормален резултат. Детето е починало. Не е провеждано изследване на мукополизахариди в урина, което не даде възможност да проверим хипотезата за наличие на мукополизахаридоза.

При същия пациент е установено носителство в хетерозиготно състояние на патологични мутации в други гени:

а) *ARSA* (arylsulfatase A), p.Ile181Ser. Вариантът е наблюдаван при пациенти с Metachromatic leukodystrophy;

б) *XPC* (*Xeroderma pigmentosum*, group C), p.Pro334His. Вариантът е установен при пациенти с *Xeroderma pigmentosum*, group C).

При останалите четирима пациенти с клиника на спастична квадриплегия и епилепсия (пациенти 39, 40, 41 и 42) не бяха установени известни патологични мутации в изследваните гени, които да обясняват наблюдаваните клинични симптоми.

#### 4.4.3. Обсъждане на патологични и вероятно патологични варианти, установени при здрави родственици на болни с редки болести

- **Вероятно патологичен вариант *NAGLU* p.Tyr 391 Cys**

Изследваното лице е клинично здрава жена на 32 години, от български етнически произход, бременна за първи път. Повод да бъде изследвана за носителство на мутации, свързани с метаболитни заболявания, беше фамилната анамнеза: жената е имала сестра починала от мукополизахаридоза тип III B (*Sanfilippo* B).

При анализа е установена мутация в гена *NAGLU* (*N-Acetylglucosaminidase*, Alpha) в хетерозиготно състояние. Мутацията представлява замяна на аденин (A) с гуанин (G) в позиция 40695196 на 17-та хромозома, която води до замяна на тирозин (Tyr) с цистеин (Cys) в позиция 391 на белтъчния продукт на гена *NAGLU*.



**Фигура 43** Мутация в гена *NAGLU*: p.Tyr 391 Cys

Мутацията е в хетерозиготно състояние и не е регистрирана досега. Вариантът е вероятно патологичен: аминокиселинната замяна засяга консервативна позиция и е разположена в една от осемте  $\alpha$ -спирали, изграждащи характерния за ензима TIM barrel домен. Дефекти в гена *NAGLU*, кодиращ ензима  $\alpha$ -N-ацетилглюкозаминидаза, са причината за заболяването мукополизахаридоза тип III B (*Sanfilippo* B) (<http://omim.org/entry/609701>; <http://omim.org/entry/252920>). На фигура 43 е представен участъкът от екзон 6 на гена *NAGLU*. Замененият нуклеотид е маркиран.

- **Патологичен вариант ABCB11 p.Leu1126Ter**

Вариантът е установен в хетерозиготно състояние при здравия баща (3а) на дете, починало от прогресивна интрахепатална холестаза. Семейството е от български етнически произход. Родителите (2а и 3а) са млади, здрави, фамилно необременени за метаболитни заболявания. Индексният пациент е момче, родено от първа бременност, чрез цезарово сечение, с тегло 4300 г и ръст 53 см. Неонаталният период протекъл гладко. Детето е кърмено през първия месец. Заболяването се изявило на 43-дневна възраст, когато детето станало неспокойно, било бледо, имало две обилни повръщания. Детето било хоспитализирано, първоначално в инфекциозна болница, впоследствие в детската клиника по гастроентерология на СБАЛДБ. Установена била хепатомегалия, впоследствие и спленомегалия, изразен иктер. При проведените лабораторни изследвания са установени анемия, тромбоцитоза (в крайния стадий - тромбоцитопения), повишени стойности на билибрубин, повишени чернодробни трансминази (ASAT – 178 - 480 IU/l; ALAT – 118 – 496 IU/l) и LDH, нормални стойности на GGTP, повишени нива на жлъчни киселини в серум (>200  $\mu\text{mol/l}$ ). Изследванията за инфекциозен хепатит са показали негативен резултат (CMV, HSV, HIV, Lues, HAV, HBV, HCV, ParvoB19). Изследванията за алфа1-антитрипсинов дефицит, галактоземия и муковисцидоза са показали нормални резултати. Заболяването прогресирало до чернодробна цироза и детето починало на 3 годишна възраст. Проведено е генетично изследване на пробанда в чужбина за търсене на мутации в гена *ATP8B1* – също с негативен резултат.

Заболяването фамилна прогресивна интрахепатална холестаза (PFIC) се дължи на дефекти в транспорта на жлъчните киселини. В зависимост от генетичния дефект се различават четири типа: тип 1 (PFIC1) – с мутации в гена *ATP8B1* (*ATPase, class I, type 8B, member 1*, <http://www.omim.org/entry/602397>), тип 2 (PFIC2) – с мутации в *ABCB11* (*ATP-binding cassette, subfamily B, member 11*, <http://www.omim.org/entry/603201>), тип 3 (PFIC3) – с мутации в *ABCB4* (*ATP-binding cassette, subfamily B, member 4*, <http://www.omim.org/entry/171060>) и тип 4 (PFIC4) – с мутации в *TJP2* (*Tight junction protein 2*, <http://www.omim.org/entry/607709>). И четирите типа се унаследяват автозомно рецесивно. PFIC1 и PFIC2 са свързани с леко завишени или нормални серумни нива на GGTP, докато PFIC3 се свързва с високи нива на серумната GGTP и чернодробната хистология се характеризира с портално възпаление и дуктална пролиферация в ранен стадий на заболяването (Maggiore G et al, 1987, 1991). PFIC4 е свързана с нормално или леко повишени нива на GGTP (Sambrotta et al., 2014). Фенотипно сходни с фамилната прогресивна интрахепатална холестаза са вродените дефекти в синтеза на жлъчни киселини. Вродените дефекти в синтеза на жлъчни киселини са автозомни рецесивни заболявания, характеризиращи се с неонатална презентация на прогресивно чернодробно заболяване, с холестатична жълтеница и малабсорбция на масти и мастно-разтворими витамини в стомашно-чревния тракт в резултат от първичната недостатъчност в синтеза на жлъчни киселини. Засегнатите деца имат задръжка в развитието и вторична коагулопатия. Повечето пациенти се повлияват добре от орална терапия с жлъчни киселини.

Изследванията при родителите на починалото дете бяха извършени чрез секвениране с генния панел TruSight One. В резултат на анализа при 3а беше установен патологичен вариант в гена *ABCB11* в хетерозиготно състояние. ABCB11 протеинът, познат още като BSEP (Bile salt export pump, помпа за експорт на жлъчни соли), има структура сходна с тази на другите членове на MDR фамилията – два трансмембранни домена (с по 6

трансмембранни участъка) и два цитоплазмени ABC-транспортни домена. Вариантът при 3а представлява замяна на аденин с тимин в позиция 169787209 на 2-ра хромозома. Трансверзията засяга последователността на 25-ти екзон на гена *ABCB11* и по предикция води до замяна на кодон 1126 (кодиращ левцин) със стоп-кодон. Вариантът не е съобщаван досега и не е публикуван в специализираните бази данни. Естеството на мутацията предполага, че вариантът е патологичен. На фигура 44 е показан вариантът в 25-ти екзон на *ABCB11*.



**Фигура 44** Мутация *ABCB11* p.Leu1126Ter при 3а.

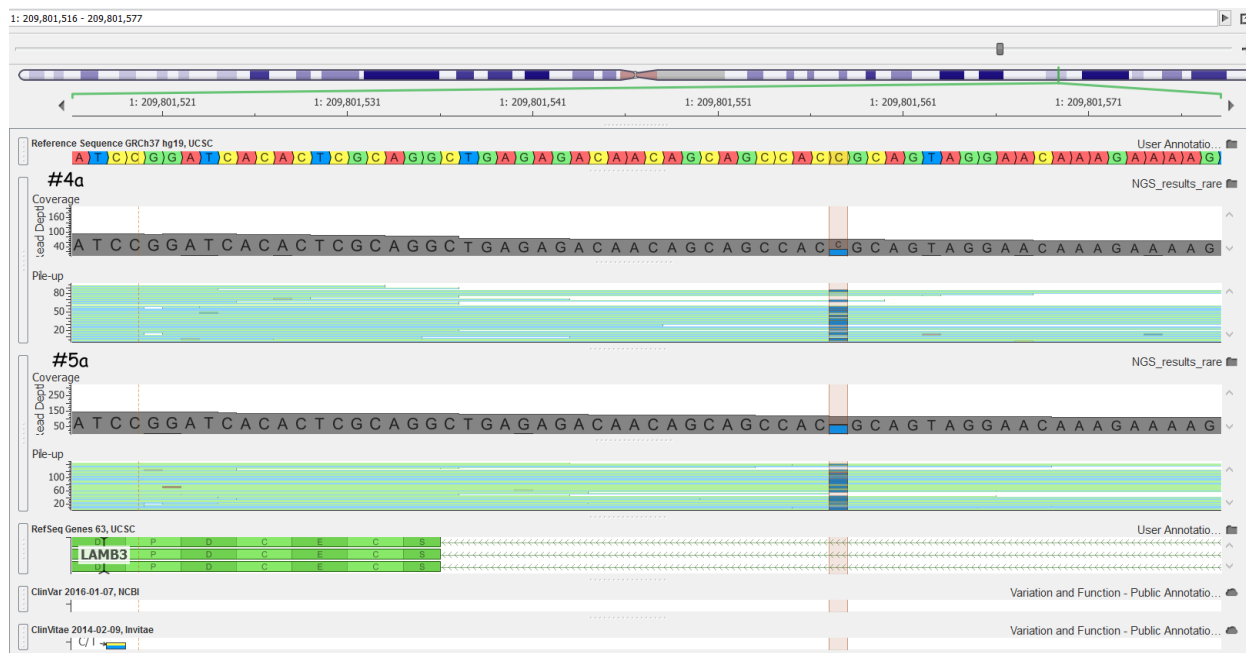
**Таблица 16** Сегрегация на вариантите в гена *ABCB11* при членовете на семейство с прогресивна интрахепатална холестаза. F – фетус; хет – хетерозигот; хом – хомозигот; --не носи варианта;

Ген	Вариант	Клинична значимост	Генотип		
			F	2а	3а
<i>ABCB11</i>	Chr2: g.169787209A>T, NM_003742.2:c.3377T>A, NP_003733.2:p.Leu1126Ter	Патологичен вариант	-	-	хет
	rs2287618	Инtronен вариант, полиморфен	хет	хом	хет
	rs2287620	Инtronен вариант, полиморфен	хет	хом	хет
	rs2287622, NM_003742.2:c.1331T>C, NP_003733.2:p.Val444Ala	Полиморфен вариант	хет	хом	-
	rs2287623	Инtronен вариант, полиморфен	хет	хом	-
	rs2241340	Инtronен вариант, полиморфен	хет	хом	-
	rs2241341	Инtronен вариант, полиморфен	хет	хом	-
	rs2193831	Инtronен вариант, полиморфен	хет	хом	-
	rs386652544	Инtronен вариант, полиморфен	хет	-	хет
	rs853772	Инtronен вариант, полиморфен	хет	-	хет
	rs853789	Инtronен вариант, полиморфен	хет	-	хет
	rs497692, NP_003733.2:p.Ala1028=	Синонимен полиморфен вариант	хет	-	хет
	rs579275	Инtronен вариант, полиморфен	хет	-	хет
	Chr2: g.169779896T>C, нов в 3'UTR	?	хет	-	хет

При родителите (2а и 3а) на детето с прогресивна интрахепатална холестаза не бяха установени известни патологични или вероятно патологични варианти в останалите гени асоциирани с PFIC. При 2а не бяха установени патологични или вероятно патологични варианти в гена *ABCB11*, но всички налични полиморфни варианти в гена бяха представени в хомозиготно състояние (таблица 16). При някои пациенти с фенотип на PFIC2 е откриван само един мутантен алел в хетерозиготно състояние (Jansen PL et al, 1999; van Mil SWC et al, 2004). Тъй като заболяването е рецесивно допускаме, че вероятно вторият мутантен алел е голяма по размер екзонна / генна делеция, която не може да бъде потвърдена или отхвърлена категорично чрез ДНК секвениране. По време на изследването 2а и 3а очакваха второто си дете. Генетично изследване на плода с панела TruSight Inherited показва унаследяване на варианти в гена *ABCB11*, както с бащин, така и с майчин произход. Полиморфизмите, носени от майката (2а) в хомозиготно състояние и неприсъстващи при бащата (3а), бяха установени в хетерозиготно състояние при плода (F), което не противоречи на възможността 2а да е хетерозиготен носител на делеция обхващаща целия ген *ABCB11* или значителна част от него.

- **Вероятно патологичен вариант *LAMB3* c.1133-22G>A**

Вариантът е установен в хетерозиготно състояние при двамата здрави родители (4а и 5а) на дете, починало от булозна епидермолиза. Семейството е от ромски етнически произход. Родителите са млади, здрави, не съобщават за кръвно родство. Детето, засегнато от булозна епидермолиза, е момиче, родено от първа нормално протекла бременност, с нормални ръст и тегло при раждането. Още при раждането са установени кожни лезии подобни на охлузвания по пръстите на ръцете, около пъпния остатък, зад ушите и по капилициума. В следващите дни се появило множество були (предимно в местата на триене), в началото дребни, а в последствие с диаметър 3-4 см, халтави с прозрачно съдържимо. При спукване се образували крусти. Промени са наблюдавани и по лигавиците – плътни бели налепи и плаки, които лесно кървяли при допир. В резултат на лезиите и последвалите некрози част от ноктите опадали. Извършено е имунохистохимично изследване на кожна биопсия, което потвърдило диагнозата булозна епидермолиза тип Herlitz. При анализа е била установена липса на ламинин 332 (ламинин 5), намалено количество плектин, колаген 17 и  $\alpha\beta4$  интегрин. Въз основа на данните от хистохимичния анализ е препоръчан ДНК анализ за търсене на мутации в гените *LAMB3*, *LAMA3* и *LAMC2*. Детето е починало на тримесечна възраст от усложнения свързани с основното заболяване и ДНК анализ не е правен. Булозната епидермолиза с дефект в адхезията (включително тип Herlitz) може да се дължи на дефекти в няколко различни гена: трите, кодиращи субединиците на ламинин 5 (*LAMB3*, *LAMA3* и *LAMC2*), колаген 17 (*COL17A1*), интегрин  $\alpha6$  (*ITGA6*) или интегрин  $\beta4$  (*ITGB4*). Леталната форма на епидермолизис булоза най-често с дължи на трукниращи мутации в гена *LAMB3* (Nakano, A et al, 2000). Изследването на двамата родители с панела TruSight Inherited diseases не установи наличие на известни патологични мутации в гените *LAMB3*, *LAMA3* и *LAMC2*, нито в други гени, асоциирани с рецесивни форми на булозна епидермолиза (*COL7A1*, *COL17A1*, *PLEC1*, *ITGA6*, *ITGB4* и *DSP*). При анализа установихме и при двамата родители носителство в хетерозиготно състояние на нов неописван досега интронен вариант в гена *LAMB3*: g.209801557C>T (NM\_001017402.1:c.1133-22G>A), замяна на цитозин с тимидин в позиция 209801557 на 1-ва хромозома (фигура 45).



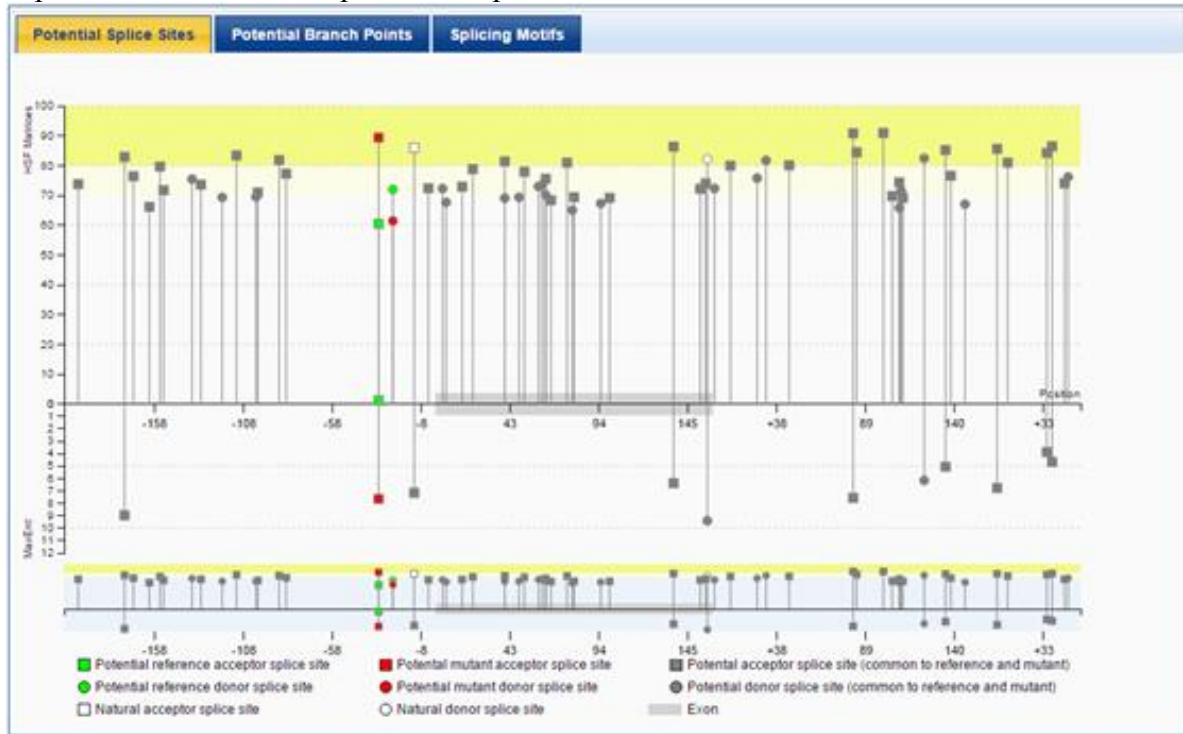
**Фигура 45** На фигурата е представена границата на екзон 10 и интрон 9 при пациенти 4а и 5а. Замененият нуклеотид е маркиран.

Вариантът е интронен и отстои на 22 бази от 10-ти екзон. За предикция на ефекта от нуклеотидната замяна ползвахме онлайн приложение Human Splicing Finder (HSF3.0; <http://www.umd.be/HSF/>; Desmet FO et al, 2009). Според предиктора замяната създава потенциално ново акцепторно сплайс място (фигура 46). При използване на новото алтернативно сплайс-място 10-ти екзон би се удължил с 20 нуклеотида, което би довело до изместване на рамката на четене и генериране на стоп-кодон след 24 кодона в новата рамка на четене.

При изследването на 4а и 5а установихме и носителство на известни патологични мутации в други гени. При 4а се установи носителство в хетерозиготно състояние на известна патологична мутация в гена за конексин 26: *GJB2*: c.109G>A, p.Val37Ile, rs72474224. Вариантът е една от честите мутации наблюдавани при пациенти с невросензорна глухота. Честотата на варианта сред европейци се оценява на около 0.00186 (<http://www.omim.org/entry/121011>; Bason, L et al, 2002; Huculak C et al, 2006).

При 5а се установи наличие на мутация в гена за ектодисплазин А, в хемизиготно състояние: *EDA*: c.206G>T, p.Arg69Leu, rs132630309. Вариантът е известен, но данните за клиничното му значение са противоречиви. Съобщаван е като „патологичен“ и като „вариант с неизвестно значение“ при пациенти с Х-свързана форма на ектодермална дисплазия (Kere, J. et al, 1996). Генът *EDA* кодира белтъка ектодисплазин А, който е мембранен протеин и принадлежи към фамилията на тумор- некротизиращия фактор. Патологичните мутации в гена *EDA* са причина за Х-свързана рецесивна форма на хипохидротична ектодермална дисплазия. Проявите на заболяването могат да варират от селективна хипоплазия / аплазия на кучешките зъби до изразено нарушение в развитието на ектодермалните органи (косми, нокти, зъби, потни жлези) (<http://omim.org/entry/300451>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV000011779>);. 5а е мъж на 29 години с нормално развити ектодермални органи (косми, нокти, зъби и потни жлези). Нормалният фенотип на 5а и отсъствието на фенотипни прояви на ектодермална дисплазия показват, че вероятно

мутацията е рядък бенигнен вариант. Това ни даде основание в собствената база данни вариантът да бъде аотиран като вероятно бенигнен.



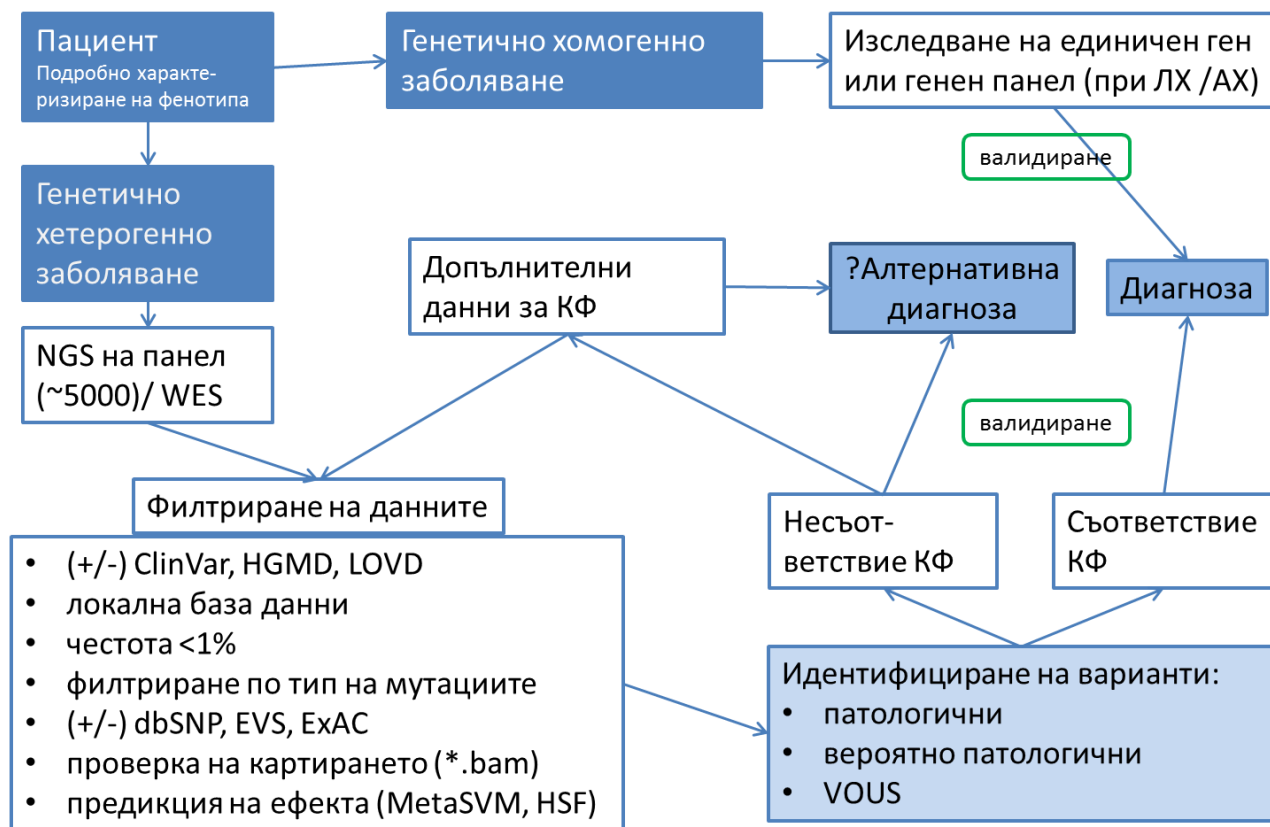
Predicted signal	Prediction algorithm	cDNA Position	Interpretation
New Acceptor Site	1 - HSF Matrices	<pre> acattctctctgctctactcagcagtggtct        ----- ----- -----        1        ----- ----- -----        2       -40  -35  -30  -25  -20  -11           </pre>	Activation of an intronic cryptic acceptor site. Potential alteration of splicing.
	2 - MaxEnt		
ESS Site broken	1 - Sironi et al. - Motif 2	<pre> c c a c t g c c a g t g g c c c c c        ----- ----- -----        1        ----- ----- -----        2       -28  -26  -24  -22  -20  -18  -16  -14           </pre>	Alteration of an intronic ESS site. Potential alteration of splicing.
	2 - IIEs from Zhang et al.		

**Фигура 46.** На фигурата е представен в графичен и в табличен вид резултата от предикцията с HSF3.0.

cDNA Position	Splice site type	Motif	New splice site	Wild Type	Mutant	If cryptic site use, exon length variation	Variation (%)
-32	Acceptor	ttctactgcggtg	ttctactgcagTG	60.46	89.4	+20	New site +47.87
-12	Natural Acceptor	gtgtctctcagCC	gtgtctctcagCC	85.92	85.92	0	0
154	Natural Donor	ACCgtgagt	ACCgtgagt	82.12	82.12	165	0

**Таблица 17** В таблицата са представени резултатите от предикцията с HSF3.0 на ефекта от мутацията в интрон 9 на гена *LAMB3*.

#### 4.5. Алгоритъм за прилагане на NGS при пациенти с редки моногенни болести



Фигура 47. Алгоритъм за прилагане на NGS при пациенти с редки болести

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Към днешна дата броят на известните моногенни заболявания се оценява на около 7000 отделни нозологични единици и всяка от тях се счита за рядка. Съвкупната им честота обаче е значима и на тях се дължат до 25% от хоспитализациите в детска възраст (Costa T et al., 1985). Като цяло, редките генетични болести засягат значителен брой хора и оказват голямо влияние върху системата на здравеопазването.

Изясняването на генетичните основи на редките менделиращи заболявания е трудно и по-голямата част от пациентите остават недиагностицирани въпреки обстойните изследвания (клинични, лабораторни, образни). Конвенционалният диагностичен процес, използван от повечето специалисти по клинична / медицинска генетика започва с разпознаване на конкретни фенотипни характеристики и обикновено е свързан с поредица лабораторни изследвания, чийто избор зависи от предходни изследвания, които са се оказали неинформативни. Скорошно ретроспективно проучване показва, че по-малко от половината пациенти насочени за генетична диагностика, с клинични и фамилни данни съответстващи на заболяване с генетична етиология, достигат до конкретна диагноза (Shashi V et al, 2014). Цялостното екзомно/геномно секвениране става все по-достъпно и вече се предлага и за диагностични цели. Независимо, че NGS на екзом / геном има потенциала да промени диагностичната парадигма в медицинската генетика, предстои да се изясни, кои пациенти биха имали полза от подобен тест и на какъв етап от клиничното им проследяване. По литературни данни диагностичният добив при прилагане на екзомно секвениране за изследване на пациенти с неизвестна диагноза е между 25 и 50% (Yang Y et al, 2013; Need AC et al. 2012). При нашето проучване установихме еднозначна генетична причина, асоциирана с водещите клинични прояви при 48% от всички изследвани пациенти (21 от 43 изследвани), като този дял е по-малък сред пациентите с „неизвестна“ диагноза – 38% (10 от 26 изследвани). При четирима пациенти с категорична патологична находка и генотип, предполагащ фенотипна изява на заболяване, генетичната диагноза се различава от работната клинична, което показва потенциала на NGS технологията да ни отведе до алтернативна генетична диагноза. При двама пациенти с неизвестна диагноза бяха установени известни патологични генни варианти, които само частично обясняват проявения фенотип, а при един пациент беше установено едновременно наличие на патологични варианти в гени, асоциирани с три различни моногенни заболявания и генотип, предполагащ фенотипна изява и на трите състояния. Тези примери показват, че дори и при пациентите с моногенни заболявания фенотипът е комплексен и се определя не само от патологичен алел/и в единичен ген, а от цялостния генотип - вариантите на множество други гени, и факторите на средата.

Независимо, че при прилагане на масивно паралелно секвениране се генерира огромен обем данни във вид на ДНК последователности, методът понастоящем е неприложим за разкриване на тринуклеотидни експанзии и не се ползва рутинно за установяване на генни /екзонни делеции и дупликации. Тези особености на технологията изискват прецизен клиничен подбор на пациентите и познаване на мутационния спектър на конкретното заболяване/група заболявания. Подобно на анализа на данните от микрочипов анализ, при анализа на данните от NGS е удачно прилагането на подхода „обратно фенотипизиране“ – идентифициране на патологични генни варианти и последващо сравняване на фенотипа на пациента, с очаквания при носителство на конкретния патологичен вариант. Важна предпоставка за успешно внедряване на NGS технологията в клиничната практика е

наличето на бази данни, съдържащи коректна информация за асоциацията на генетичните варианти с конкретни фенотипни белези. В хода на изследванията на пациентите с редки болести поставихме основите на такава локална база данни, съдържаща информация за конкретни генни варианти и асоциирани с тях фенотипи.

Нашето проучване показва диагностичен добив сходен с данните в литературата. Работата ни имаше пряк положителен ефект и даде възможност в пет семейства с рискови бременности да бъде осъществена пренатална диагностика на редки моногенни болести.

NGS анализът на панели, включващи множество гени има своето място като диагностичен метод за изследване на пациентите с редки моногенни заболявания, но все още секвенирането по Сангер е „златен стандарт“ и клиничното приложение изисква верифициране на установените варианти.

В бъдеще възнамеряваме да продължим изследванията в няколко насоки:

- Да допълним секвенционния анализ с функционален в моделни микроорганизми или клетъчни линии, което би дало информация за възможния фенотипен ефект на варианти, които сега класираме като „вероятно патологични“ или „с неизвестно значение“.
- Да се включим в „лова“ на гени, прилагайки екзомно секвениране при пациентите останали с неизвестна диагноза.
- Да продължим да допълваме базата данни на анотирани редки варианти с информация за нашата популация.

## ИЗВОДИ

1. Установи се сходство на броя и типа на генните варианти при изследване на здрави и болни индивиди с еднакъв генен панел, включващ 4813 гени.
2. Установи се, че 4-5% от вариантите наблюдавани при здрави/болни индивиди са с популационна честота под 1%.
3. Установи се, че при изследване с панел от 4813 гени изследваните здрави индивиди носят средно 3-4 известни патологични варианти.
4. Открити са 8 нови патологични мутации, асоциирани с клиничния фенотип при пациенти с редки моногенни заболявания:
  - *ABCB11*: g.169787209A>T, c.3377T>A, p.Leu1126Ter
  - *AP1S2*: c.258T>A, p.Tyr86Ter
  - *COL1A1*: c.2775delT, p.Gly926ValfsTer182
  - *DMD*: g.31986568C>A, c.6502G>T, p.Glu2168Ter
  - *NAGLU*: p.Tyr391Cys
  - *NPC1*: c.3127A>G, p.Thr1043Ala
  - *PHKG2*: p.Leu160del
  - *RPS6KA3*: c.913C>T, p.Arg305Ter
5. Прилагането на секвениране от ново поколение с ползване на панел от 4813 гени има потенциала да установи генетичен дефект, асоцииран с фенотипа при около 48% от пациентите с редки моногенни болести.
6. Най-голям шанс за поставяне на генетична диагноза имат пациентите със строго специфичен фенотип на заболявания без / с ограничена локусна хетерогенност.

## **ПРИНОСИ**

### Приноси с научна стойност

1. Открити са нови варианти свързани с патологичен фенотип.
2. Съставена е собствена база данни с анотирани варианти категоризирани според очаквания фенотипен ефект.

### Приноси с приложен характер

1. За първи път у нас са характеризирани варианти при пациенти с редки болести чрез секвениране от ново поколение.
2. Оптимизиран е лабораторният протокол за работа с различни генни панели
3. Разработен е подход за анализ на данни от секвениране от ново поколение.

## **НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ПО ТЕМАТА**

### **Научни публикации във връзка с дисертационния труд**

И. Кременски Р. Въжарова, И. Брадинова, М. Иванова, И. Синигерска, Д. Димитров, А. Савов, С. Бичев, С. Андонова, Нови подходи за скрининг и диагностика при вродени грешки на метаболизма, Педиатрия, 1, 2010, Suppl.: 30-35

Atanassov V, Vazharova R, Ready, Steady, Go - The current state of carriership status determination and prenatal diagnosis of Haemophilia A in Bulgaria, Biotechnology & Biotechnological Equipment 04/2014; 25(4):2566-2571

Тончева Д., Р. Въжарова, С. Хаджидекова, И. Димова, М. Малинов. Диагностика на редки генетични болести. В „Редки генетични болести“, П/Р Д. Тончева, 2014, Изд. Симелпрес, 42-54.

Въжарова Р., Д. Тончева. Геномна диагностика на ВГМ. В „Редки генетични болести“, П/Р Д. Тончева, 2014, Изд. Симелпрес, 344-347

Въжарова Р., С. Иванов, Л. Балабански, Д. Тончева. В „Редки генетични болести“, П/Р Д. Тончева, 2014, Изд. Симелпрес, Геномна диагностика на неврологични заболявания. 488-503

R. V. Vazharova, S. Vragaleva, V. Dimitrova, S. Ivanov, L. Balabanski, M. Malinov, D. Toncheva Novel hypomorphic mutation in FANCD2 gene observed in a fetus with multiple congenital anomalies (subbmitted)

### **Научни съобщения на конгреси във връзка с дисертационния труд**

T. K. Kadiyska, T. Todorov, S. Bichev, R. Vazharova, A. Nossikoff, A. Savov, V. Mitev; A novel full promoter 1B deletion of APC gene in Bulgarian Familial Adenomatous Polyposis Family, European Human Genetics Conference 2013 June 8 – 11, Paris, France

R. V. Vazharova, S. Ivanov, L. Balabansky, D. Serbezov, M. Malinov, N. Yaneva, S. Bichev, A. Savov, D. Toncheva; NGS targeted resequencing of multiple genes for rare diseases in Bulgaria, European Human Genetics Conference, May 31 - June 3, 2014 Milan, Italy

S. Ivanov, R. V. Vazharova, L. Balabanski. S. Vragaleva, V. Dimitrova, M. Malinov, D. Toncheva Detection of a novel mutation in FANCD2 gene in a fetus with unilateral kidney agenesis and anomalies of upper limbs European Human Genetics Conference, June 6 - 9, 2015

R. V. Vazharova, S. Ivanov, L. Balabanski, I. Tournev, T. Chamova, S. Bichev, A. Savov, D. Toncheva; NGS reveals new causes for spastic quadriplegia in Roma patients European Human Genetics Conference, June 6 - 9, 2015