

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

ЗОРНИЦА НИКОЛОВА ПАВЛОВА

**Популационно-генетични и молекулярно-биологични проучвания при
пациенти с наследствена транстиретинова амилоидоза в България**

АВТОРЕФЕРАТ

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

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

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:

**Акад. проф. д-р Ваньо Иванов Митев, дм, дбн
Проф. Албена Първанова Годорова – Георгиева, дбн**

София, 2023

Дисертационният труд съдържа 101 страници, 33 фигури и 26 таблици.

Цитирани са 120 литературни и електронни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Катедра по медицинска химия и биохимия на Медицински факултет, Медицински университет – София.

Включените в дисертацията изследвания са извършени в:

- Катедра по медицинска химия и биохимия на Медицински факултет, Медицински университет – София
- Генетична Медико-Диагностична Лаборатория „Геника“, гр. София

Настоящото изследване е финансирано частично от Съвета по медицинска наука на Медицински университет – София по договор Д-74/24.06.2020г.

Други източници на финансиране:

- *Investigator-Initiated Project Research Grant, № WI220557, Pfizer Luxemburg Sarl, Bulgaria Branch, 15.11.2016 “Genetic profile of TTR-FAP: Glu89Gln founder effect, parent-of-origin difference in penetrance and genetic screening programs”;*
- *Investigator-Initiated Project Research Grant, № WI241542/2018, Pfizer Luxemburg Sarl, Bulgaria Branch, “A completion of ATTR genetic profiling in Bulgaria and investigation of possible non-coding genetic variations with effect on the heterogeneity of disease manifestation in the context of a concrete TTR mutation”*

Дисертационният труд е представен на заседание на катедрен съвет на Катедра по медицинска химия и биохимия, Медицински университет - София, на 12.12.2022г. и насочен за защита към 24.04.2023г.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 24.04.2023г. в Катедра по медицинска химия и биохимия, Медицински университет – София, ул. Здраве 2, гр. София, пред научно жури в състав:

1. Проф. Алексей Славков Савов, дб (рецензия)
2. Доц. Любомир Любомиров Трайков, дбф (становище)
3. Доц. Мария Борисова Иванова, дм (становище)
4. Проф. Светла Димитрова Петрова, дб (рецензия)
5. Доц. Радослава Василева Въжарова, дм (становище)

Материалите по защитата са на разположение в Катедра по медицинска химия и биохимия, Медицински университет – София.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	3
РЕЗЮМЕ	4
ВЪВЕДЕНИЕ	5
1. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ	6
1.1. Цели	6
1.2. Задачи	6
2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	7
2.1. Клиничен и биологичен материал	7
2.2. Методи	7
3. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	8
3.1. Скринингови изследвания за търсене на патологични <i>TTR</i> варианти	8
3.1.1. Скрининг при пациенти	8
3.1.2. Скрининг при новородени за определяне честотата на носителство на <i>TTR</i> варианта Gly47Glu	13
3.2. Анализ на регулаторни генетични полиморфизми с потенциален ефект върху клиничната изява на заболяването	14
3.3. Анализ на генната експресия на транстиретина	19
3.4. Хаплотипен анализ за определяне ефект на родоначалника	24
3.4.1. Микросателитен фрагментен анализ	24
3.4.2. Реконструкция на хаплотипа	26
3.4.3. Статистическа оценка	28
3.4.4. Определяне „възраст на мутацията“ – възрастта на най-скорошния общ предшественик	28
3.5. Обобщение на резултатите и заключение	31
4. ИЗВОДИ	32
5. ПРИНОСИ	33
6. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	34
6.1. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	34
БИБЛИОГРАФИЯ	35

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ATTRv – наследствена транстиретинова амилоидоза

ATTRwt – див тип транстиретинова амилоидоза

TTR-ФАП – транстиретинова фамилна амилоидна полиневропатия

TTR-ФАК – транстиретинова фамилна амилоидна кардиомиопатия

PCR – полимеразна верижна реакция

SNP – единичен нуклеотиден полиморфизъм

EDTA – етилендиаминтетраоцетна киселина

кДНК – копи ДНК

ELB - Excoffier-Laval-Balding алгоритъм

MCMC - Markov chain Monte Carlo алгоритъм

РЕЗЮМЕ

Наследствената транстиретинова амилоидоза е мултисистемно генетично заболяване с късно начало, засягащо периферната нервна система, автономната нервна система, сърцето и др. Характеризира се с известна генетична и фенотипна хетерогенност, като България е една от страните с висока честота на генетично носителство на амилоидогенни варианти в гена *TTR*, които причиняват заболяването. В България е характерна ендемичност на разпространението на *TTR* генетичните дефекти, най-честият от които е известен като Glu89Gln. Изследванията, проведени в рамките на настоящия дисертационен труд обхващат различни аспекти по отношение на разпространението, клиничната проява и молекулните механизми на патогенеза при пациенти с наследствена транстиретинова амилоидоза в България.

Проведе се скрининг за патологични варианти в *TTR* гена при предполагаеми нови пациенти, при което генофондът по отношение на амилоидогенни варианти беше допълнен с нов за страната вариант Glu54Leu. Роднините на новооткритите пациенти също бяха генетично тествани, при което високият дял на положителни безсимптомни носители сред изследваната група доказва необходимостта от скрининг в засегнатите семейства. Отрицателните резултати от скрининга при новородени от ромски произход от региона на градовете Полски Тръмбеш и Русе отхвърлиха хипотетичната ендемичност на варианта Gly47Glu, с което вариантите, за които има доказани ендемични региони в България остават Glu89Gln, Val30Met и Ser77Phe. Резултатите от проведените изследвания за търсене на патологични генетични варианти потвърдиха наличието на горещ регион в екзони 2 и 3 на *TTR* гена за натрупване на амилоидогенни варианти сред българската популация.

Беше направено генотипизиране на чести полиморфизми с потенциален модифициращ болестта ефект при пациенти с *TTR* варианта Glu89Gln. Резултатите показаха наличие на статистическа корелация между възрастта на начало на заболяването и полиморфизма rs1791228. Анализ на ефекта на rs1791228 върху първоначалното системно засягане в изследваната кохорта показва и увеличение на дяла пациенти, носители на алел T с първоначално сърдечно и смесено засягане. Наблюдаваните резултати до голяма степен съвпадат със съобщаваните в литературата данни, но предложените молекулни механизми все още не са достатъчно добре проучени за да може да се направи достоверен извод за ефекта на този полиморфизъм върху развитието на наследствена транстиретинова амилоидоза.

Резултатите от проведения транскрипционен анализ на транстиретиновата генна експресия в проби от урина и кръвна плазма на Glu89Gln пациенти установиха смесен моно- и биалелен транскрипционен профил с различни съотношения между мутантен и див тип транстиретин, което хипотетично би могло да има отношение върху прогресията на заболяването. Спрямо резултатите от изследването на двама монозиготни близнака беше предложен хипотетичен механизъм за възраст-зависима алел-специфична генна експресия. Въпреки, че са необходими още изследвания за изясняване на връзката между конкретния наблюдаван експресионен профил и развитието на наследствена транстиретинова амилоидоза, бяха поставени основи за проучвания върху молекулярни методи за прогностика на прогресията на заболяването.

Беше проведен хаплотипен анализ на скачени с *TTR* гена генетични микросателитни маркери, който статистически потвърди хипотезата за наличие на ефект на родоначалника за изследваните групи пациенти, носители на *TTR* вариантите Glu89Gln, Val30Met, Ser77Phe и Gly47Glu. Беше изчислена теоретичната възраст на най-скорошния общ предшественик за четирите вариантни групи, при което беше установено, че Val30Met е възникнал най-отдавна в нашата популация. Резултатите от проведените популационно-генетични изследвания показаха наличието на уникален за света генетичен профил при българските пациенти с наследствена транстиретинова амилоидоза, който е потенциален материал за изследване на все още недостатъчно добре проучените разлики във фенотипната изява на заболяването.

ВЪВЕДЕНИЕ

Амилоидозите са група от заболявания най-често с начало в зряла възраст, които се причиняват от аномално натрупване на белтъчни агрегати в различни тъкани и органи. Патологичният ефект е специфичен спрямо белтъка причинител на заболяването. Съществуват над 40 различни типа амилоидози, една от които е транстиретиновата амилоидоза. Тя се причинява от натрупване на амилоидни фибрили, съставени от белтъка транстиретин и се среща в две форми: див тип транстиретинова амилоидоза и наследствена транстиретинова амилоидоза, която се причинява от патологични варианти в гена *TTR*.

България е една от страните със сравнително висока честота на наследствена транстиретинова амилоидоза. Клинико-генетичните проучвания в областта започват преди над 10 години у нас, като вече е натрупана значителна пациентска информационна база с над 100 семейства с носителство на патологични варианти в *TTR* гена.

Настоящият дисертационен труд се фокусира върху изследване на българската кохорта от пациенти с наследствена транстиретинова амилоидоза по отношение на генетичната и фенотипна хетерогенност на популацията, изследване на молекулните механизми, стоящи зад разликите в клиничната проява на заболяването, както и проучване на генеалогията в ендемичните региони на страната.

1. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

1.1. Цели

- Изследване на генетичната хетерогенност, ефекта на генетични фактори и генната експресия върху фенотипната хетерогенност при пациенти с наследствена транстиретинова амилоидоза в България.
- Оценка на ефекта на родоначалника по отношение на най-честите патологични варианти в *TTR* гена.

1.2. Задачи

- Търсене на патологични варианти в *TTR* гена за пълно генетично профилиране на наследствената транстиретинова амилоидоза в България.
- Неонатален скрининг за носителство на патологичния *TTR* вариант Gly47Glu сред новородени от Ромски произход.
- Изследване на асоциацията между генетични полиморфизми с вероятна регулаторна функция и разликите във възрастта на начало на заболяването и системното засягане при носители на патологичния *TTR* вариант Glu89Gln.
- Изследване на експресионния профил на *TTR* гена при носители на патологичния *TTR* вариант Glu89Gln.
- Изследване на генетични маркери в близост до *TTR* гена за търсене на общ хаплотип при носителите на един и същ патологичен вариант.
- Теоретично определяне на възрастта на най-скорошния общ предшественик при носителите на един и същ патологичен вариант в *TTR* гена.

2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

2.1. Клиничен и биологичен материал

В настоящия дисертационен труд бяха изследвани общо 586 проби, чието разпределение спрямо етапа на проучването е описано в Таблица 1.

Таблица 1. Обобщение на изследваните проби по етапи.

	Етап на изследването	Брой изследвани проби	
	Скрининг при предполагаеми нови пациенти - венозна кръв	59	
1.	Скрининг за търсене на патологични варианти в <i>TTR</i> гена	Скрининг при роднини на доказани АТТRv пациенти - венозна кръв	23
	Скрининг при предполагаеми пациенти, отрицателни за патологични варианти в екзони 2 и 3 на <i>TTR</i> гена - геномна ДНК от венозна кръв	56	
	Неонатален скрининг за определяне честотата на носителство на <i>TTR</i> варианта Gly47Glu сред Роми – филтърни бланки	100	
2.	Анализ на регулаторни генетични полиморфизми с потенциален ефект върху клиничната изява на заболяването - геномна ДНК от венозна кръв на Glu89Gln АТТRv пациенти.	124	
3.	Експресионен анализ на <i>TTR</i> гена - тотална РНК изолирана от урина и/или кръвна плазма на Glu89Gln АТТRv пациенти.	19	
4.	Хаплотипен анализ за определяне ефект на родоначалника (АТТRv пациенти, здрави роднини и контроли) - геномна ДНК от венозна кръв.	205	
Общ брой изследвани проби		586	

2.2. Методи

- Изолиране на високомолекулна ДНК от периферна кръв по солеви метод
- Изолиране на високомолекулна ДНК от филтърни бланки
- Изолиране на РНК от кръвна плазма и урина
- Секвениране по Sanger
- Статистически анализ за корелация - Хи-квадрат тест на Пиърсън
- РНК секвениране на *TTR* гена
- Количествено определяне на алел-специфичната експресия на транстиретина – алел-специфичен кДНК РСР и фрагментен анализ
- Микросателитен фрагментен анализ
- Реконструкция на хаплотипа - ELV алгоритъм
- Определяне на „възраст на мутацията“ – МСМС алгоритъм

3. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

3.1. Скринингови изследвания за търсене на патологични *TTR* варианти

3.1.1. Скрининг при пациенти

Резултатите от скрининга при индексни пациенти с предполагаема диагноза *ATTRv* са показани в Таблица 2. Освен известните до момента патологични варианти *Glu89Gln*, *Val30Met* и *Ser77Phe*, беше открит нов за България амилоидогенен вариант *c.220_221delGAinsCT*, *p.Glu74Leu (Glu54Leu)*. Също така беше открит още един нов за българската популация генетичен вариант *c.14G>A*, *p.Arg5His*, който беше класифициран като вариант с неясно клинично значение.

Таблица 2. Резултати от генетичното тестване при индексни пациенти, насочени за секвениране на *TTR* гена. Вариантите са номенклатурно представени спрямо кодиращата последователност на транскрипт NM_000371.4(*TTR*).

Индексни пациенти		
Положителни	<i>c.325G>C</i> ; <i>p.Glu109Gln (Glu89Gln)</i>	5
	<i>c.148G>A</i> , <i>p.Val50Met, (Val30Met)</i>	1
	<i>c.290C>T</i> , <i>p.Ser97Phe (Ser77Phe)</i>	1
	<i>c.220_221delGAinsCT</i> , <i>p.Glu74Leu (Glu54Leu)</i>	1
Общо положителни		8
Отрицателни с вариант с неясно значение	<i>c.14G>A</i> , <i>p.Arg5His</i>	1
Отрицателни		106
Общ брой изследвани пациенти		115

При някои от положителните *ATTRv* пациенти беше възможно провеждането на скрининг в семействата за търсене на безсимптомни носители на открития фамилен дефект (Таблица 3). Резултатите показаха наличието на 12 позитивни роднини в тези семейства.

Таблица 3. Резултати от генетичното тестване при роднини на *ATTRv* пациентите.

Роднини на <i>ATTRv</i> пациенти		
Положителни	<i>c.325G>C</i> , <i>p.Glu109Gln (Glu89Gln)</i>	6
	<i>c.148G>A</i> , <i>p.Val50Met, (Val30Met)</i>	3
	<i>c.220_221delGAinsCT</i> , <i>p.Glu74Leu (Glu54Leu)</i>	3
Общо положителни		12
Отрицателни		11
Общ брой роднини		23

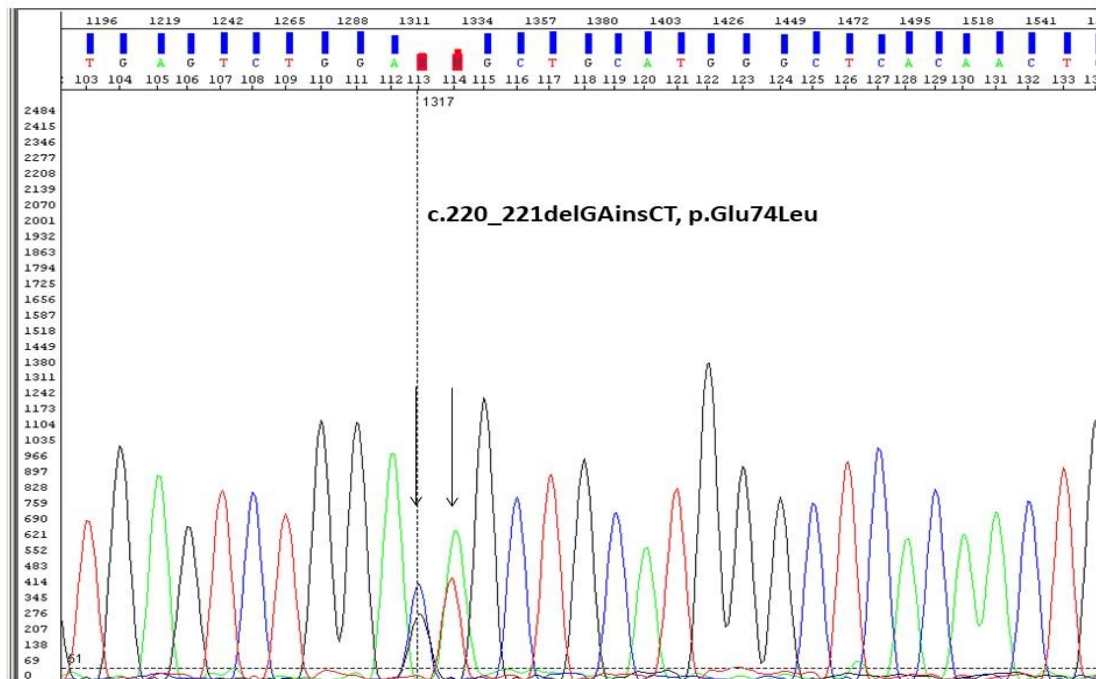
Наличните клинични данни за новооткритите *TTR* положителни пациенти до голяма степен съвпадат с генотип-фенотипната корелация известна до момента (Таблица 4). Пациентите с *Glu89Gln* показват смесен фенотип, засягащ едновременно периферната нервна система, сърдечната дейност и гастроинтестиналния тракт. Пациентът, носител на

варианта Ser77Phe също проявява периферна полиневропатия и сърдечна амилоидоза, но с до момента липсваща гастроинтестинална симптоматика. Клиничната картина при пациента с Val30Met е предимно с неврологичен характер и с характерната по-късна възраст на начало на заболяването.

Таблица 4. Клинична характеристика на ATTRv пациентите. В скоби е показан броят на клинично описаните положителни пациенти.

Системно засягане	Glu89Gln (6)	Val30Met (1)	Ser77Phe (1)	Glu54Leu (2)
Неврологично	Синдром на карпалния канал	Полиневропатен и сетивно-двигателен синдром	Полиневропатен сетивно-двигателен синдром	Синдром на карпалния канал
	Полиневропатен сетивно-двигателен синдром Периферен вестибуларен синдром	Периферен вестибуларен синдром	Стеноза на спиналния канал	Полиневропатен сетивно-двигателен синдром Лумбален вертебрален синдром
Кардиологично	Амилоидна кардиомиопатия		Амилоидна кардиомиопатия	Амилоидна кардиомиопатия
	Лявокамерна хипертрофия			Лявокамерна хипертрофия
Гастроинтестинално	Запек	Редуване на запек и диария		
	Диария			
	Загуба на тегло			
Средна възраст на начало на заболяването	49.8	66	56	47.5

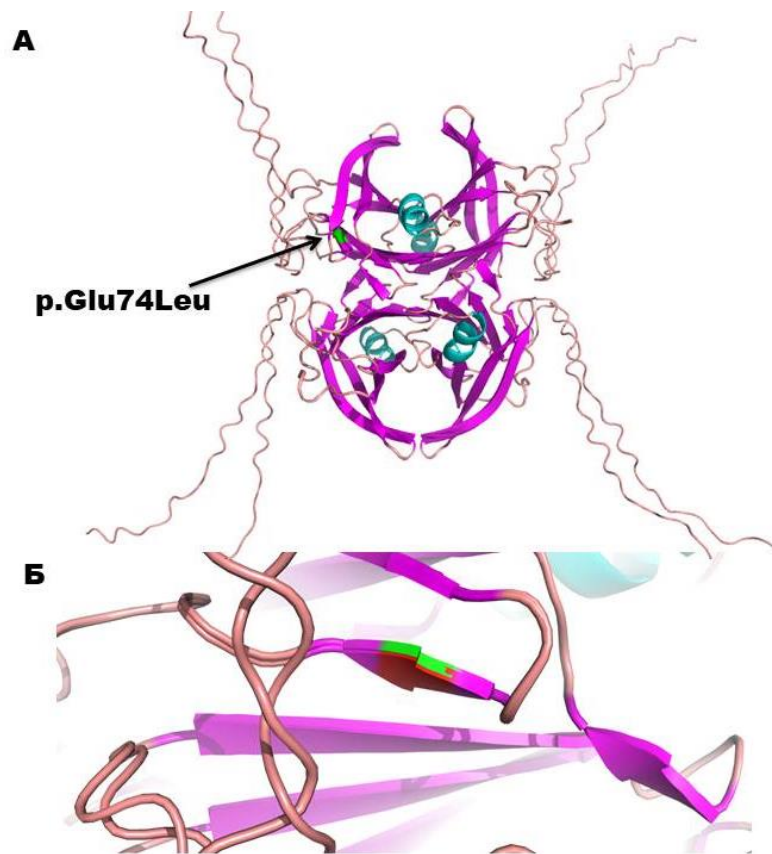
Вариантът p.Glu74Leu (Glu54Leu) е нов за България и се открива само при едно семейство от град Търговище. Индексният пациент беше насочен за изследване по повод на открита лявокамерна хипертрофия със съмнение за сърдечна амилоидоза. Докладват се данни за двустранен синдром на карпалния канал и полиневропатен синдром. При него се намери комплексен генетичен вариант, представляващ замяна на два съседни нуклеотида в екзон 3 на *TTR* гена (Фигура 1). След провеждане на сегрегационен анализ в семейството се установи, че двете нуклеотидни замени се локализируют върху един алел (c.220_221delGAinsCT) и водят до промяна на отрицателно заредената аминокиселина глутамат с неутралната аминокиселина левцин на 74 позиция от аминокиселинната последователност на транстиретина. Вариантът Glu54Leu е съобщаван при пациенти с ATTRv от Швеция, Белгия и Великобритания¹, но е по-подробно описан само при едно семейство от Швеция². Свързва се с тежко сърдечно и понякога с по-леко неврологично засягане, а възрастта на начало на заболяването е от ранен тип. Измененият генетичен локус засяга D-веригата от β -листовата структура на белтъка³ и нарушава хидрофобни и други слаби взаимодействия, с което се смята за силно амилоидогенен² (Фигура 2).



Фигура 1. Електрофореграма от секвенирането на екзон 3 на *TTR* гена при пациента, носител на варианта *p.Glu74Leu* (*Glu54Leu*). Със стрелки са показани двете съседни нуклеотидни замени.

Налични са данни за поне 5 амилоидогенни патологични варианта в кодон 74 от кодиращата последователност на *TTR* гена⁵. *Glu54Leu* се среща в два генетични варианта, които поради изродяването на генетичния код водят до една и съща аминокиселинна замяна (*c.220_221delGAinsCT* и *c.220_221delGAinsTT*). Вариантът *c.220_221delGAinsTT* е съобщаван веднъж при пациент от Белгия и веднъж при пациент от Шотландия⁶. Тук от особено значение е коректното номенклатурно съобщаване на откриваните нови генетични варианти в научните публикации и базите данни, за да е възможно генетичното и фенотипно проследяване на популациите от пациенти с един и същ генетичен вариант.

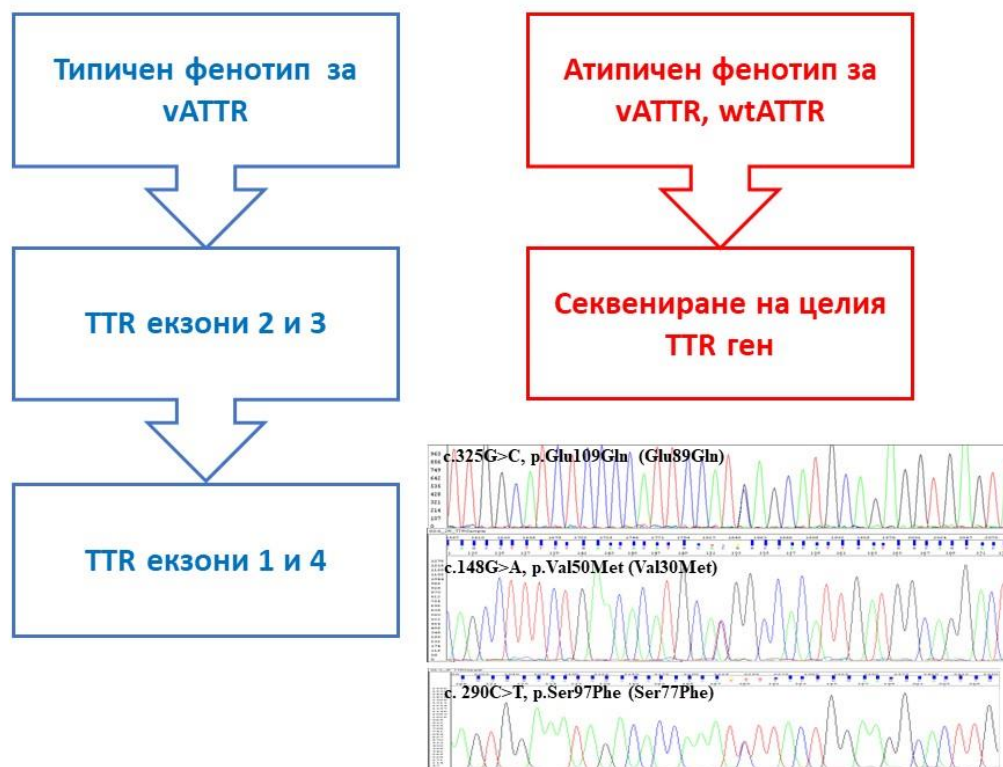
Вариантът *TTR*(NM_000371.4):*c.14G>A*, (*p.Arg5His*) беше първоначално класифициран като вариант с неясно клинично значение, въпреки че до момента не е съобщаван като вариант, директно асоцииран с ATTRv. Според препоръките за класификация на генетичните варианти на Американския Колеж по Медицинска Генетика и Геномика (ACMG)⁷, *TTR* вариантът *c.14G>A*, *p.Arg5His* се класифицира като вероятно непатогенен (доказателствени категории BS2, BP4, PP2). Пациентът, при който се открива вариантът *p.Arg5His* страда от диабет тип II и в следствие бива диагностициран с диабетна сетивно-двигателна полиневропатия. Наличните данни сочат към вероятната липса на амилоидогенна функция на *TTR* варианта *c.14G>A*, *p.Arg5His*, но неговото пълно клинично значение трябва да бъде допълнително верифицирано чрез функционални, клинични и популационни проучвания.



Фигура 2. Белтъчен модел⁴, илюстриращ локализацията на варианта p.Glu74Leu (Glu54Leu) в тетрамерния транстиретин (А) и в увеличение на β -лист от мономерния белтък (Б).

Резултатите от генетичния скрининг при пациенти с предполагаема диагноза ATTRv потвърдиха екзони 2 и 3 на *TTR* гена като гореща точка в България за натрупване на амилоидогенни варианти, водещи до наследствена транстиретинова амилоидоза. Диагностичният алгоритъм за генетично изследване при пациенти със съмнение за транстиретинова амилоидоза беше проверен и обобщен в схемата, показана на Фигура 3.

Информацията за честотата на наличните в България патологични *TTR* варианти беше обновена (Таблица 5). Към момента българският ATTRv генофонд беше допълнен с един нов амилоидогенен вариант Glu54Leu. Въпреки малките размери на *TTR* гена и относително добре проучения механизъм на патогенеза, все още се откриват нови генетични варианти, асоциирани с развитие на ATTRv, както и такива с трудна клинична или фенотипна интерпретация. В допълнение, резултатите от скрининга за безсимптомни носители в засегнатите семейства доказаха значимостта на тези изследвания по отношение на ранната диагностика и лечение на ATTRv.



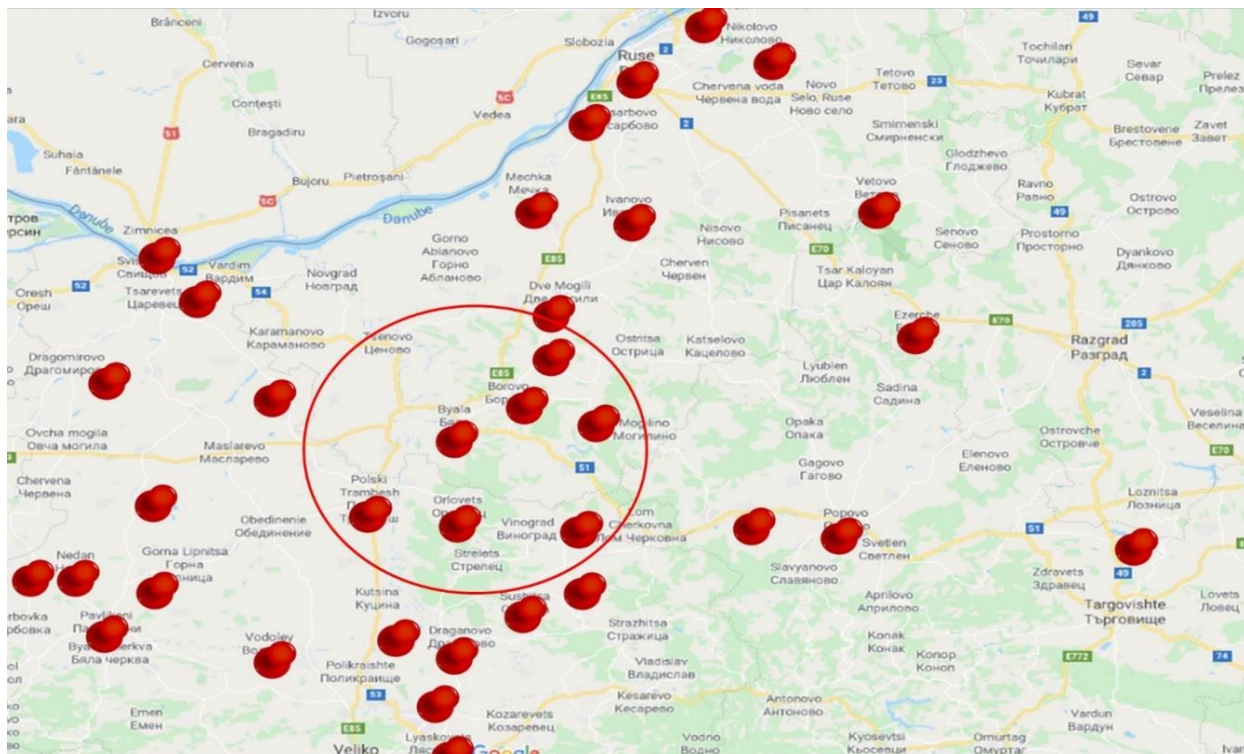
Фигура 3. Алгоритъм за генетично тестване при пациенти със съмнение за транстретинова амилоидоза в България. Показани са електрофореграми от директно секвениране по Sanger при носители на трите най-чести патологични варианти в *TTR* гена за България, локализирани в екзони 2 и 3.

Таблица 5. Обобщение на честотата на откриваните до момента *TTR* патологични варианти в България.

<i>TTR</i> патологичен вариант (NM_000371.3, GRCh37)	Брой носители в България	Честота
c.325G>C; p.Glu109Gln (Glu89Gln)	278	77.22%
c.148G>A, p.Val50Met, (Val30Met)	39	10.83%
c.290C>T, p.Ser97Phe (Ser77Phe)	29	8.06%
Двоен хетерозиготен носител c.148G>A, p.Val50Met, (Val30Met) + c.325G>C; p.Glu109Gln (Glu89Gln)	1	0.28%
c.200G>A; p.Gly67Glu (Gly47Glu)	7	1.94%
c.214T>C, p.Ser72Pro (Ser52Pro)	2	0.56%
c.220_221delGAinsCT, p.Glu74Leu (Glu54Leu)	4	1.11%
Общ брой носители	360	

3.1.2. Скрининг при новородени за определяне честотата на носителство на *TTR* варианта Gly47Glu

Тъй като хипотезата за наличие на ендемичен регион за *TTR* варианта Gly47Glu беше приета като възможна, се премина към изследване на честотата на носителство на този генетичен вариант сред Ромското етническо население от района на произход на двете доказани семейства. За целта бяха подбрани 100 филтърни бланка на новородени от региона на град Полски Тръмбеш и град Русе (Фигура 4). Резултатите при всички изследвани проби бяха отрицателни за патологични варианти в екзон 2 на *TTR* гена. Освен Gly47Glu, не беше открит и най-честият за този екзон *TTR* патологичен вариант Val30Met. Поради това беше отхвърлена хипотезата за ендемичност на Gly47Glu в изследвания регион на България.



Фигура 4. Географско разпределение на филтърните бланки, изследвани за носителство на варианта Gly47Glu. Двете доказани ATRV семейства с този вариант са от района на град Полски Тръмбеш с настояща популация 13 000 души (показан с червен кръг).

Резултатите от това скринингово изследване показаха, че вариантът Gly47Glu най-вероятно се е появил в резултат на скорошно единично спорадично събитие и двете открити засегнати семейства най-вероятно са близкородствени. Съществуват още 4 различни амилоидогенни замени в кодон 47 от кодиращата последователност на *TTR* гена, което отново прави този локус мутационна гореща точка⁵. Вариантът Gly47Glu до момента е бил съобщаван при отделни случаи на пациенти от Италия, Германия, Турция и др., без да има данни за наличие на ендемичност или ефект на родоначалника в тези популации^{8(p47),9(p47),10}.

3.2. Анализ на регулаторни генетични полиморфизми с потенциален ефект върху клиничната изява на заболяването

За анализ на генетични полиморфизми с потенциален ефект върху клиничната изява на наследствената транстиретинова амилоидоза в Българската популация бяха подбрани 14 единични нуклеотидни полиморфизма, които бяха генотипизирани при 124 ДНК проби на пациенти, носители на *TTR* варианта Glu89Gln. Данните от директното секвениране на тези генетични варианти бяха използвани за изчисление на алелните честоти в избраната Glu89Gln кохорта. Резултатите бяха сравнени с наличната информация за честотата на генетичните варианти в Европейската популация от базата данни GnomAD v.2.1.1¹¹ (Таблица 6). Сравнението показва, че честотата на тези варианти в изследваната пациентска група до голяма степен съвпада с общите данни за Европейската популация.

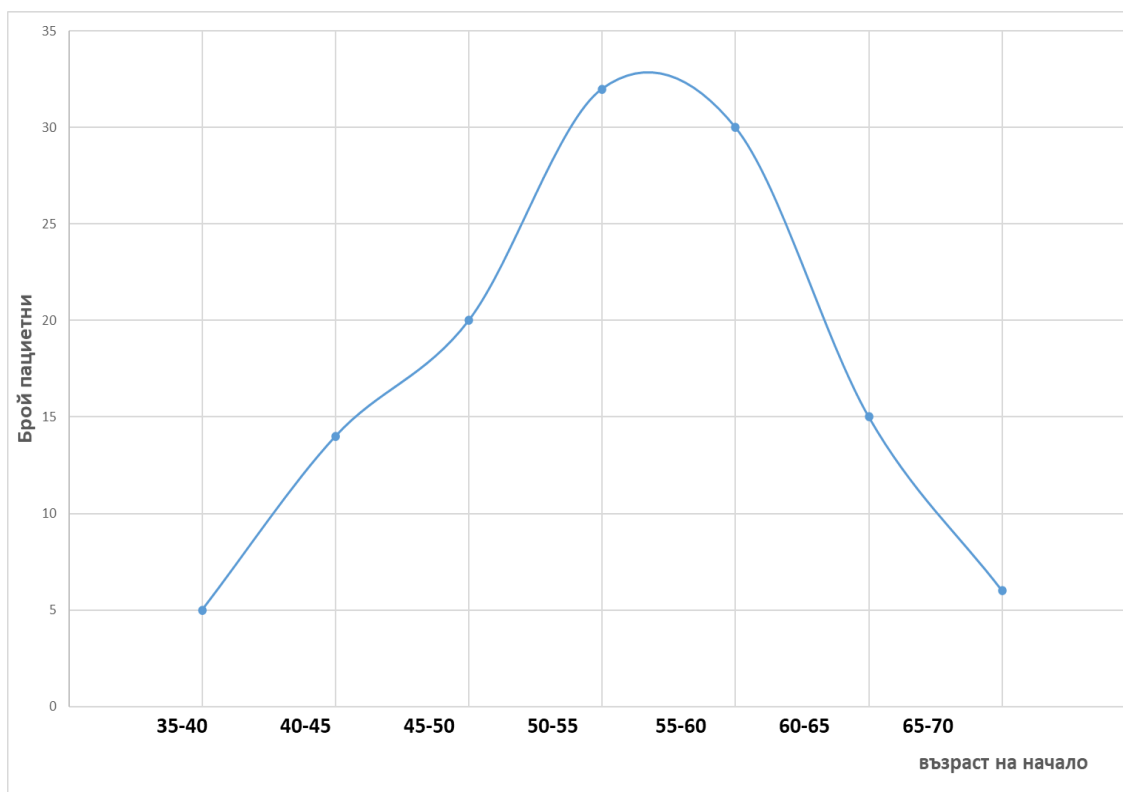
Таблица 6. Алелна честота на изследваните генетични полиморфизми при ATTRv пациентите с Glu89Gln в България. Честотите са сравнени с общи данни за Европейската популация.

Полиморфизъм	Европейци gnomAD v2.1.1				Glu89Gln България			
	Алел	Честота	Алел	Честота	Алел	Честота	Алел	Честота
rs875119	T:	0.949	C:	0.051	T:	0.984	C:	0.016
rs3764478	G:	0.888	T:	0.112	G:	0.863	T:	0.137
rs1800458	G:	0.926	A:	0.074	G:	0.927	A:	0.073
rs72922947	G:	0.986	A:	0.014	G:	1.000	A:	0.000
rs7235277	G:	0.673	C:	0.327	G:	0.642	C:	0.358
rs62093482	C:	0.972	T:	0.028	C:	0.984	T:	0.016
rs1791228	C:	0.536	T:	0.464	C:	0.540	T:	0.460
rs4799586	T:	0.955	C:	0.045	T:	0.984	C:	0.016
rs1667245	C:	0.999	G:	0.001	C:	1.000	G:	0.000
rs35197841	TAGTAG:	0.999	TAG:	0.001	TAGTAG:	0.978	TAG:	0.022
rs76184052	T:	1.000	C:	0.000	T:	1.000	C:	0.000
rs72922938	C:	0.983	T:	0.017	C:	1.000	T:	0.000
rs723744	G:	0.671	T:	0.329	G:	0.511	T:	0.489
rs1080093	C:	0.625	G:	0.375	C:	0.556	G:	0.444

След това беше проведен анализ за корелация между генотипа на пациентите по отношение на изследваните полиморфизми и клиничната изява на ATTRv. Клиничната изява беше анализирана по отношение на два параметъра – възраст на начало на заболяването и първоначално системно засягане.

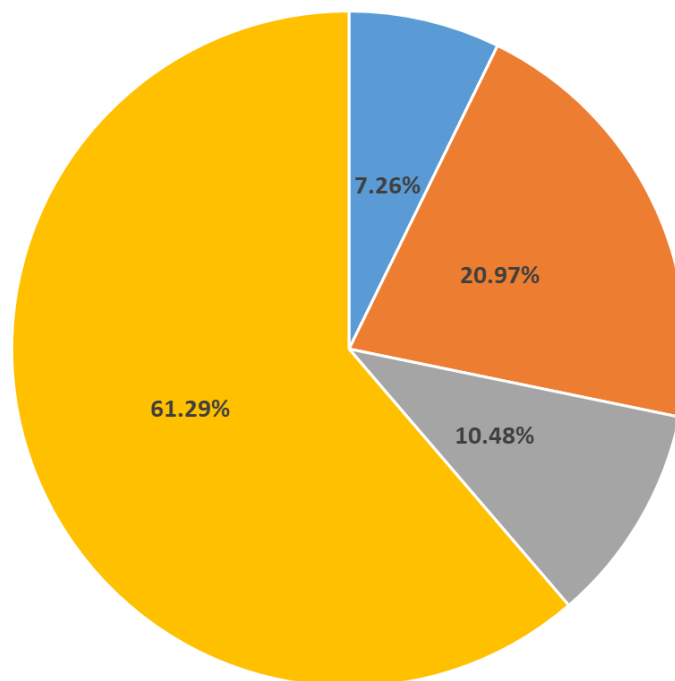
Проведеният статистически анализ целеше проучване на възможен модифициращ болестта ефект на някои генетични полиморфизми, чийто ефект вече е бил проучван в други ATTRv популации^{12,13}. За целта беше необходимо провеждането на т.нар. стратификация на пациентската група спрямо изследваните параметри (възраст на начало и първоначално системно засягане). Поради това, преди статистическата обработка на генетичните резултати беше проведено характеризиране на изследваната група от пациенти по отношение на изследваните фенотипни характеристики. Първоначално беше

направена оценка на разпределението на пациентите спрямо възрастта на начало на заболяването (Фигура 5). За целта условно пациентите бяха разделени в следните възрастови групи: 35-40 год., 40-45 год., 45-50 год., 50-55 год., 55-60 год., 60-65 год., 65-70 год. Резултатите показаха, че над 50% от пациентите попадат във възрастовия диапазон на начало 50-60 годишна възраст, което обуславя най-висока вероятност пациент с Glu89Gln да развие заболяването си именно в този възрастов диапазон. Въпреки това, от голям интерес са малкият брой пациенти, попадащи в екстремумите на възрастовата крива на нормално разпределение. По литературни данни от проучвания основно върху Val30Met пациенти, възрастта на начало на заболяването най-често се определя като ранна (под 40 години) и късна (над 50 години)¹⁴. Поради спецификата на възрастовото разпределение, която се наблюдава при българските Glu89Gln пациенти, за целите на последващия статистически анализ групата беше допълнително разделена на пациенти с ранно (под 45 годишна възраст), средно (45-55 годишна възраст) и късно начало (над 55 годишна възраст). Съобщаваната разлика във възрастта на начало спрямо пола на пациента не беше взета предвид в настоящото проучване.



Фигура 5. Разпределение на ATTRv пациентните с Glu89Gln спрямо възрастта на начало на заболяването.

По отношение на първоначалното системно засягане, пациентите бяха разделени в групи, в зависимост от това дали началната симптоматика е била свързана с нарушение на периферната нервна система, сърце, гастроинтестинален тракт или смесено засягане (Фигура 6). Най-честият първоначален симптом е свързан с развитието на полиневропатия, докато сърдечното и гастроинтестинално презентирание на заболяването се среща при по-малък процент от Glu89Gln пациентите¹⁵.



■ Смесен тип ■ Сърдечно засягане ■ Гастроинтестинален тракт ■ Периферна нервна система

Фигура 6. Първоначално системно засягане при Glu89Gln ATTRv пациентите.

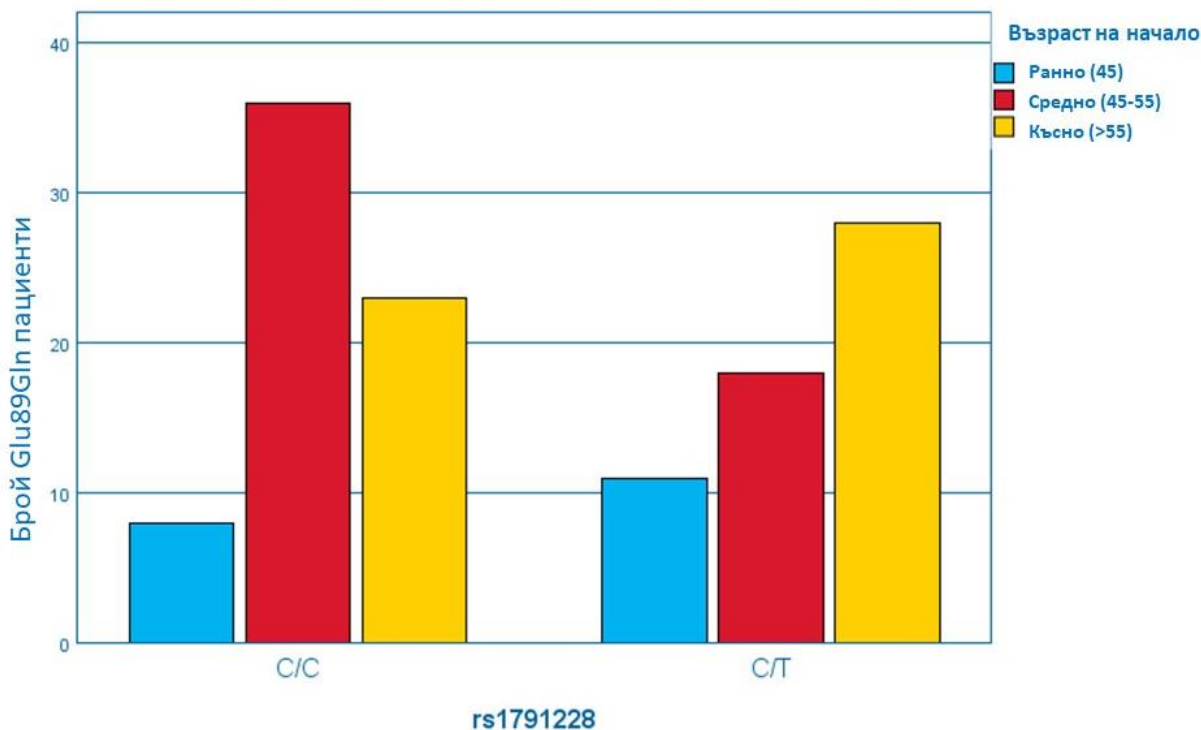
Корелацията между носителство на даден алел на генетичен полиморфизъм и клиничната изява на ATTRv (възраст на начало на заболяването и системно засягане) беше изследвана чрез Хи-квадрат тест на Пиърсън (Таблица 7). Статистически значима корелация беше изчислена единствено за полиморфизма rs1791228 по отношение на възрастта на начало на заболяването при алфа ниво на значимост 0.05.

Таблица 7. Резултати от Хи-квадрат тест за корелация между изследваните генетични полиморфизми и възрастта на начало и системното засягане при Glu89Gln ATTRv пациенти. Маркирани с червен цвят са резултатите, удовлетворяващи алфа ниво на значимост 0.05.

rs ID	rs875119	rs3764478	rs1800458	rs7235277	rs62093482
Възраст на начало (p-стойност)	0.268	0.399	0.405	0.223	0.268
Първоначално системно засягане (p-стойност)	0.122	0.768	0.874	0.837	0.733
rs ID	rs1791228	rs4799586	rs35197841	rs723744	rs1080093
Възраст на начало (p-стойност)	0.045	0.268	0.464	0.398	0.809
Първоначално системно засягане (p-стойност)	0.388	0.122	0.733	0.231	0.668

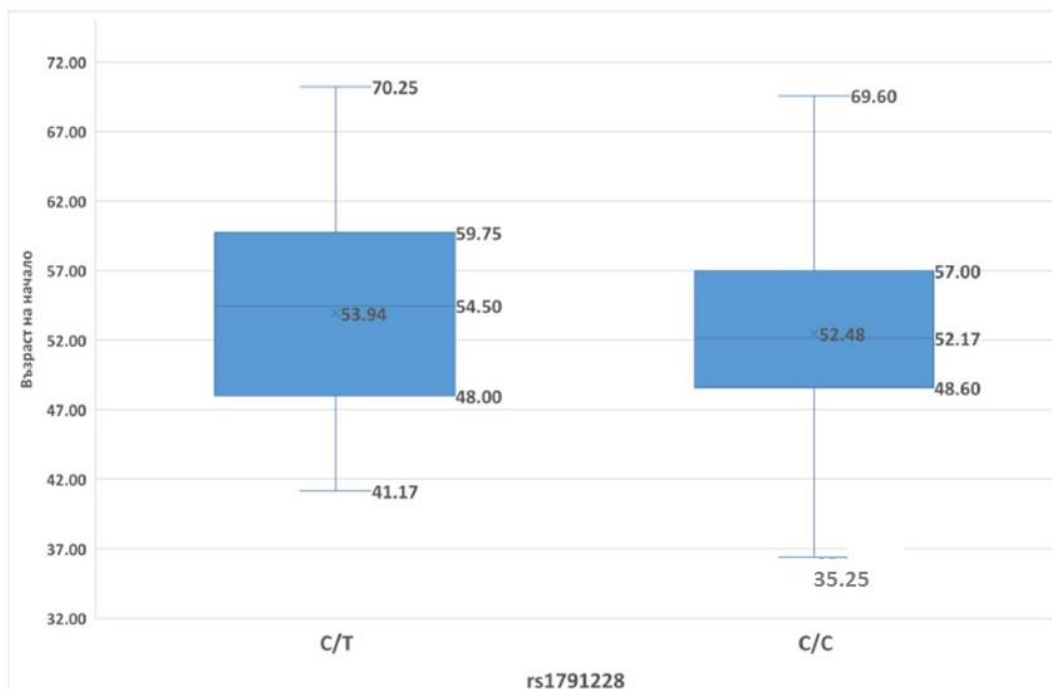
Хипотезата, която може да бъде предложена на база на тези резултати е, че пациентите, които са хетерозиготни носители на алел Т на варианта rs1791228 е по-

вероятно да развият заболяването в по-късна възраст в сравнение с хомозиготните носители на алел С (Фигура 7). Не бяха открити хомозиготни носители на алел Т.

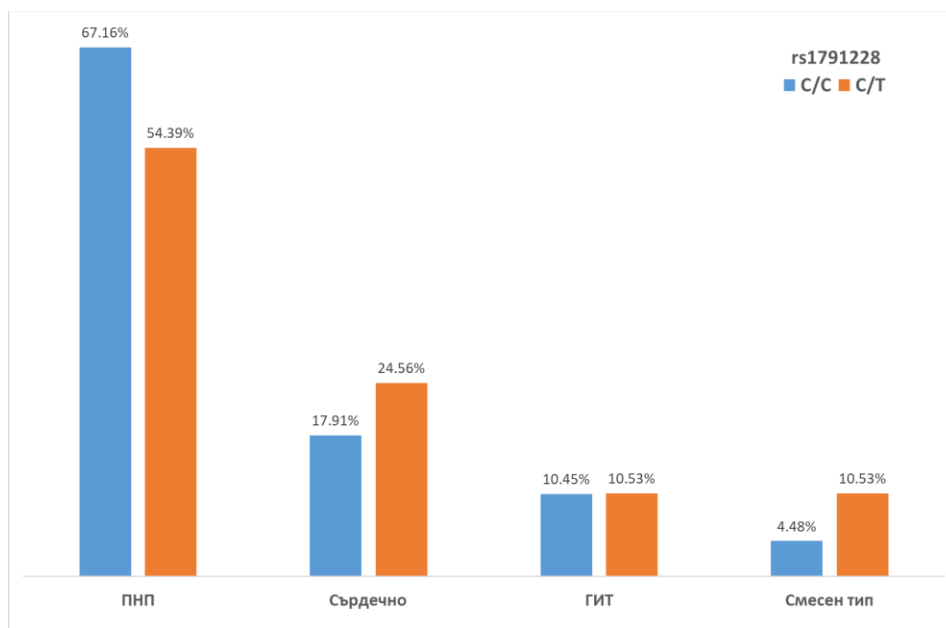


Фигура 7. Разпределение на Glu89Gln пациентите спрямо възрастта на начало на заболяването и rs1791228 генотипа.

Поради предложената хипотеза се премина към по-подробно разглеждане на пациентите, носители на rs1791228. Детайлният анализ показва, че средната възраст на начало на заболяването при носителите на алел Т (54.50) е с около две години по-висока от тези, които носят хомозиготен генотип С/С (52.17). От Фигура 8 се вижда, че групата на хомозиготните носители на по-честия С алел може да достигне до много по-ранно начало на заболяването в сравнение с групата с генотип С/Т. Въпреки това, над половината от индивидите в двете генотипни групи показват възраст на начало в диапазона 48 – 57 (СС) и 48 – 59 (СТ) годишна възраст. Вероятно по-голям брой пациенти в групата на пациенти с ранна изява на болестта (под 45 годишна възраст) би внесъл корекции в изчислената статистическа вероятност. Въпреки, че статистическият тест не показва наличие на корелация между rs1791228 генотипа и първоначалното системно засягане, беше направен допълнителен анализ на пациентите и по отношение на тази хипотеза (Фигура 9). Наблюдава се сравнително повишение на процента хетерозиготни С/Т пациенти в групата с първоначално сърдечно и първоначално смесено засягане.



Фигура 8. Графика на численото разпределение и средната възраст на начало при двете rs1791228 генотипни групи – C/C и C/T. Минималната възраст на начало при хетерозиготните носители е 41.17, докато минималната възраст при хомозиготните C/C индивиди е 35.25. Въпреки това, средната възраст при двете групи се различава само с две години.



Фигура 9. Графика на численото разпределение и първоначалното системно засягане при двете rs1791228 генотипни групи – C/C и C/T. Хетерозиготните носители на алел Т показват тенденция към първоначално сърдечно или смесено засягане спрямо хомозиготните носители на по-честия алел С. ПНП - полиневропатия, ГИТ -гастроинтестинален тракт.

Полиморфизмът rs1791228 вече е съобщаван в корелация с възрастта на начало на заболяването при португалски пациенти с Val30Met¹⁶. Това е некодиращ вариант, локализиран *down stream* от *TTR* гена, който е възможен транскрипционен регулатор. *In silico* анализи показват възможната сплайсинг роля на този генетичен вариант чрез активиране на точка на разклоняване („*branch point*“), която е неактивна в дивия тип секвенция¹⁶. Друг предложен регулаторен механизъм на rs1791228 е нарушаването на свързващо място за транскрипционния фактор TEAD1(Фигура 10)^{17,18}. TEAD1 има роля в регулацията на тъканно специфичната генна експресия в кардиомиоцитите чрез транскрипционна активация на гените за сърдечно-мускулния тропонин Т, скелетно-мускулния актин и тежките вериги на миозина^{19(p1)}. Изследваният генетичен вариант rs1791228 е докладван във възможен хаплотип с патологичната замяна Val122Ile, която се характеризира с предимно сърдечно засягане¹⁷. Тези данни съвпадат с наблюдаваните корелации в българската Glu89Gln кохорта, но статистическата или математическа зависимост не е достатъчна за абсолютно определяне на клиничния фенотип на ATTRv. Съвкупността от генетични маркери с различна функционална тежест и значимост, в комбинация с епигенетични фактори най-вероятно са в основата на наблюдаваната клинична хетерогенност, която остава да бъде проучвана в бъдещи изследвания.

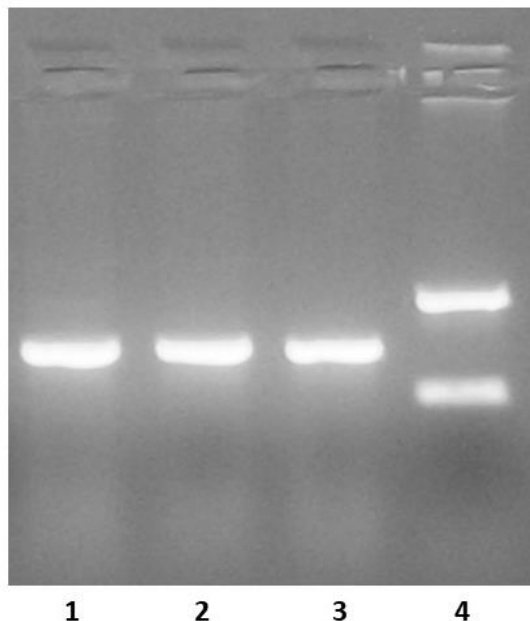


Фигура 10. Схема на свързващите места на транскрипционни фактори, потенциално нарушаващи се от Т алела на полиморфизма rs1791228. Източник: *RegulomeDB v2.0.3*²⁰.

3.3. Анализ на генната експресия на транстиретина

Предложената методология за анализ на генната експресия първоначално беше тествана върху РНК проба изолирана от чернодробна тъкан с очаквана висока експресия на транстиретин. Резултатите от оптимизирането на полимеразната верижна реакция

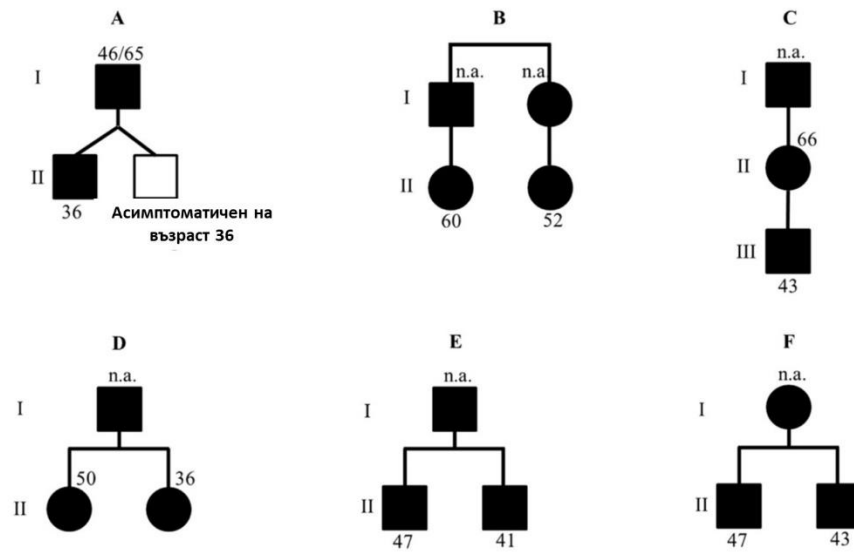
показаха намножаване на кДНК фрагмент с предвидената дължина от 290 базови двойки (Фигура 11), който чрез директно секвениране по Sanger беше потвърден транстиретинов иРНК транскрипт. Последващия анализ върху пациентските проби от кръв и урина беше проведен чрез използване на оптимизирания PCR протокол с температура на хибридизация на праймерите от 62°C.



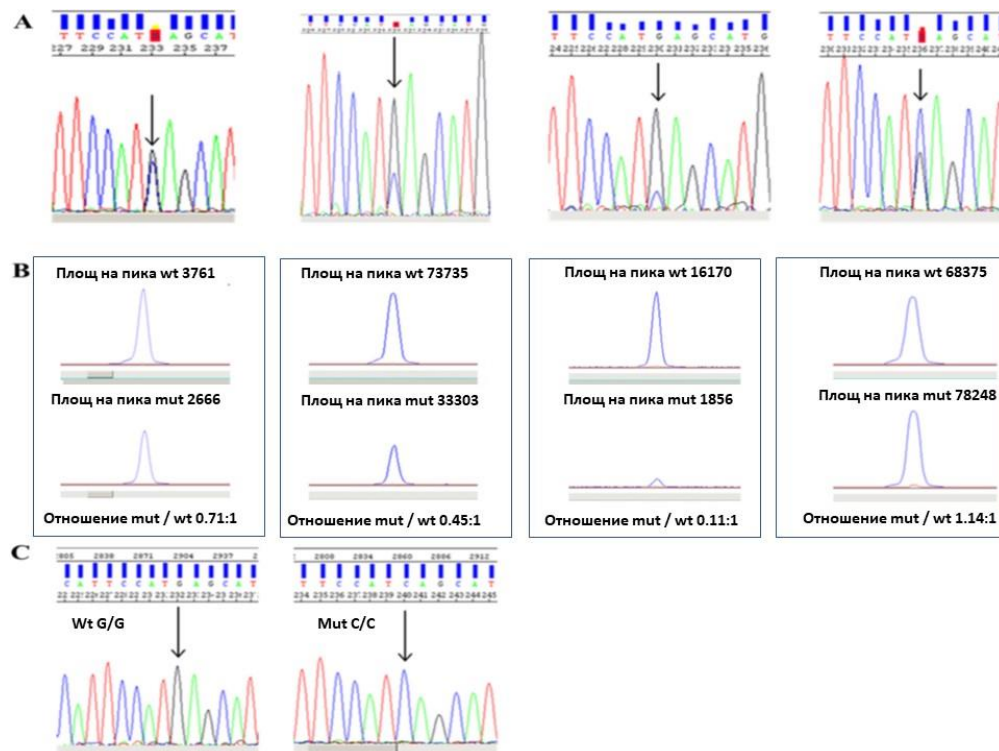
Фигура 11. Агарозна електрофореза на кДНК фрагменти на транстиретиновия транскрипт от PCR оптимизацията върху контролна РНК проба, изолирана от черен дроб. Ивици от 1 до 3 представляват кДНК фрагменти намножени с праймери, които комплементират с краищата на съседни *TTR* екзони чрез различна температура на хибридизация на праймерите: 1 - 58°C, 2 - 60°C, 3 - 62°C. Ивица 4 съдържа два контролни ДНК фрагмента с дължина 175 и 421 базови двойки, използвани за сравнително оразмеряване.

След това се премина към транскрипционен анализ на пациентските проби от кръв и урина. Бяха анализирани проби от 19 Glu89Gln пациента от 6 семейства, чиито родословия са показани на Фигура 12.

Анализът на резултатите от директното секвениране показва смесен транскрипционен профил на мутантен и див тип алел в различни съотношения (Фигура 13). Сравнителният анализ на профилите, получени от кръвна плазма и урина показва, че в двата типа проби се наблюдава сходен дял на експресия на мутантния алел (около 40%). За изчисление на относителното количествено съотношение между двата алелни варианта беше използван фрагментен анализ на алел-специфични кДНК фрагменти. За нормализация при всяка проба беше използвана за 1 единица площта на дивия тип алел. Резултатите показаха вариация на количеството мутантен транскрипт в диапазона 0.11 – 1.14 единици, което корелира с първоначалните данни от секвенционните електрофореграми.

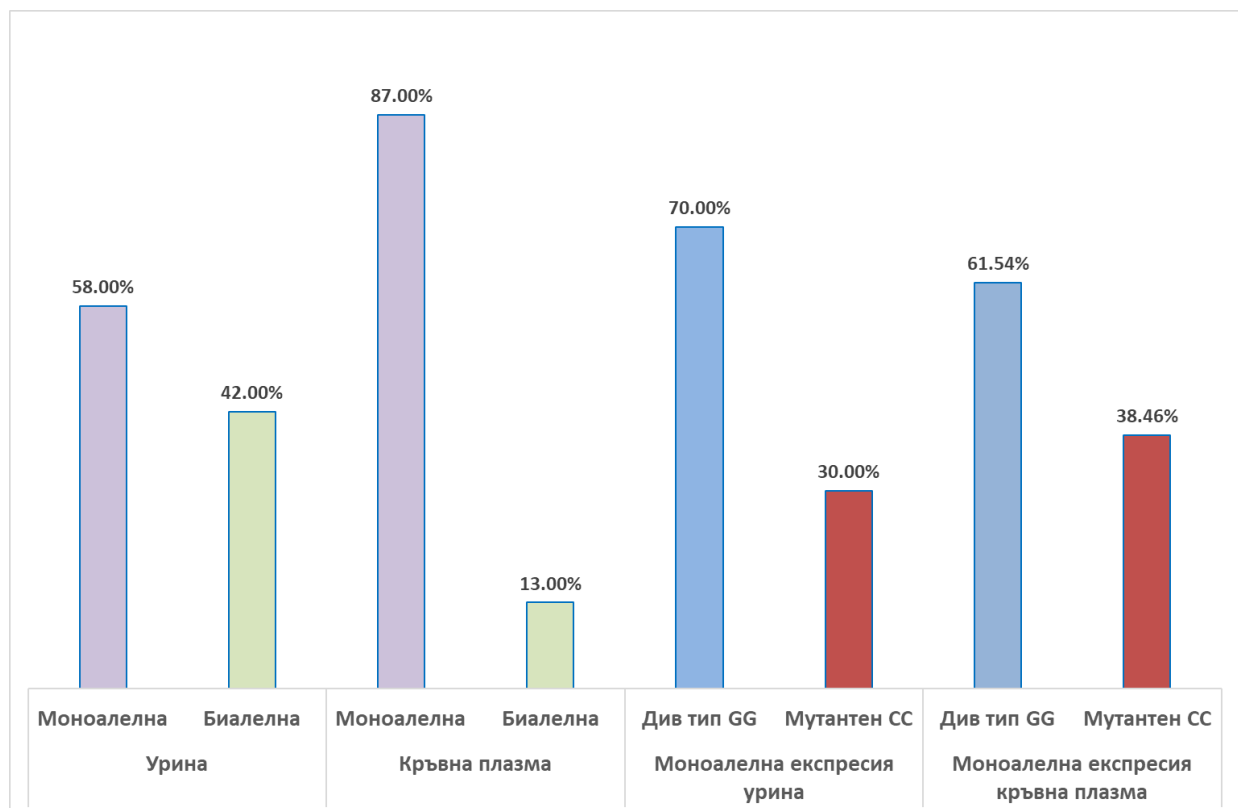


Фигура 12. Родословия на Glu89Gln ATTRv семействата, включени в изследването на транстретиновата експресия. С римски цифри са означени поколенията, а с арабски цифри е означена възрастта на начало на заболяването. “n.a.” обозначава липсата на налична информация относно възрастта на начало на заболяването при някои от пациентите.



Фигура 13. Експресия на транстретина при някои от изследваните проби. **А.** Секвенционни електрофореграми от директно секвениране по Sanger на кДНК фрагментите. **В.** Относителен количествен анализ на дивия тип алел (wt) и мутантния (mut) алел в същите изследвани проби. **С.** Проби, показващи 100% моноалелна експресия.

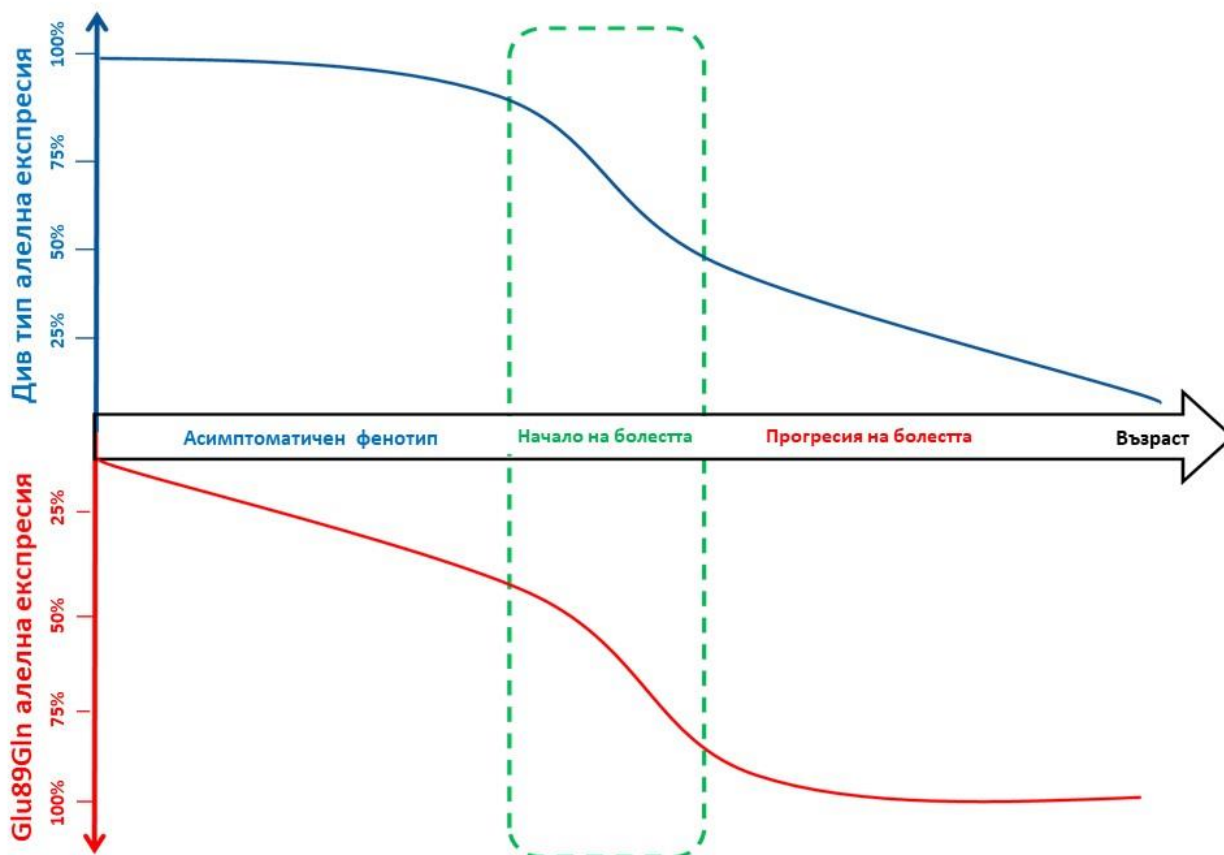
Изненадващо беше наличието на моноалелни транскрипционни профили, както в кръвни проби, така и в проби от урина. Обобщените резултати показаха 87% моноалелен профил при пробите от кръвна плазма срещу 13% биалелна експресия. За пробите от урина резултатите показаха 58% моноалелна срещу 42% биалелна експресия (Фигура 14). При някои пациенти беше докладван тъканно специфичен тип на транстиретинова експресия (моноалелна експресия в урина срещу биалелна експресия в плазма и обратното). Пробите от кръвна плазма показаха наличие на по-висок процент моноалелна експресия на мутантния алел в сравнение с пробите от урина.



Фигура 14. Резултати от анализа на алел-специфичната транстиретинова генна експресия в изследваните проби.

От огромен интерес бяха резултатите на семейството с двама монозиготни близка, носители на Glu89Gln. В това семейство се наблюдава разлика във възрастта на начало на заболяването от над 10 години. Бащата е бил опериран от карпал тунел синдром първоначално в дясно на възраст 46 години и след това в ляво на 50 годишна възраст. На 58 годишна възраст преживява исхемичен инсулт, а на 64 години е открита и лявокамерна хипертрофия на сърцето. За разлика от него, единият от двамата му синове проявява симптоми на транстиретинова амилоидоза още на 35 годишна възраст (с 11 години по-рано). Неговите симптоми започват отново с двустранен карпал тунел синдром и в последствие се развива полиневропатен синдром. На 42 годишна възраст е диагностициран и с рестриктивна кардиомиопатия. Неговият брат близък е асимптоматичен до 46 годишна възраст, когато започват леки неврологични оплаквания в областта на горните крайници. И при двамата братя са взети два пъти проби за транскрипционен анализ в рамките на една година. При пациента с по-ранно начало на заболяването още при първоначалното изследване на транстиретиновата експресия се

наблюдава наличие на биалелен профил в урина и див тип моноалелен профил в кръв, докато при пациента с по-късна изява първоначално и двете изследвани проби (кръв и урина) показват моноалелна експресия на дивия тип транскрипт. Повторното изследване при двамата братя вече показва наличие на експресия на мутантния алел и при двамата братя. На базата на тези резултати предлагаме хипотетичен експресионен механизъм, който включва възраст-зависима алел-специфична транскриптивна експресия: преобладаваща експресия на дивия тип белтък в по-ранна възраст, която постепенно превключва към експресия на мутантния алел с напредване на възрастта (Фигура 15).



Фигура 15. Хипотетичен модел на възраст-зависима алел-специфична експресия на *TTR* гена при пациенти с Glu89Gln.

Моноалелната експресия би могла да бъде обяснена със зависимост от пола на засегнатия родител, т.е. чрез наличието на генен импринтинг. Друг известен механизъм е случайната моноалелна експресия, която възниква в резултат на случайна инактивация на единия хомоложен алел в клетката²¹. Поради наличието на биалелна експресия и малкия брой изследвани пациенти, не може да се направи крайно заключение относно механизма на генна експресия на транскриптивния ген.

Наличието на междуфамилни и вътрефамилни разлики в клиничната изява на различни автозомно-доминантни генетични заболявания, включително и наследствената транскриптивна амилоидоза е обект на проучване по отношение на молекулните механизми, които стоят зад наблюдавания фенотип²². Съществуват множество проучвания

върху наличието на епигенетични молекулни промени свързани със стареенето, в т.ч. метилиране на регулаторни участъци от генома, хистонови модификации и др., които от своя страна могат да доведат до използване на алтернативни промотори и пространствена реорганизация на хроматина с течение на времето²³. Тези т.нар. епигенетични „часовници“²⁴ биха могли да са в основата на наблюдаваните различия в транскрипционните профили на изследваните Glu89Gln ATTRv пациенти, при които превключването между моно- и би-алелна транстиретинова експресия хипотетично може да има отношение към изявата и прогресията на заболяването.

Резултатите от нашите пациенти показаха наличие на динамично променлива във времето моноалелна и биалелна експресия, което насочва към по-сложен механизъм на тъканно-специфична генна транскрипция, който вероятно се определя от набор от генетични и епигенетични фактори. Изследването на монозиготни близнаци е изключително ценно при анализ на подобни биологични процеси²⁵. Въпреки предложения хипотетичен модел на възраст-зависима алел-специфична транстиретинова експресия, доказателствената връзка между конкретния алелен тип на транстиретинова експресия и наличието на специфичен болестен фенотип за момента остава неясна. Вероятно е необходимо проследяване на по-голяма извадка от пациенти още от стадий асимптомнен носител до проява на първите клинични оплаквания с последващ прогрес на заболяването, за да може да се изследва по-точно експресионната хипотеза. Въпреки това, наблюдаваните резултати поставят обещаваща основа за изясняване на клиничната проява на транстиретиновата амилоидоза в контекста на най-честия за България ендемичен *TTR* генетичен вариант Glu89Gln.

3.4. Хаплотипен анализ за определяне ефект на родоначалника

3.4.1. Микросателитен фрагментен анализ

Микросателитните маркери в региона на *TTR* гена бяха успешно намножени и анализирани чрез фрагментен анализ при всички 205 изследвани ДНК проби на семейства с носителство на четирите най-чести патологични варианта в България, както и при контролните ДНК проби. След получаване на данни за алелите на маркерите при всяка проба беше проведен анализ на степента на хетерозиготност в изследваната популация (Фигура 16). Резултатите показват, че за пет от шестте маркера над половината от индивидите носят хетерозиготен генотип. Това означава, че избраните маркери могат да бъдат използвани за статистически анализ и са подходящи за проследяване на унаследяването на *TTR* вариантите в нашата популация.

Бяха анализирани алелните честоти на микросателитните маркери в подгрупите на ATTRv пациентите, носещи всеки от четирите *TTR* патологични варианта (Glu89Gln, Val30Met, Ser77Phe, Gly47Glu). Най-честите алели бяха наречени алели на хипотетичен хаплотип на родоначалника и техните честоти бяха сравнени в подгрупите на нормалните роднини и контролната група (Таблица 8). Резултатите показаха, че тези алели се срещат преимуществено в групата на ATTRv пациентите. Наличието на ефект на родоначалника обикновено води до неравновесна скаченост (*linkage disequilibrium*) между алелите на определени локуси, унаследени от родоначалния индивид. Този ефект би обяснил разликата между наблюдаваните алелни честоти и честотите, които биха били очаквани при наличие на случайна алелна асоциация (равновесие на Харди-Вайнберг²⁶).



Фигура 16. Процентна хетерозиготност на избраните микросателитни маркери в изследваната популация. Процентната хетерозиготност на маркер L4 е малко по-ниска от 50% (46.19%), поради което беше решено този маркер да не се изключва от изследването.

Таблица 8. Честота на алелите на хипотетичния хаплотип на родоначалника за *TTR* вариантите *Glu89Gln*, *Val30Met*, *Ser77Phe* и *Gly47Glu*.

	<i>D18S49</i>	<i>L1</i>	<i>L4</i>	<i>L8</i>	<i>L9</i>	<i>D18S47</i>
Glu89Gln	<i>115 bp</i>	<i>245bp</i>	<i>267bp</i>	<i>292bp</i>	<i>324bp</i>	<i>202bp</i>
<i>Glu89Gln</i> пациенти (<i>N</i> =36)	0.50	0.32	0.72	0.50	0.40	0.39
Здрави роднини (<i>N</i> =31)	0.08	0.00	0.48	0.25	0.21	0.29
Контролна група (<i>N</i> =40)	0.01	0.03	0.00	0.19	0.08	0.01
Val30Met	<i>D18S49</i>	<i>L1</i>	<i>L4</i>	<i>L8</i>	<i>L9</i>	<i>D18S47</i>
	<i>104 bp</i>	<i>242bp</i>	<i>262bp</i>	<i>291bp</i>	<i>323bp</i>	<i>198bp</i>
<i>Val30Met</i> пациенти (<i>N</i> =26)	0.35	0.48	0.58	0.46	0.40	0.56
Здрави роднини (<i>N</i> =15)	0.30	0.10	0.57	0.43	0.27	0.67
Контролна група (<i>N</i> =40)	0.10	0.10	0.34	0.34	0.14	0.46
Ser77Phe	<i>D18S49</i>	<i>L1</i>	<i>L4</i>	<i>L8</i>	<i>L9</i>	<i>D18S47</i>
	<i>107bp</i>	<i>244bp</i>	<i>264bp</i>	<i>291bp</i>	<i>323bp</i>	<i>198 bp</i>
<i>Ser77Phe</i> пациенти (<i>N</i> =25)	0.52	0.28	0.88	0.56	0.48	0.78
Здрави роднини (<i>N</i> =18)	0.08	0.17	0.78	0.47	0.33	0.50
Контролна група (<i>N</i> =40)	0.35	0.03	0.46	0.34	0.14	0.46
Gly47Glu	<i>D18S49</i>	<i>L1</i>	<i>L4</i>	<i>L8</i>	<i>L9</i>	<i>D18S47</i>
	<i>104bp</i>	<i>242bp</i>	<i>262bp</i>	<i>295bp</i>	<i>307bp</i>	<i>202 bp</i>
<i>Gly47Glu</i> пациенти (<i>N</i> =6)	0.67	0.58	0.58	0.50	0.25	0.67
Здрави роднини (<i>N</i> =8)	0.44	0.13	0.44	0.06	0.06	0.13
Контролна група (<i>N</i> =40)	0.10	0.10	0.34	0.06	0.00	0.43

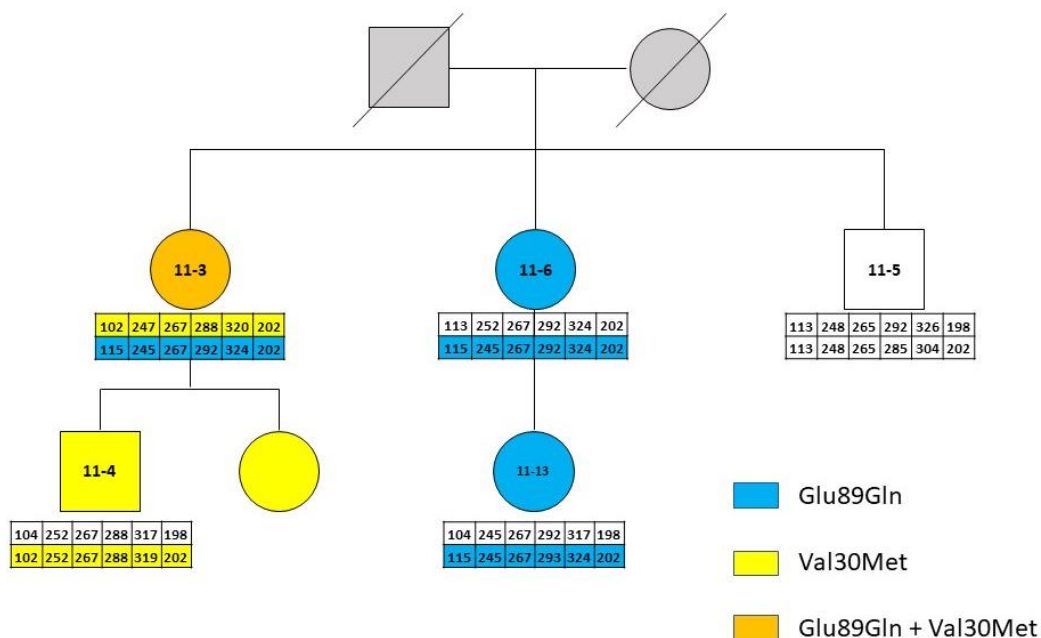
3.4.2. Реконструкция на хаплотипа

На базата на резултатите от проведеня фрагментен анализ беше извършена теоретична реконструкция на хаплотипа на всеки от индивидите в подгрупите пациенти, здрави роднини и контроли чрез ELB алгоритъма на програмата Arlequin v.3.01. Беше доказано, че най-честите математически реконструирани хаплотипове за ATTRv пациентите се състоят от алелите на хипотетичния хаплотип на родоначалника и тези хаплотипове отново се срещат предимно само в групата на пациентите. Резултатите са обобщени в Таблица 9.

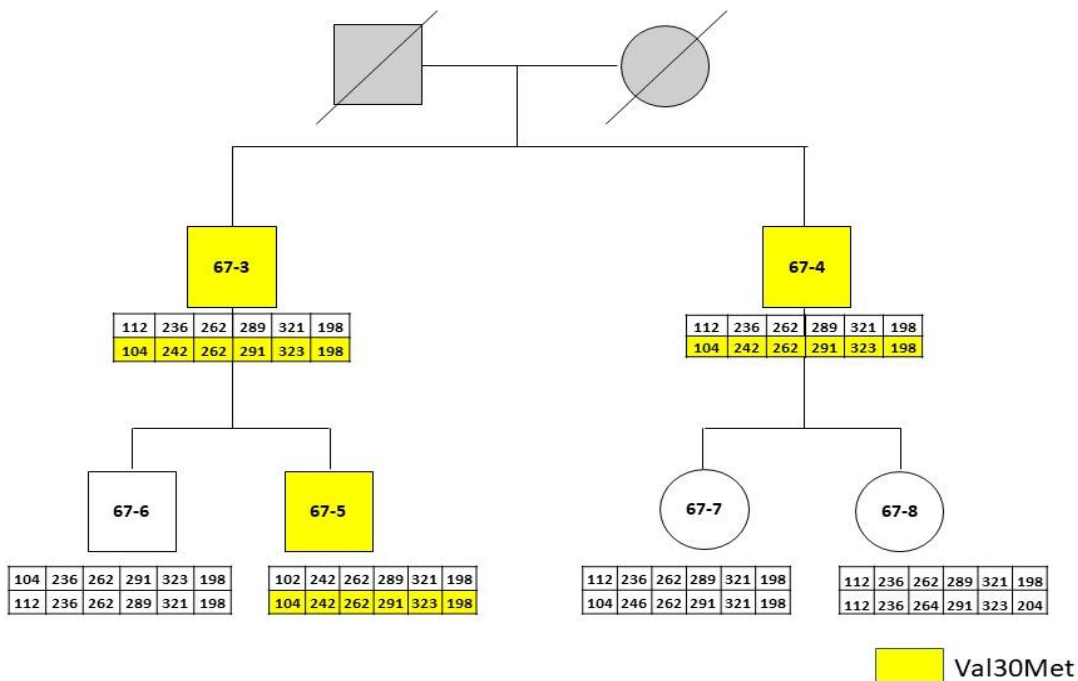
Таблица 9. Най-чести хаплотипове за изследваните TTR варианти Glu89Gln, Val30Met, Ser77Phe и Gly47Glu в изследваните ATTRv семейства.

D18S49	L1	L4	TTR патологичен вариант	L8	L9	D18S47	ATTRv пациенти	Здрави роднини
115	245	267	<i>Glu89Gln</i>	292	324	202	37%	0%
104	242	262	<i>Val30Met</i>	291	323	198	27%	0%
107	244	264	<i>Ser77Phe</i>	291	323	198	23%	0%
104	242	262	<i>Gly47Glu</i>	295	307	202	21%	7%

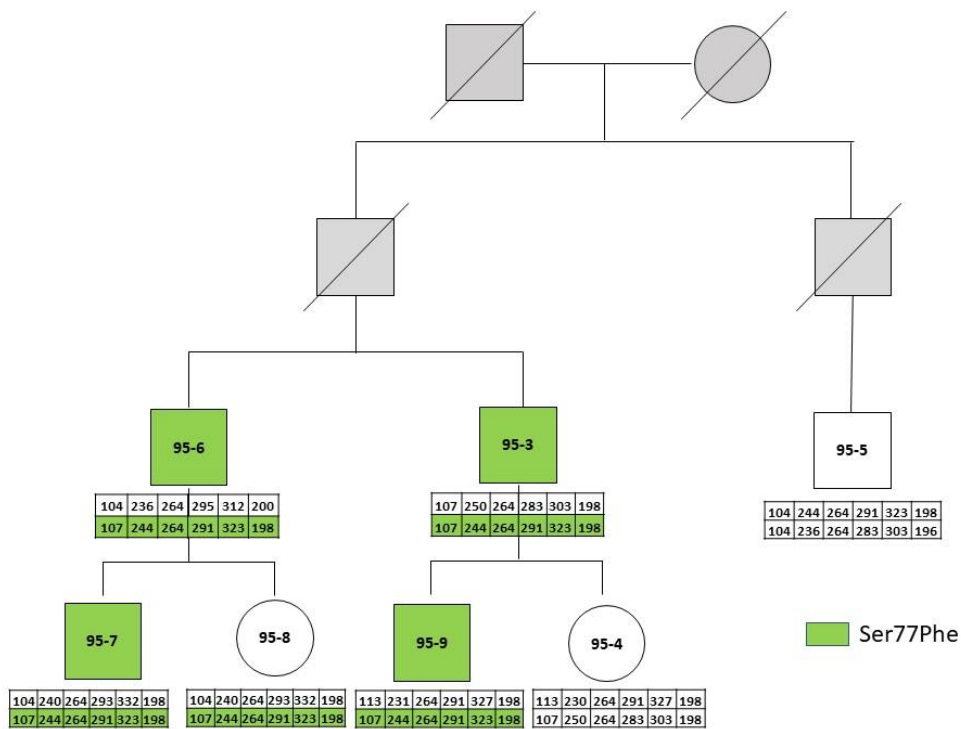
На Фигури 17, 18 и 19 са подбрани родословията на някои от изследваните семейства за демонстрация на унаследяването на реконструирани хаплотипове в поколението и зависимостта от носителството на конкретен TTR патологичен вариант. От особен интерес е семейството, при което е отрит двойният хетерозиготен носител Glu89Gln / Val30Met. Забелязва се, че скаченият с Val30Met алела хаплотип в това семейство е претърпял разпад в сравнение с теоретичния хаплотип на родоначалника, определен спрямо всички Val30Met носители.



Фигура 17. Родословно дърво и унаследяване на хаплотипа при семейство с носителство на Glu89Gln и Val30Met.



Фигура 18. Родословно дърво и унаследяване на хаплотипа при семейство с носителство на Val30Met.



Фигура 19. Родословно дърво и унаследяване на хаплотипа при семейство с носителство на Ser77Phe.

3.4.3. Статистическа оценка

На базата на данните за алелните честоти на микросателитните маркери сред подгрупите на ATTRv пациенти, здрави роднини и контроли беше направена статистическата оценка на хипотезата за наличие на ефект на родоначалника за всеки от четирите *TTR* патологични варианти. Проведеният Хи-квадрат тест показва наличие на асоциация между тестваните променливи (*TTR* статус и носителство на алелите на хипотетичния родоначалник). Съответните *p*-стойности бяха разгледани при алфа ниво на значимост 0.05 (Таблица 10).

Таблица 10. Резултати от проведения Хи-квадрат тест на Пийърсън. Показани са *p*-стойностите при алфа ниво на значимост 0.05.

<i>TTR</i> патогенен вариант	<i>D18S49</i> Родоначален алел	<i>L1</i> Родоначален алел	<i>L4</i> Родоначален алел	<i>L8</i> Родоначален алел	<i>L9</i> Родоначален алел	<i>D18S47</i> Родоначален алел
<i>Glu89Gln</i>	<0.0001	<0.0001	0.0050	0.0040	0.0160	<0.0001
<i>Val30Met</i>	0.0034	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0010
<i>Ser77Phe</i>	<0.0001	0.0010	0.0110	<0.0001	<0.0001	<0.0001
<i>Gly47Glu</i>	0.0170	<0.0001	0.0170	<0.0001	0.0180	<0.0001

3.4.4. Определяне „възраст на мутацията“ – възрастта на най-скорошния общ предшественик

На базата на реконструкцията на хаплотиповете, извършена в хода на настоящата работа беше проведена математическа симулация за определяне на теоретичната възраст на най-скорошния общ предшественик за всеки от изследваните патологични варианти в *TTR* гена. Бяха анализирани данни за разпада на хипотетичния хаплотип на родоначалника чрез софтуера DMLE+ v.2.3. Беше взета предвид честотата на рекомбинация между изследваните локуси, базирана на данните от относителната локализация на изследваните микросателитни маркери спрямо всеки от патологичните *TTR* варианти. Резултатите представени в Таблица 11 са при 95% интервал на сигурност („confidence interval“) и с приближението, че едно поколение се равнява на 25 години²⁷.

Таблица 11. Резултати от изчисленията на възрастта на най-скорошния общ предшественик представени в брой поколения. Едно поколение се равнява на 25 години.

<i>TTR</i> патологичен вариант	Средна възраст на най-скорошния общ предшественик (брой поколения)	Възраст с 95% интервал на сигурност
<i>Glu89Gln</i>	45	38-52
<i>Val30Met</i>	47	36-58
<i>Ser77Phe</i>	43	34-52
<i>Gly47Glu</i>	32	24-40

Проведените молекулярно-генетични и статистически изследвания показват с голяма степен на вероятност наличието на ефект на родоначалника за изследваните патологични варианти в *TTR* гена Glu89Gln, Val30Met, Ser77Phe и Gly47Glu. Силите, които действат върху популациите и могат до доведат до загуба на генетично разнообразие и до наличието на ефект на родоначалника за определен генетичен дефект включват кумулативното действие на миграции, бедствия, географска или културна изолация на населението от популацията²⁸. В допълнение на т.нар. генетичен дрифт, АТТ_Rv е заболяване с късно начало, което не позволява действието на силите на естествения отбор да окажат влияние върху отпадането на патологичните *TTR* варианти от популацията. По отношение на Glu89Gln, предварителните данни за наличието на ясен ендемичен регион за този генетичен вариант в Южна България бяха подкрепени категорично от резултатите от хаплотипния анализ. От това стана ясно, че всички Glu89Gln пациенти най-вероятно произхождат от един общ предшественик, внесъл този вариант в нашата популация теоретично преди около 45 поколения. Вариантът Glu89Gln се среща предимно в Сицилия, Сардиния и Европейската част на Турция²⁹. Това географско разпределение в контекста на минали миграционни събития в района на Балканите и Средиземно море биха обяснили данните за ефект на родоначалника за Glu89Gln в България.

Val30Met вариантът показва по-разпръснато географско разпространение, в сравнение с другите АТТ_Rv патологични варианти в България. Резултатите от хаплотипния анализ и теоретичното изчисление на възрастта на най-скорошния общ предшественик показват, че хипотетичният родоначалник, който би могъл да е внесъл Val30Met в нашата популация се е появил по-рано в сравнение с другите „родоначалници“. Пациентите с Val30Met показват по-голяма степен на разпад на хипотетичния хаплотип на родоначалника, което би могло да корелира с по-голяма „възраст на мутацията“. Val30Met е докладван в редица ендемични региони по света, включително Португалия, Испания, Италия, Швеция и Япония. В някои от тези страни са провеждани подобни популационно-генетични изследвания, поради което беше възможно да се направи сравнение между българския Val30Met хаплотип и публикувани хаплотипни данни от други популации³⁰⁻³². Резултатите са обобщени в Таблица 12. Българските Val30Met пациенти се различават значително спрямо пациентите от другите ендемични региони. Причината за това би могла да е по-далечният генетичен произход на българския Val30Met родоначалник. От друга страна, тъй като локусът на този генетичен вариант се приема за мутационна гореща точка, не е изключено Val30Met да е възникнал независимо по нашите земи като отделно генетично събитие. За сравнение, Бразилските и Португалските пациенти с Val30Met са с доказан общ произход³².

Българските пациенти с Val30Met показват смесен и относително лек фенотип (съществуват случаи с начало на заболяването над 70 годишна възраст), което затруднява снемането на фамилна анамнеза и може да усложни поставянето на точна диагноза и затруднява изследването на епидемиологията на заболяването. Въз основа на няколко проучвания върху Val30Met пациенти от Япония и Португалия може да се заключи, че се наблюдават по-ранна възраст на начало на болестта и по-тежка клинична изява при пациентите, за които е известно, че произхождат от ендемични за болестта региони, за разлика от така наречените „спорадични“ случаи без фамилна история за заболяването^{33,34}. Вероятно по-късната възраст на начало на АТТ_Rv и по-леката клинична проява при някои от пациентите с Val30Met са причините, поради които някои от тези случаи имат трудна за

проследяване семейна история и се считат за спорадични. От друга страна, в Швеция съществуват два отделни ендемични региона за Val30Met, при които се наблюдават разлики във възрастта на начало на заболяването спрямо района на произход³⁵.

Таблица 12. Сравнение между Val30Met хаплогиповете от различни ендемични популации по света. *За испанските, шведските и японските пациенти няма данни за маркерите D18S49 и D18S47.

<i>Val30Met</i> <i>хаплогип</i>	D18S49	L1	L4	L8	L9	D18S47
<i>България</i>	104	242	262	291	323	198
<i>Италия</i>	122	237	271	297	311	202
<i>Португалия</i>	113	237	271	291	311	202
<i>Бразилия</i>	113	237	271	291	311	202
<i>Испания</i>	*	235	271	291	321	*
<i>Япония</i>	*	235/237	271	299/305	311/327	*
<i>Швеция</i>	*	241	271	303	329	*

Семействата с варианта Ser77Phe в България произхождат от ясно очертан ендемичен регион (село Вакарел) и за тях също беше доказано, че най-вероятно произхождат от общ предшественик. Честотата на алелите на хипотетичния хаплогип на родоначалника се срещат с висока честота при носителите на Ser77Phe и най-вероятно този вариант се е появил в популацията по-скоро в сравнение с Glu89Gln и Val30Met. Вариантът Ser77Phe е докладван още във Френската популация³⁶. В допълнение, на същата генна позиция съществува описан и друг патологичен амилоидогенен вариант Ser77Tyr³⁷. Вероятно този локус също представлява гореща точка за натрупване на варианти в *TTR* гена.

Анализът на двете семейства, в които се открива вариантът Gly47Glu показва, че те най-вероятно произхождат от един общ предшественик. Въпреки това, липсата на други засегнати Gly47Glu семейства и отрицателните резултати от скрининга при новородени от региона на произход двете Gly47Glu семейства са доказателство, че хипотезата за ендемичен за Ромското население ATTRv регион с характерен за него генетичен вариант по-скоро трябва да се отхвърли. Значително по-агресивният характер на този патологичен вариант, който се характеризира с начало на заболяването около 20-30 годишна възраст вероятно са причината за ниската честота в България, което потенциално би означавало отпадане на тази мутация от популацията с времето.

Произходът на ATTRv пациентите оказва влияние върху очакваното проявление на болестта. Хипотезата за наличие на генетични и епигенетични фактори с влияние върху хетерогенността на клиничната изява на заболяването трябва да се изследва в контекста на различни подгрупи пациенти, които са носители на един и същ *TTR* вариант^{31,38,39}. Бъдещи сравнителни проучвания между ATTRv популации, носители на различни от Val30Met патогенни варианти на *TTR* гена биха ни дали по-подробна картина за епидемиологията, разпространението и изявата на ATTRv в света.

3.5. Обобщение на резултатите и заключение

Изследванията, проведени в рамките на настоящия дисертационен труд обхващат различни аспекти по отношение на разпространението, клиничната проява и молекулярните механизми на патогенеза при пациенти с наследствена транстиретинова амилоидоза в България. Патологичният *TTR* вариант Glu89Gln остава най-честият генетичен дефект, но беше открит и нов за страната вариант Glu54Leu. Високият дял положителни безсимптомни носители сред групата на роднините на пациентите доказва необходимостта от скрининг в засегнатите семейства с цел поставяне на навременна диагноза. Отрицателните резултати от скрининга при новородени от ромски произход от региона на град Полски Тръмбеш и Русе отхвърлиха хипотетичната ендемичност за варианта Gly47Glu, с което вариантите, за които има доказани ендемични региони в България остават Glu89Gln, Val30Met и Ser77Phe.

Резултатите от анализа на потенциални генетични модификатори на *ATTRv* показаха наличие на статистическа корелация между възрастта на начало на заболяването и носителството на алел Т на полиморфизма rs1791228. Анализът на ефекта на този полиморфизъм върху първоначалното системно засягане в изследваната кохорта показва увеличение на дяла пациенти носители на алел Т с първоначално сърдечно и смесено засягане. Наблюдаваните резултати до голяма степен съвпадат със съобщаваните в литературата данни, но предложените молекулярни механизми все още не са достатъчно добре проучени за да може да се направи достоверен извод за ефекта на този полиморфизъм върху развитието на *ATTRv*.

Резултатите от проведените анализ на транстиретиновата генна експресия показва смесен моно- и биалелен транскрипционен профил с различни съотношения между мутантен и див тип транстиретин, което хипотетично би могло да има отношение върху прогресията на заболяването. Беше предложен хипотетичен механизъм за възраст-зависима алел-специфична генна експресия, но са необходими още изследвания за изясняване на връзката между конкретния наблюдаван експресионен профил и развитието на *ATTRv*.

Хаплотипният анализ на скачени с *TTR* гена генетични микросателитни маркери потвърди математически и статистически хипотезата за наличие на ефект на родоначалника за изследваните групи пациенти, носители на *TTR* вариантите Glu89Gln, Val30Met, Ser77Phe и Gly47Glu. Беше изчислена теоретичната възраст на най-скорошния общ предшественик за четирите вариантни групи, при което беше установено, че Val30Met е внесен най-отдавна в нашата популация. Резултатите от проведените популационно-генетични изследвания показаха наличието на уникален за света генетичен профил при българските *ATTRv* пациенти, който е потенциален материал за изследване на все още недостатъчно добре проучените разлики във фенотипната изява на заболяването.

4. ИЗВОДИ

- 4.1. Екзони 2 и 3 на *TTR* гена остават доказана гореща точка на натрупване на амилоидогенни варианти, причиняващи наследствена транстиретинова амилоидоза сред българските пациенти. Поради това, диагностичният алгоритъм за генетично тестване трябва да включва първоначално изследване на горещия регион, с последващ анализ на екзони 1 и 4 при наличие на убедителни клинични показания.
- 4.2. Двете засегнати Gly47Glu семейства са най-вероятно близкородствени и наличието на този вариант е резултат от скорошно единично мутационно събитие, с което хипотезата за наличие на ендемичен регион за Gly47Glu сред ромското население в Северна България се отхвърля.
- 4.3. Възрастта на начало на заболяването при ATTRv пациенти с Glu89Gln е в статистически значима корелация с генотипа по отношение на полиморфизма rs1791228, като този маркер показва и математическа връзка с наличието на първоначално сърдечно и смесено засягане. Данните от проведените изследвания съвпадат със съобщаваните в литературата корелации, но са необходими допълнителни проучвания за да може да се направи достоверен извод за ефекта полиморфизма rs1791228 върху развитието на ATTRv.
- 4.4. Смесеният транстиретинов транскрипционен профил (моно- и биалелна експресия) на изследваните проби от кръвна плазма и урина на пациенти с Glu89Gln показва частична корелация с клиничната изява на заболяването. Предложеният хипотетичен механизъм за възраст-зависима алел-специфична генна експресия включва първоначална експресия на дивия тип алел, която постепенно се измества към експресия на мутантния алел.
- 4.5. Детайлното анализиране на транстиретиновата експресия и нейното проследяване в хода на заболяването би могло да послужи като прогностичен маркер за развитието на ATTRv, но механизмът на амилоидогенеза и тъканно засягане включва съвкупност и от множество други молекулни фактори (генетични и епигенетични).
- 4.6. Българският генофонд е уникален по отношение на произхода и епидемиологията на най-честите амилоидогенни *TTR* варианти за българската популация Glu89Gln, Ser77Phe и Val30Met, за които беше доказано достоверно наличието на ефект на родоначалника. Степента на разпръснатост на популацията от ATTRv пациенти от ендемичните региони съвпада с разпада на хипотетичния хаплотип на родоначалника и теоретично изчислената „възраст на мутацията“.

5. ПРИНОСИ

Приноси с научно-приложен характер:

- 5.1. Генофондът по отношение на амилоидогенни варианти в *TTR* гена беше допълнен с нов за страната вариант Glu54Leu, който предстои да бъде фенотипно охарактеризиран и проследен в популацията.
- 5.2. Беше доказана уникалността на българския популационно-генетичен профил в сравнение с други *ATTRv* ендемични популации по света, което дава база за провеждане на изследвания, свързани с хетерогенността на клиничната изява на заболяването.

Приноси с методичен характер:

- 5.3. Беше разработен метод за качествено и количествено изследване на транстиретиновия транскрипт в лесно достъпен клиничен материал (кръвна плазма и урина). Методът позволява сравнителен анализ на алел-специфичната транстиретинова експресия, което потенциално може да послужи като маркер за прогресията на заболяването.
- 5.4. Успешно беше избран подход за изследване на ефект на родоначалника чрез прилагане на ELB алгоритъм за теоретична реконструкция на хаплотипове, който позволява анализ на големи извадки от данни за провеждане на редица популационно-генетични и корелационни изследвания.

6. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

6.1. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Kirov A, Sarafov S, **Pavlova Z**, Todorov T, Chamova T, Gospodinova M, Tournev I, Mitev V, Todorova A. Founder effect of the Glu89Gln TTR mutation in the Bulgarian population. *Amyloid*. 2019 Dec 26(4):181-185. doi: 10.1080/13506129.2019.1634539.
Импакт фактор (2019): 4.323 **Забелязани цитирания: 10**
2. Yordanova I, **Pavlova Z**, Kirov A, Todorov T, Alexiev A, Sarafov S, Mateva L, Chamova T, Gospodinova M, Mitev V, Tournev I, Todorova A. Monoallelic expression of the TTR gene as a contributor to the age at onset and penetrance of TTR-related amyloidosis. *Gene*. 2019 Jul 15;705:16-21. doi: 10.1016/j.gene.2019.04.030.
Импакт фактор (2019): 2.984 **Забелязани цитирания: 3**
3. **Pavlova Z**, Sarafov S, Todorov T, Kirov A, Chamova T, Gospodinova M, Tournev I, Mitev V, Todorova A. Characterization of population genetic structure of hereditary transthyretin amyloidosis in Bulgaria. *Amyloid*. 2021 Dec 28(4):219-225. doi: 10.1080/13506129.2021.1935230.
Импакт фактор (2021): 6.571 **Забелязани цитирания: 1**

ОБЩ ИМПАКТ ФАКТОР: 13.878

6.2. НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Pavlova Z**, Kirov A, Sarafov S, Todorov T, Chamova T, Gospodinova M, Mitev V, Tournev I, Todorova A. Prevalence of the Glu89Gln TTR mutation in the Bulgarian ATTR patients and investigation of possible founder effect. Poster presentation at ARiA VIII symposium 2019.
2. **Pavlova Z**, Todorov T, Chamova T, Gospodinova M, Mitev V, Tournev I, Todorova A. Population genetic profiling of hereditary transthyretin amyloidosis in Bulgaria and possible non-coding genetic modifiers. Poster presentation at ESHG Conference, June 11-14, 2022, Vienna, Austria (P20.013.C).

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Benson et al. *Muscle Nerve*. 2007;36(4):411-423. doi:10.1002/mus.20821
2. Hellman et al. *Scand J Clin Lab Invest*. 2019;79(6):372-376.
3. Miyata et al. *Biochemistry*. 2010;49(1):114-123. doi:10.1021/bi901677z
4. Jumper et al. *Nature*. 2021;596(7873):583-589. doi:10.1038/s41586-021-03819-2
5. Mutations in Hereditary Amyloidosis. Accessed February 12, 2022.
6. Rowczenio et al. *Hum Mutat*. 2019;40(1):90-96. doi:10.1002/humu.23669
7. Richards et al. *Genet Med*. 2015;17(5):405-424. doi:10.1038/gim.2015.30
8. Haagsma et al. *Amyloid and Amyloidosis*. CRC Press; 2004.
9. Pelo et al. *Amyloid*. 2002;9(1):35-41. doi:10.3109/13506120209072443
10. Durmuş-Tekçe et al. *Neuromuscul Disord*. 2016;26(7):441-446.
11. Karczewski et al. *Nature*. 2020;581(7809):434-443. doi:10.1038/s41586-020-2308-7
12. Iorio et al. *Eur J Hum Genet* 25, 1055–1060 (2017). <https://doi.org/10.1038/ejhg.2017.95>
13. Alves-Ferreira et al. *Mol Neurobiol*. 2018;55(5):3676-3683.
14. Lemos et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014;85(3):326-330.
15. Chamova et al. *Front Neurol*. 2022;13:844595. doi:10.3389/fneur.2022.844595
16. Alves-Ferreira et al. *Amyloid*. 2021;28(2):100-106. doi:10.1080/13506129.2020.1857236
17. Polimanti et al. *Amyloid*. 2013 Dec;20(4):256-62. doi: 10.3109/13506129.2013.844689.
18. Sikora et al. *Hum Genet*. 2015;134(1):111-121. doi:10.1007/s00439-014-1499-0
19. Wang et al. *Cell Signal*. 2013;25(3):674-681. doi:10.1016/j.cellsig.2012.11.027
20. Boyle et al. *Genome Res*. 2012;22(9):1790-1797. doi:10.1101/gr.137323.112
21. Reinius et al. *Nat Rev Genet*. 2015 Nov;16(11):653-64. doi: 10.1038/nrg3888.
22. Gui et al *Front Genet*. 2017;8:191. doi:10.3389/fgene.2017.00191
23. Salameh et al. *Frontiers in Genetics*. 2020;11. Accessed December 27, 2022.
24. Horvath et al. *Nat Rev Genet*. 2018;19(6):371-384. doi:10.1038/s41576-018-0004-3
25. Castillo-Fernandez et al. *Genome Medicine*. 2014;6(7):60.
26. Edwards et al. *Genetics*. 2008;179(3):1143-1150. doi:10.1534/genetics.104.92940
27. Marques et al. *PLOS ONE*. 2018;13(11):e0207409. doi:10.1371/journal.pone.0207409
28. Slatkin et al. *Am J Hum Genet*. 2004;75(2):282-293.
29. Parman et al. *Curr Opin Neurol*. 2016;29 Suppl 1:S3-S13.
30. Ohmori et al. *J Med Genet*. 2004;41(4):e51. doi:10.1136/jmg.2003.014803

31. Iorio et al. *Amyloid*. 2015;22(2):73-78. doi:10.3109/13506129.2014.994597
32. Zaros et al. *Ann Hum Genet*. 2008;72(Pt 4):478-484.
33. Coelho et al. *J Med Genet*. 1994;31(4):293-299.
34. Koike et al. *Arch Neurol*. 2002;59(11):1771-1776. doi:10.1001/archneur.59.11.1771
35. Sousa et al. *HHE*. 1993;43(5):288-294. doi:10.1159/000154146
36. Planté-Bordeneuve et al. *Neurology*. 1998;51(3):708-714. doi:10.1212/wnl.51.3.708
37. Wallace et al. *J Clin Invest*. 1988;81(1):189-193. doi:10.1172/JCI113293
38. Hellman et al. *Amyloid*. 2008;15(3):181-186. doi:10.1080/13506120802193720
39. Bonaïti et al. *Eur J Hum Genet*. 2010;18(8):948-952. doi:10.1038/ejhg.2010.36