



ПРОФЕСИОНАЛНО НАПРАВЛЕНИЕ:
4.3. Биологически науки (Генетика)

АВТОРЕФЕРАТ
на дисертационен труд
за придобиване на ОНС „Доктор“
на тема

**„Генетично профилиране на редки
неврологични заболявания чрез цялостно
екзомно и геномно секвениране“**

Докторант:
Мая Атанасоска

Научни ръководители:
Акад. проф. д-р Драга Тончева, д.м., д.б.н.
доц. д-р Светослав Димов, д.б.

София, 2024

Дисертационният труд съдържа 330 страници и е онагледен с 126 фигури и 32 таблици. Библиографската справка съдържа 316 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на Катедрения съвет на Катедра „Генетика“, Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, проведено в разширен състав със Заповед № РД-38-126/27.02.2024г. На г-н Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“ на 15 февруари 2024 г.

Членовете на научното жури са в следния състав:

1. Доц. д-р Любен Иванов Загорчев, д.б.н.
2. Акад. проф. Румен Георгиев Панков, д.б.н.
3. Проф. Албена Кирилова Йорданова, д.б.
4. Акад. проф. Иван Георгиев Иванов, д.б.н.
5. Акад. проф. Атанас Иванов Атанасов д.н.

Резервни членове:

1. Доц. д-р Деница Руменова Теофанова, д.б.
2. Проф. д-р Милена Иванова Иванова–Шиварова, д.м.н

Административен секретар:
г-жа Екатерина Афенлиева

Материалите по защитата са на разположение на интернет-страницата на СУ „Св. Климент Охридски“.

Благодарности:

- Благодаря на научните си ръководители акад. проф. д-р Драга Тончева и доц. д-р Светослав Димов за подкрепата и ценните напътствия при оформянето и реализацията на този дисертационен труд.
- Признателна съм на акад. проф. д-р Драга Тончева за предоставената възможност за развитие, за всестранната помощ, както и за насърчаването и непрекъснатата подкрепа.
- Благодаря на доц. Радослава Въжарова и Любомир Балабански за получените знания в сферата на ДНК секвенирането и геномните анализи. Признателна съм за приятелството, доверието, новаторската мисъл и ценните идеи, които ми бяха изключително полезни при реализацията на този дисертационен труд.
- Благодаря на колегите ми ГМДЛ CellGenetics за разбирането, колегиалността и подкрепата.
- Благодаря на семейството ми – партньора ми Нино, децата ми Калина и Петър, майка ми и сестра ми за любовта, търпението и безусловната подкрепа, без които нямаше да се справя.
- Благодаря на пациентите и техните родители за уроците, които ми дадоха в професионален и личен план.

СЪДЪРЖАНИЕ:

I. ВЪВЕДЕНИЕ	7
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	10
1. Цел	10
2. Задачи.....	10
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	11
1. Клиничен материал.....	11
2. Методи	12
IV. РЕЗУЛТАТИ	13
1. Статистически анализ на данните от ЦЕ и ЦГС.....	13
2. Патогенни и вероятно патогенни варианти установени при пациентите.....	13
3. Варианти с неясна клинична значимост асоциирани с клиничния фенотип на пациентите	17
V. ДИСКУСИЯ	19
1. Клинични данни и обсъждане на молекулярно-генетичните резултати на пациентите от различните групи	19
1.2 Пациенти със заболявания на периферната нервна система и мускулатурата.....	19
1.2.1 Идентифицирани патологични варианти при пациенти със заболявания на периферната нервна система и мускулатурата	19
1.2.1.1 Пациент WES_019.....	19
1.2.1.2 Пациент WES_071.....	20
1.2.1.3 Пациент WES_358.....	21
1.2.1.4 Пациент WES_371.....	22
1.2.1.5 Пациент WGS_016	24
1.2.1.6 Пациент WGS_027	25
1.2.1.7 Пациент WGS_077	26
1.2.2 Идентифицирани варианти с неясна клинична значимост при пациенти със заболявания на периферната нервна система и мускулатурата	27
1.2.2.1 Пациент WGS_100	27
1.2.2.2 Пациент WGS_131	29
1.2.3 Обобщение на получените резултати при пациентите с невромускулни заболявания.....	30
1.3 Пациенти със нарушение в неврологичното и интелектуалното развитие	31
1.3.1 Идентифицирани патогенни варианти при пациенти с изоставане в нервно-психическото развитие без епилепсия	31

1.3.1.1 Пациент WES_143.....	31
1.3.1.2 Пациент WES_247.....	32
1.3.1.3 Пациент WGS_004.....	33
1.3.1.4 Пациент WGS_055.....	35
1.3.1.5 Пациент WGS_179.....	36
1.3.1.6 Пациент WGS_181.....	38
1.3.2 Установени варианти с неясна клинична значимост при пациенти с изоставане в нервно-психическото развитие.....	39
1.3.2.1 Пациент WGS_001.....	39
1.3.2.2 Пациент WGS_003.....	41
1.3.3 Обобщение на получените резултати.....	42
1.4 Идентифицирани патологични варианти при пациенти с изоставане в нервно-психичното развитие и епилепсия.....	43
1.4.1 Пациент WES_057.....	43
1.4.2 Пациент WES_124.....	44
1.4.3 Пациент WES_241.....	45
1.4.4 Пациент WES_251.....	46
1.4.5 Пациент WES_279.....	48
1.4.7 Пациент WES_343.....	50
1.4.8 Пациент WES_357.....	51
1.4.9 Пациент WES_467.....	52
1.4.10 Пациент WES_541.....	53
1.4.11 Пациент WGS_053.....	54
1.4.12 Обобщение на получените резултати.....	56
1.5 Пациенти с епилептични пристъпи без изоставане в нервно-психическото развитие.....	56
1.5.1 Пациент WES_007.....	56
1.5.2 Обобщение на получените резултати.....	57
1.6.1 Идентифицирани патогенни варианти при пациенти с комплексна неврологична клинична картина и неизяснена етиология.....	58
1.6.1.1 Пациент WES_015.....	58
1.6.1.2 Пациент WES_028.....	59
1.6.1.3 Пациент WES_133.....	60
1.6.1.4 Пациент WES_172.....	61
1.6.1.5 Пациент WES_238.....	62

1.6.1.6 Пациент WES_259.....	64
1.6.1.7 Пациент WES_271.....	65
1.6.1.8 Пациент WGS_031	66
1.6.1.9 Пациент WGS_044	69
1.6.1.10 Пациент WGS_046.....	70
1.6.1.11 Пациент WGS_047.....	71
1.6.1.12 Пациент WGS_057.....	72
1.6.1.13 Пациент WGS_083.....	73
1.6.1.14 Пациент WGS_140.....	74
1.6.1.15 Пациент WGS_152.....	76
1.6.2 Идентифицирани варианти с неясна клинична значимост при пациенти с комплексна неврологична клинична картина и неизяснена етиология	78
1.6.2.1 Пациенти WGS_067 и WGS_068.....	78
1.6.3 Обобщение на получените резултати.....	81
VI. ОБСЪЖДАНЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ	82
1. Обсъждане на получените резултати.....	82
2. Бъдещи направления	84
3. Заключение	86
VII ИЗВОДИ.....	87
VIII ПРИНОСИ	88
1. Приноси с научна стойност	88
2. Приноси с приложен характер.....	88
IX. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	89
X. ПРЕЗЕНТАЦИИ ПО НАУЧНИ ФОРУМИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД ..	89
XI. ПОСТЕРИ И УЧАСТИЯ ПО НАУЧНИ ФОРУМИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	89
XII. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА	91

Списък с използвани съкращения:

Съкращения на кирилица:

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

РНК – рибонуклеинова киселина

ЦГС – цялостно геномно секвениране

ЦЕС – цялостно екзомно секвениране

ДЦП – детска церебрална парализа

ИНПР – изоставане в нервно-психическото развитие

ГТКП – генерализиран тонично-клоничен пристъп

Съкращения на латиница:

OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man

MELAS – mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes

SNP - Single Nucleotide Polymorphisms (единичен нуклеотиден полиморфизъм)

Gb – gigabase (гигабази)

Mb – megabase (мегабази)

bp – base pairs (базови двойки)

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Неврогенетиката изучава ролята на генетичните фактори при развитието на нервната система и свързва невробиологията с генетиката. Освен нормалното развитие на нервната система, неврогенетиката е насочена към изучаване и на молекулярните механизми водещи до развитие на неврологични заболявания, както и тяхната генотип-фенотипна корелация. Редките неврологични заболявания, следват както законите за унаследяване описани от Грегор Мендел, така и неменделов тип на унаследяване (1). В последните десетилетия иновативните изследванията са насочени към комплексните заболявания, където е характерно дигенното и комплексното (олигогенно) унаследяване, междугенните взаимодействия и генетичните модификатори (2, 3).

Според Европейската комисия по медицинска генетика, редките болести са „хронични инвалидизиращи или животозастрашаващи заболявания, които засягат по-малко от 5 на 10 000 индивида“. Общият брой на редките болести варира в зависимост от различните бази данни, според Световната здравна организация, описани са между 7000 - 8000 редки заболявания, като тази бройка постоянно се увеличава. Към февруари 2024 година, в базата данни OMIM (Online Inheritance In Man, February 2024) има докладвани 7485 заболявания с описана молекулярна патогенеза и 4882 гени, чиито патогенни вариации са асоциирани с определен фенотип. Докато 252 са гените, дефекти в които водят до проява на четири или повече различни състояния.

Около 80% от Редките болести са с генетична етиология, 75% от тях се проявяват при раждането или в ранна детска възраст (до 2 годишна възраст). Останалите 20% се развиват в резултат на инфекции (вируси или бактерии), тератогенни и други екзогенни фактори. Засегнатите с конкретно рядко заболяване са малко, но общият брой е голям и надскача 30 милиона пациенти в Европа. Около 6% от световната популация е засегната от рядко заболяване, като в България общият брой на пациентите с редки болести е около 500 000. Повечето от тях са диагностицирани с изключително редки заболявания с честота <1/1 000 000 души.

Чрез изследвания върху молекулярно-експресивния профил на гените е установено, че от 22 000 гени идентифицирани в човешкия геном, 84% се експресират в мозъка, което прави 1/3 от протеин кодиращите гени. Това е най-големия процент на гени, експресирани в която и да е част на човешкото тяло (4). Поради тази причина 90% от генетичните

заболявания са с неврологична симптоматика, засягащи ЦНС, ПНС и мускулите. Поради комплексната и хетерогенна клинична картина пациентите често са диагностицирани погрешно и чакат между 5 и 30 години, за получаване на правилна диагноза. Според Европейската референтна мрежа за редки неврологични заболявания (ERN-RND) в Европа са регистрирани около 500 000 души засегнати от рядко неврологично заболяване, а 60% от тях остават недиагностицирани.

Генетичната диагностика на неврогенетичните заболявания се разделя на:

1. Скрининг – пациентите се изследват за конкретното заболяване.
2. Изследване за носителство – пациентите са клинично здрави и се изследват за наличие на патологични варианти в гени, асоциирани с рецесивни заболявания или за носителство на премутация (пр. чуплива X хромозома), като целта е да се извърши репродуктивна профилактика, особено ако вече има засегнати членове.
3. Потвърждаваща диагностика – тя включва изследвания, които потвърждават диагнозата или поставят такава, ако пациентите са с хетерогенно и комплексно състояние. Може да бъде пренатална (идентифициране на варианти по време на ембрионалното развитие), постнатална (идентифициране на варианти след раждането и при проява на клинични симптоми) и преимплантационна (изследване на ембриони ин витро, с цел имплементиране само на здрави ембриони в матката на майката) (5).

Определянето на молекулярния механизъм и модела на унаследяване са ключови при поставяне на генетична диагнозата. С въвеждането на секвенирането от ново поколение в клиничната практика, настъпва еволюция при идентифицирането на патогенезата на тази група заболявания, като в световен мащаб диагностичната успеваемост се увеличава с 30 - 50% (6). Метода освен, че съкращава пътя до поставянето на генетична диагноза, дава възможност за откриване на нови гени, асоциирани с вече известни заболявания, откриване на неописани състояния, както и идентифициране на нови сигнални пътища и молекулярни механизми водещи до патологичен фенотип.

Съвременните геномни технологии се полезни в няколко направления, получаване на информация относно генната регулация, разкриване на молекулярни механизми на заболяванията и създаване на ново поколение таргетни терапии, които ще се прилагат индивидуално за различните пациенти. Всичко това ще доведе до развитие на нови научни направления, като информационна, сравнителна и функционална геномика и протеомика

(7). В тази насока работят проекти описани в литературния обзор, а именно: Европейска инициатива „1+ милиона генома“ (MEGA), 1000 Genomes Project, 100 000 Genomes Project, Европейски проект RD-PORTAL 1 и 2 и други.

От друга страна, референтните мрежи и експертни центрове имат за цел натрупване на нова информация за Редките болести, по отношение на развитието на клиничната картина, генетична определеност, възможността на пациентите да участват в клинични проучвания и достъпни генно-базирани терапии. Най-голям принос в тази насока имат следните референтни мрежи: Европейската Референтна Мрежа на Редки Неврологични Заболявания (ERN-RND), Rare Diseases Clinical Research Network (RDCRN), Ultra-Rare Gene-based Therapy (URGenT) Network, EURORDIS - Rare Diseases Europe и други.

Въпреки съвременните възможности за идентифициране на патогенезата на редките неврологични заболявания, даже и след извършване на голям брой съвременни генетични изследвания, около 50% от засегнатите остават недиагностицирани. Причините за това може да са: ограничения на използваната технология; дефекти в ген, който към момента на изследването не е асоцииран с конкретно заболяване; наличие на нови и неописани молекулярни механизми при гени асоциирани с друг фенотип различен от този на изследвания; геномен импринтинг; мозаицизъм; вариабилна експресивност и други. Това е една история с продължение, която ще се развива паралелно с развитието на геномната медицина.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

1. Цел

Целта на настоящата дисертационна работа е установяване на генетични нарушения и охарактеризиране на молекулярна патогенеза на редки неврологични заболявания, чрез таргетен биоинформатичен анализ и интерпретация на данни от цялостно екзомно или геномно секвениране при пациенти с неврологична клинична картина.

2. Задачи

Основните задачи на дисертационния труд са следните:

1. Селектиране на таргетни групи пациенти с различни неврологични заболявания при които има неизяснен генетичен дефект;
2. Изследване на биологични проби, чрез нов подход за биоинформатичен анализ на данни от цялостно екзомно или геномно секвениране;
3. Създаване на индивидуални виртуални генни панели за всеки пациент в съответствие с клиничната картина, които да се използват за таргетен биоинформатичен анализ на генерираните данни от секвенирането;
4. Интерпретация и класификация на идентифицираните генетичните нарушения, селектиране на кандидат гени и тяхно определяне на клиничната им асоциация с молекулярните механизми на заболяването;
5. Създаване на алгоритъм за генно профилиране на спектъра от патогенни варианти, асоциирани с конкретните неврологични заболявания.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Клиничен материал

При изпълнение на настоящата дисертация, чрез цялостно екзомно или геномно секвениране са изследвани 76 пациенти с неврологични заболявания. В зависимост от анамнезата и диференциалната диагноза, засегнатите ги разпределихме в следните групи:

- Пациенти със заболявания на периферната нервна система и мускулите

Броя на тези пациенти е 17, като шестнадесет от тях са под 18 годишна възраст, а един пациент е над 18 годишна възраст.

- Пациенти с нарушения в нервно-психичното развитие без епилептични пристъпи

Броя на пациентите е петнадесет, четиринадесет са под 18 годишна възраст, а един пациент е на 20 години.

- Пациенти с нарушения в нервно-психичното развитие и епилептични пристъпи

Броя на изследваните пациенти с гореспоменатата клиника е 17, като към момента на изследването всички са под 18 годишна възраст.

- Пациенти с епилептични пристъпи без нарушение на нервно-психичното развитие към момента на изследването.

Броя на изследваните пациенти е 4 и към момента на изследването, всички са под 18 годишна възраст.

- Пациенти с неврологична клинична картина, неизяснена етиология и малформации на мозъка

Броя на изследваните пациенти е 22, като три проби са от абортивен материал, следствие на прекъсване на бременност по медицински причини. Останалите са под 18 годишна възраст.

2. Методи

В процеса на работа по дисертационния труд бяха използвани следните методи:

- Изолиране на геномна ДНК от кръв и тъкан чрез QIAamp Mini and Blood Mini Kit
- Цялостно екзомно секвениране и геномно секвениране извършено в BGI Genomics
- Биоинформатичен анализ на данните от цялостното екзомно и геномно секвениране
- Класифициране на идентифицираните варианти по критериите на ACMG (American College of Medical Genetics)
- Интерпретация на класифицираните варианти и тяхно асоцииране с клиничната картина на пациентите
- Описване на вариантите по номенклатурата на HGVS v.20.05 (Human Genome Variation Society)

IV. РЕЗУЛТАТИ

1. Статистически анализ на данните от ЦЕ и ЦГС

Статистическият анализ на получените данни от цялостното екзомно и геномно секвениране показва, че пробите имаха очаквания общ брой варианти след извършване на секвенирането. От анализа получихме информация относно качеството им, като всички проби бяха с добри параметри за качество и не се очаква пропускане или наличие на фалшиво положителни варианти.

Разликите при статистическия анализ между двете изследвания са:

- Общия брой на идентифицираните находки, което се дължи на равномерното покритие при цялостното геномно секвениране, за разлика от екзомното, където има покритие само на екзоните и частично при некодиращите и нетранслиращите райони.

- Крайния добив на реакцията е другата разлика при ЦЕС добива е 18Gb/проба, докато при ЦГС е 90Gb/проба. Този добив ако не е разпределен равномерно по целия геном, може да се наблюдават райони с твърде ниско покритие за сметка на райони с ненужно високо. Това се наблюдава при данните от екзомното секвениране, където има налични райони с повече от 200X прочита, за сметка на некодиращите райони и липсата на прочити, докато при геномното секвениране прочитите са повече от 30X, но са равномерно разпределени в генома.

- При ЦГС, чрез използване на различни алгоритми има възможност да се идентифицират структурни и копийни варианти.

2. Патогенни и вероятно патогенни варианти установени при пациентите

Клиничната диагноза и фенотипа на всеки пациент са индивидуални, което наложи създаване на индивидуален подход при биоинформатичния анализ. За всеки пациент бяха приложени критерии за анализ и класификация на генетичните находки, описани в раздел Материали и методи.

Установени бяха 46 патогенни или вероятно патогенни варианти, асоциирани с клиничния фенотип на 39 пациенти, като разпределението на идентифицираните находки по различните пациентски групи е следното: при пациентите от 1-ва група при 7 от 17, при 6 от 15 пациенти от 2-ра група, 11 от 18 пациенти от 3-та група установихме молекулярната патогенеза на заболяването им. При 4-мата пациенти с бенигна форма на

эпилепсия (група 4) не идентифицирахме патологични варианти. При пациентите с неизяснена етиология (22-мата пациенти) от група 5, броя на идентифицираните патогенни варианти, чрез ЦЕС или ЦГС е 15.

В таблица 1 са описани патогенните и вероятно патогенните варианти, които са асоциирани с клиничната картина на конкретният пациент. Шифъра на пациентите започва с WES при изследване, чрез цялостно екзомно секвениране и с WGS при изследване, чрез цялостно геномно секвениране.

Таблица 1. Идентифицирани патогенни и вероятно патогенни варианти, асоциирани с клиничната картина на пациентите

Номер	Въз./ Пол	Дифер. диагноза	Ген	Номенклатура по HGVS	Генотип	Ген. Диагноза	*
Пациенти с невромускулни заболявания (Група 1)							
WES_019	17 / Ж	Полимиозит	<i>FDX2</i>	NC_000019.9:g.10426672T>A NM_001031734.4:c.10A>T NP_001026904.2:p.Met4Leu	Хом.	МЕОАЛ	АР
WES_071	13/М	Идиопатична фамилна дистония	<i>BAG3</i>	NC_000010.10:g.121431885C>T NM_004281.3:c.626C>T NP_004272.2:p.Pro209Leu	Хет.	Миофибриларна миопатия	АД
WES_358	14 / М	Ранна малкомозъчна атаксия	<i>NPC1</i>	NC_000018.9:g.21141449T>A NM_000271.5:c.506A>T NP_000262.2:p.p.Asn169Ile	Хом.	Болест на Niemann-Pick, тип С	АР
WES_371	14 / М	Болест на Паркинсон. Спастична пареплегия.	<i>MSL3</i>	NC_000023.10:g.11783802_11783818dup; NM_078629.4:c.1125_1141dup; NP_523353.2:p.Met381Argfs*30	Хеми.	Синдром на Basilicata-Akhtar	ХР
WGS_016	11 / М	Митохондриална и метаболитна болест	<i>GCHI</i>	NC_000014.8:g.55310817T>C NM_000161.3:c.671A>G NP_000152.1:p.Lys224Arg	Хет.	L-DOPA зависима дистония	АД/ АР
WGS_027	16 / М	Полимиозит	<i>SETX</i>	NC_000009.11:g.135153475_135153476del NM_015046.7:c.6824_6825del NP_055861.3:p.(Arg2275Lysfs*6)	Хет.	Атаксия, тип 2 / ALS, тип 4	АР/ АД
WGS_077	1 / Ж	Генерализирана мускулна хипотония. ИНПР	<i>PURA</i>	NC_000005.9:g.139494352_139494354del NM_005859.5:c.586_588del NP_005850.1:p.Ile196del	Хет.	ИНПР хипотония с	АД
Пациенти с нарушение в нервно-психическото развитие (Група 2)							
WES_143	1/М	Синдром на Noonan. Noonan-like спектър	<i>BRAF</i>	NC_000007.13:g.140449165A>C NM_001374258.1:c.2034T>G NP_001361187.1:p.Asp678Glu	Хет.	РАСопатия. Синдром на Noonan	АД
WES_247	9 / М	Задръжка в НПР	<i>HUWE1</i>	NC_000023.10:g.53578039G>A NM_031407.7:c.9208C>T NP_113584.3:p.Arg3070Cys	Хет.	ИНПР, Turner тип	ХС
WGS_004	11 / М	Генерализирано разстройство на психичното развитие. Аутизъм.	<i>CTTNBP2</i>	NC_000007.13:g.117365241_117365242del NM_033427.2:c.4127_4128del NP_219499.1:p.(Val1376Glufs*12)	Хет.	Аутизъм	АД
WGS_055	7 / М	Задръжка в НПР	<i>ABCA13</i>	NC_000007.13:g.48311773del NC_000007.13(NM_152701.5):c.2510del NP_689914.3:p.(Leu837TyrfsTer21)	Хет.	ИНПР епилепсия без	АД и АР
				NC_000007.13:g.48443470C>T NM_152701.5:c.12064C>T NP_689914.3:p.(Arg4022Ter)	Хет.		

WGS_179	2 / Ж	ИНПР. Миопатия	<i>GRIN2B</i>	NC_000012.11:g.13720165T>G NM_000834.5:c.2392A>C NP_000825.2:p.Thr798Pro	Хет.	ИНПР с или без эпилепсия / Эпилептична энцефалопатия	АД / АД
WGS_181	9 / Ж	Задръжка в НПП	<i>SPEN</i>	NC_000001.10:g.16258742G>T NM_015001.3:c.6007G>T NP_055816.2: p.(Glu2003Ter)	Хет.	Синдром на Radio-Tartaglia	АД
Пациенти с нарушение в първо-психическото развитие и епилепсия (Група 3)							
WES_057	8 / М	G40.6 Grand mal припадъци (с малки припадъци [petit mal] или без тях), неуточнени	<i>SLC9A6</i>	NC_000023.10:g.135106524C>T NM_001042537:c.1498C>T NP_001036002.1:p.Arg500Ter	Хеми.	Интелектуален дефицит, тип Christianson	ХР / ХД
WES_124	7 / Ж	Задръжка в НПП	<i>MTOR</i>	NC_000001.10:g.11174459C>T NM_004958.4:c.7216G>A NP_004949.1:p.Val2406Met	Хет.	Синдром на Smith-Kingsmore	АД
WES_241	5 / М	Умерена умствена изостаналост. Други неуточнени гърчове	<i>DYRK1A</i>	NC_000021.8:g.38852961C>T NM_001347721.2:c.322C>T NP_001334650.1:p.Arg108Ter	Хет.	ИНПР	АД
WES_251	1/М	Grand mal припадъци. Разстройство в обмяната на аминокиселини с разклонена верига	<i>TH</i>	NC_000011.9:g.2189135C>T NM_000360.4:c.605G>A NP_000351.2:p.Arg202His	Хет.	Синдром на Segawa	АР
				NC_000011.9:g.2189126A>G NM_000360.4:c.614T>C NP_000351.2:p.Leu205Pro	Хет.		
WES_279	15 / М	ДЦП. Идиопатична нефамилна дистония	<i>CSNK2A1</i>	NC_000020.10:g.478391G>A NM_177559.3:c.400C>T NP_808227.1:p.(Arg134Ter)	Хет.	Синдром на Okur-Chung	АД
WES_317	5 / Ж	Задръжка в НПП и эпилепсия	<i>TRMT1</i>	NC_000019.9:g.13216374G>A NM_017722.4:c.1630C>T NP_060192.1:p.(Arg544Ter)	Хом.	ИНПР	АР
WES_343	8 / М	Други неуточнени гърчове	<i>GPHN</i>	NC_000014.9:g.66681106G>C NM_020806.4:c.65-1G>C	Хет.	Дефицит на молибденовия кофактор / Аутизъм, гърчове и шизофрения	АР/ АД
WES_357	9 / Ж	Лека умствена изостаналост и эпилепсия	<i>PRODH</i>	NC_000022.10:g.18905964C>T NM_016335.5:c.1292G>A NP_057419.5:p.Arg431His	Хет.	Хиперпролине- мия, тип 1	АР
				NC_000022.10:g.18905859G>A NM_016335.5:c.1397C>T NP_057419.5:p.Thr466Met	Хет.		
WES_467	7 / Ж	Умерена умствена изостаналост и эпилепсия. Разстройство на експресивната реч	<i>MECP2</i>	NC_000023.10:g.153296378G>C NM_001110792.2:c.937C>G NP_001104262.1: p.Leu313Val	Хет.	Синдром на Rett	ХД
WES_541	4 / М	Локализирана (фокална) (парциална) симптоматична эпилепсия	<i>SLC6A8</i>	NC_000023.10:152960530G>A NM_005629.4:c.1769G>A NP_005620.1:p.Arg590His	Хеми.	Синдром на церебрална креатиннова недостатъчност тип 1	ХР
WGS_053	1 / М	Метаболитна болест	<i>TH</i>	NC_000011.9:g.2189135C>T NM_000360.4:c.605G>A NP_000351.2:p.Arg202His	Хет.	Синдром на Segawa	АР
				NC_000011.9:g.2186980G>A NM_000360.4:c.1118C>T NP_000351.2:p.Thr373Met	Хет.		
Пациенти с комплексна клинична картина (Група 5)							
WES_015	Ф*	Вътреутробна ретардация	<i>POLG</i>	NC_000015.9:g.89868870G>A NM_001126131.2:c.1760C>T NP_001119603.1:p.Pro587Leu	Хет.	POLG- асоциирани заболявания	АД / АР
				NC_000015.9:g.89873415G>A NM_001126131.2:c.752C>T NP_001119603.1:p.Thr251Ile	Хет.		
WES_028	12 / Ж	Синдром на Pitt- Hopkins	<i>TCF4</i>	NC_000018.9:g.52896081G>A NM_001083962.2:c.1876C>T	Хет.	Синдром на Pitt- Hopkins	АД

				NP_001077431.1:p.Arg626Ter			
WES_133	2 / Ж	Левкодистрофия	UFMI	NC_000013.10:g.38923902_38923904del NM_001286704.1:c.-273_-271delTCA	Хом.	Левкодистрофия с хипомиелинизация, тип 14	AP
WES_172	14 / М	Пълна агенезия на корпус калозум. Друг вид ДЦП малформативен синдром. Вътрешна хидроцефалия.	SIX5	NC_000019.9:g.46268923_46268926dupCCAG NM_175875.5:c.2053_2056dupCTG NP_787071.3:p.(Gly686AlafsTer18)	Хет.	Бранхиоторенален синдром	АД
WES_238	3 / М	Световъртеж от централен произход. Други малформации на мозъка.	COL18A1	NC_000021.8:g.46897323A>G NM_030582.4:c.1469-2A>G	Хет.	Синдром на Knobloch, тип 1	AP
				NC_000021.8:g.46925341C>A NM_030582.3:c.3623C>A NP_085059.2:p.(Ser1208Ter)	Хет.		
WES_259	4 / Ж	Grand mal припадъци (с малки припадъци [petit mal] или без тях), неуточнени. ИНПР. Други видове хидроцефалия. Малформативен синдром.	POMGNT1	NC_000001.10:g.46662690G>A NM_017739.4:c.187C>T NP_060209.4:p.(Arg63Ter)	Хом.	Вродена мускулна дистрофия-Дистрогликанопатия, тип А3 (Синдром на Walker-Warburg)	AP
WES_271	1 / Ж	Микроцефалия. Синдром на вродени аномалии с предимно засягане на лицевата област	ERCC6	NC_000010.10:g.50684322_50684323del NM_000124.4:c.2321_2322del NP_000115.1:p.(Lys774Serfs*7)	Хом.	Синдромът на Cockayne	AP
WGS_031	1 / Ж	Синдром на вродени аномалии с предимно засягане на лицевата област	SIK3	NC_000011.9:g.116747674A>C NM_025164.6:c.950T>G NP_079440.3:p.Met317Arg	Хом.	Спондилоепи-метафизарна дисплазия, тип Краков	AP
			P4HA1	NC_000010.10:g.74803709G>A NM_000917.4:c.1084C>T NP_000908.2:p.(Arg362Ter)	Хом.	Колагенопатия	AP
WGS_044	8м. / Ж	Синдром на Jarcho-Levin	LZTR1	NC_000022.10:g.21348232dup NM_006767.4:c.1373dup NP_006758.2:p.(His459Profs*210)	Хет.	Шваноматоза / Синдром на Noonan, тип 2	АД / AP
WGS_046	1 / Ж	Синдром на вродени аномалии с предимно засягане на лицевата област. Grand mal припадъци (с малки пристъпи (petit mal) или без тях), неуточнени	UFMI	NC_000013.10:g.38923902_38923904del NM_001286704.1:c.-273_-271delTCA	Хом.	Левкодистрофия с хипомиелинизация, тип 14	AP
WGS_047	4 м / М	Митохондриална болест. Неуточнен малформативен синдром. ОДН	GABRB1	NC_000004.11:g.47408761A>T NM_000812.4:c.898A>T NP_000803.2:p.Ile300Phe	Хет.	Епилептична енцефалопатия, тип 45	АД
WGS_057	8 / М	Друга детска парализа. Тежка умствена изостаналост.	ADCY5	NC_000003.11:g.123014949G>T NM_183357.3:c.3045C>A NP_899200.1:p.Asp1015Glu	Хет.	ADCY5-асоцирана дискинезия и ИНПР с хиперкинетични движения.	AP / АД
WGS_083	8 / М	Митохондриална болест. Leigh синдром.	SERAC1	NC_000006.11:g.158534471_158534487delinsCCTGTTGGT NC_000006.11(NM_032861.4):c.182_2_182+10delinsACCAACAGG	Хом.	MEGDEL синдром	AP
WGS_140	3 / Ж	Двустранна атрофия на зрителните нерви на двете очи	KIF1A	NC_000002.11:g.241723194G>A NM_001244008.2:c.760C>T NP_001230937.1:p.Arg254Trp	Хет.	NESCAV синдром	АД / AP
WGS_152	2 / Ж	Хидроцефалия, хипертофична кардиомиопатия	PTPN11	NC_000012.11:g.112915524A>G NM_002834.5:c.923A>G NP_002825.3:p.Asn308Ser	Хет.	синдром на Noonan / Синдром на LEOPARD	АД

* - унаследяване, АД - автозомно доминантен механизъм на унаследяване; АР – автозомно рецесивен механизъм на унаследяване; ХС – унаследяване свързано с Х хромозомата; ХД – Х-свързано доминантно унаследяване; ХР – Х-свързано рецесивно унаследяване; Ф* - фетус; ИНПР - изоставане в невропсихическото развитие; МЕОАЛ - митохондриална миопатия с/без оптична атрофия и обратима левкоенцефалопатия; АLС – амиотрофична латерална склероза; МС – множествена склероза; МEGDEL - 3-метилглутаконова ацидурия с глухота, енцефалопатия и Leigh-подобен синдром; Хет. – хетерозигот; Хом.- хомозигот; Хем. – хемизигот.

3. Варианти с неясна клинична значимост асоциирани с клиничния фенотип на пациентите

Варианти с неясно клинично значение се откриват при всеки изследван. Това са варианти с много ниска популационна честота ($<0,01$) за които към момента на изследването информацията е недостатъчна, за да бъдат класифицирани еднозначно като патогенни или бенигнни. След време с натрупване на клинична и генетична информация от изследвания на повече хора е възможно тези варианти да бъдат рекласифицирани. Броя на идентифицираните варианти с неясна клинична значимост е пропорционален с броя на гените, които се анализират при биоинформатичния анализ т.е. колкото е по-голям броя на анализираните гени, толкова по-вече варианти с неясна клинична значимост ще бъдат идентифицирани.

По време на анализа при седем пациента от различните групи идентифицирахме варианти с неясна клинична значимост (VUS), които би могло да са асоциирани с клиничната картина на пациентите.

При двама пациенти бяха установени два варианта в ген с неясна клинична значимост (GUS, gene of unknown significance), това ще рече, че гена в които са идентифицирани, към момента на изследването не е асоцииран с конкретно заболяване. Проучвайки продукта на този ген, молекулярните механизми и сигналните пътища в който участва, смятаме, че това е добър кандидат, който би могъл да обясни молекулярната патогенеза на при двамата засегнати. Подробно описание на тези варианти е направено в таблица 2. Обсъждането и публикуваните изследвания в подкрепа на клиничната им значимост и патогенеза са разисквани при обсъждането на всеки пациенти отделно.

Таблица 2. Варианти с неясна клинична значимост, които може да са асоциирани с клиничния фенотип на пациентите.

Номер	Въз./ Пол	Дифер. диагноза	Ген	Номенклатура по HGVS	Генотип	Диагноза асоциирана с идентифицираните гени	*
Пациенти с невромускулни заболявания							
WGS_100	36 / Ж	Съмнение за MC	<i>TLR7</i>	NC_000023.10:g.12906068del NC_000023.10(NM_016562.4):c.2441del NP_057646.1:p.(Cys814LeufsTer12)	Хет.	Системен лупус еритематозус, тип 17 / Имунна недостатъчност при инфекция със SARS-CoV-2	ХД / ХР
WGS_131	10 / М	Миопатия	<i>MTM1</i>	NC_000023.10:g.149757952_149759891delinsCA NC_000023.10(NM_000252.3):c.-10-3115_-10-1176delinsCA	Хеми.	Центронуклеарна миопатия	ХР
Пациенти с нарушения в нервно-психическото развитие							
WGS_001	10 / М	Задръжка в НПП	<i>ABCA13</i>	NC_000007.13:g.48431694C>T NM_152701.5:c.11831C>T NP_689914.3:p.Ala3944Val	Хет.	ИНПП без епилепсия	АД / АР
				NC_000007.13:g.48556229_48556232del NM_152701.5:c.13641-92_13641-89del	Хет.		
WGS_003	20 / М	Съмнение ИНПП, психическо разстройство	<i>PCDH19</i>	NC_000023.10:g.99663514A>T NM_001184880.1:c.82T>A NP_001171809.1:p.Ser28Thr	Хеми.	Поведенчески нарушения при мъже и Епилептична енцефалопатия при жени	ХС
Пациенти с епилепсия без ИНПП							
WES_007	4 / М	Епилепсия. GEFS+ синдром	<i>SCN1B</i>	NC_000019.9:g.35530050G>A NM_001037.5:c.478G>A NP_001028.1:p.Glu160Lys	Хет.	Генерализирана епилепсия с фебрилни гърчове	АД
Пациенти с комплексна клинична картина							
WGS_067	7 / М	Тежка умствена изостаналост. Церебеларна атаксия	<i>GRM5</i>	NC_000011.9:g.88780470C>A NM_001143831.3:c.571G>T NP_001137303.1:p.Val191Phe	Хет.	-	-
				NC_000011.9:g.88780601A>G NM_001143831.3:c.440T>C NP_001137303.1:p.Ile147Thr	Хет.	-	-
WGS_068	10 / Ж	Тежка умствена изостаналост. Церебеларна атаксия	<i>GRM5</i>	NC_000011.9:g.88780470C>A NM_001143831.3:c.571G>T NP_001137303.1:p.Val191Phe	Хет.	-	-
				NC_000011.9:g.88780601A>G NM_001143831.3:c.440T>C NP_001137303.1:p.Ile147Thr	Хет.	-	-

V. ДИСКУСИЯ

1. Клинични данни и обсъждане на молекулярно-генетичните резултати на пациентите от различните групи

1.2 Пациенти със заболявания на периферната нервна система и мускулатурата

В този раздел са описани пациентите с идентифицирани патогенни и/или вероятно патогенни варианти, чиято молекулярна патогенеза е асоциирана с невромускулни заболявания. Описани са и пациенти с идентифицирани варианти с неясна клинична значимост, които би могло да са асоциирани с клиничната им картина.

1.2.1 Идентифицирани патологични варианти при пациенти със заболявания на периферната нервна система и мускулатурата

1.2.1.1 Пациент WES_019

Клинична картина

Пациентката е на 17 годишна възраст с поставената клинична диагноза - полимиозит.

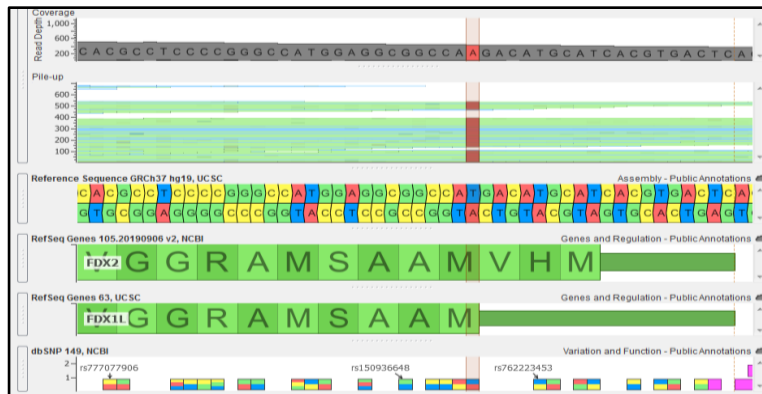
Молекулярно-генетично изследване

Беше извършено цялостно екзомно секвениране и анализ на гени асоциирани с различни невромускулни заболявания.

Резултат

В следствие на таргетния анализ на данните, установихме хомозиготно носителство на един патогенен вариант в гена *FDX2* (Ferredoxin 2) (Фигура 1).

Ген:	<i>FDX2 (FDX1L)</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000019.9:g.10426672T>A NM_001031734.4:c.10A>T NP_001026904.2:p.Met4Leu	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	rs587777600	Вид на мутацията:	missense / start loss
Генотип:	хомозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PVS1, PS4_moderate, PM1, PM2, PM5_Supporting
Класификация по ACMG:	<u>патогенен</u>		



Фигура 1: Визуализация на варианта с.10A>Т в гена *FDX2* при пациентката

Информация за гена: Фередоксините са желязо-серни протеини, които са изследвани в продължение на десетилетия поради участието им в монооксигеназните реакции, катализирани от р450 ензими. Човешкият геном, съдържа два хомоложни фередоксина, фередоксин 1 (*FDX1*) и фередоксин 2 (*FDX2*) (8, 9). Патологични варианти в гена *FDX2* са асоциирани с митохондриална миопатия с/без оптична атрофия и обратима левкоенцефалопатия (МЕОАЛ). *FDX2*-асоциираната митохондриална миопатия е рядко невромускулно заболяване, което се унаследява по автозомно рецесивен начин (OMIM ID: 251900).

Честота на заболяването: Заболяването не е описано в базата данни за редки болести и лекарства сираци Orphanet.

1.2.1.2 Пациент WES_071

Клинична картина

Пациентът е на 12 години с поставената клинична диагноза - идиопатична фамилна дистония.

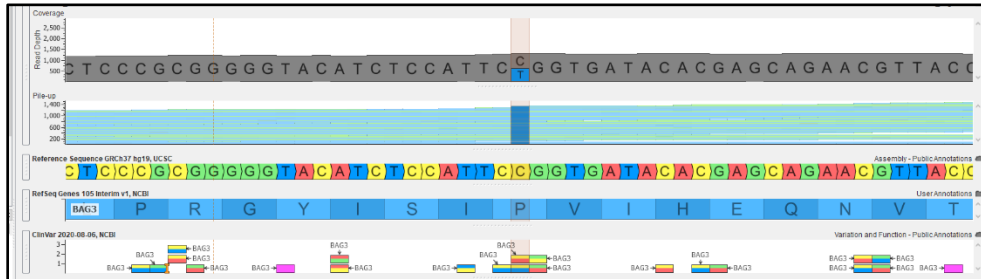
Молекулярно-генетично изследване

При пациента беше извършено ЦЕС и анализ на гени асоциирани с различни невромускулни заболявания.

Резултат

В следствие на таргетния анализ на данните, беше установен един известен патогенен вариант в гена *BAG3* (*BCL2-associated Athanogene 3*) (Фигура 2).

Ген:	BAG3		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000010.10:g.121431885C>T NM_004281.3:c.626C>T NP_004272.2:p.Pro209Leu	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	rs121918312	Вид на мутацията:	missense
Генотип:	хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PS3, PS4, PM1, PM2, PP3 и PP5
Класификация по ACMG:	<u>патогенен</u>		



Фигура 2: Визуализация на варианта с.626C>T в гена *BAG3* при пациента.

Информация за гена: Продуктът на гена *BAG3* (Bcl2-associated athanogene 3) е част от BAG (Bcl-2 associated athanogene) семейство на ко-шаперони. *BAG3* участва в нормалното развитие на нервната система, сърцето и мускулните клетки. Патогенни варианти в гена са асоциирани с миофибриларна миопатия. Заболяването е автозомно доминантно и се проявява при хетерозиготни носители на един патологичен алел (OMIM ID: 612954).

Честота на заболяването: Заболяването е описано в базата данни за редки болести и лекарства сираци, Orphanet с честота <1 / 1 000 000.

1.2.1.3 Пациент WES_358

Клинична картина

Пациентът е момче на 13 години с поставена диагноза – ранна малко мозъчна атаксия.

Молекулярно-генетично изследване

Беше извършено цялостно екзомно секвениране и анализ на гени, асоциирани с невромускулни заболявания.

Резултат

В следствие на таргетния анализ на данните, установихме хомозиготно носителство на патогенен вариант в гена *NPCI* (*NPC intracellular cholesterol transporter 1*) (Фигура 3).

Ген:	<i>NPC1</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000018.9:g.21141449T>A; NM_000271.5:c.506A>T; NP_000262.2:p.Asn169Ile	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	-	Вид на мутацията:	missense
Генотип:	ХОМОЗИГОТ	Критерии за класификация по ACMG:	PS4_Moderate, PM2, PM3, PP3 и PP5
Класификация по ACMG:	<u>патогенен</u>		



Фигура 3: Визуализация на варианта с.506A>T в гена *NPC1* при пациента

Информация за гена: Генът *NPC1* (*NPC intracellular cholesterol transporter 1*) кодира протеин, който има съществена роля за вътреклетъчния транспорт на холестерол. Патологични варианти в гена са асоциирани с болест на Niemann-Pick, тип C, която се проявява при хомозиготни и при съставни хетерозиготни носители на патогенни алели в гена *NPC1* (OMIM ID: 257220).

Честота на заболяването: Заболяването е описано в Orphanet с честота 1:150 000.

1.2.1.4 Пациент WES_371

Клинична картина

Пациентът е момче е на 13 годишна възраст с поставена диагноза - спастична параплегия и болест на Паркинсон.

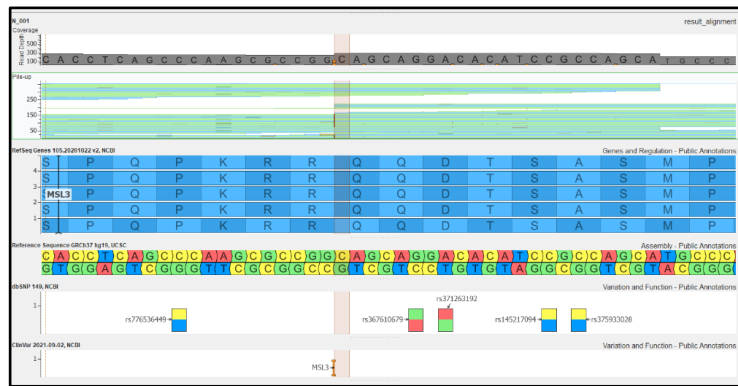
Молекулярно-генетично изследване

Беше извършено цялостно екзомно секвениране и анализ на гени асоциирани с различни неврологични заболявания.

Резултат

В следствие на таргетния анализ на данните, беше установено хемизиготно носителство на известен патогенен вариант в гена *MSL3* (*MSL complex subunit 3*) (Фигура 4).

Ген:	<i>MSL3</i>	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000023.10:g.11783802_11783818dup NM_078629.4:c.1125_1141dup NP_523353.2:p.(Met381Argfs*30)	Вид на мутацията:	frameshift insertion
rs ID:	-	Критерии за класификация по ACMG:	PVS1, PM2 и PP5
Генотип:	хемизигот	Класификация по ACMG:	патогенен



Фигура 4: Визуализация на варианта c.1125_1141dup в гена *MSL3* при пациента

Информация за гена: Генът *MSL3* (*MSL complex subunit 3*) кодира протеин, който участва в ремоделирането на хроматина, регулацията на транскрипцията и инактивирането на X-хромозомата. Патологични варианти в *MSL3* са асоциирани с X-свързан доминантен синдром тип Basilicata-Akhtar. Заболяването се проявява при хетерозиготни (жени) и хемизиготни (мъже) носители на патологични алели в гена *MSL3* (10, 11). Синдромът на Basilicata-Akhtar е описан за първи път през 2018 година от Basilicata F. и Akhtar A. (OMIM ID: 301032).

Честота на заболяването: Заболяването не е описано в базата данни Orphanet, според международната фондация MSL3-syndrome, в световен мащаб има описани около 50 случаи на синдрома.

1.2.1.5 Пациент WGS_016

Клинична картина

Касае се за момче на 10 годишна възраст с поставена диагноза – митохондриална болест.

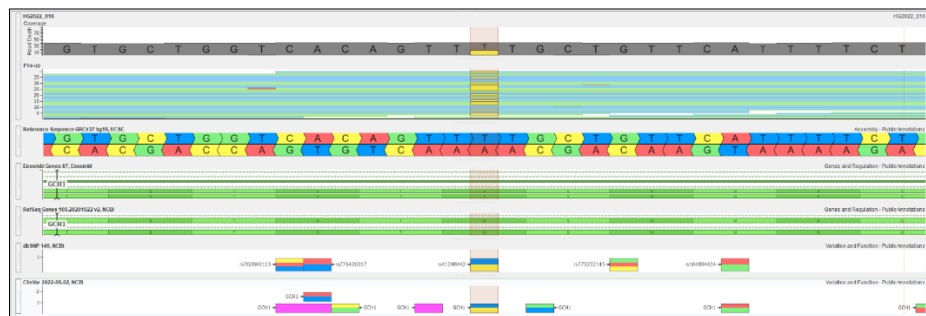
Молекулярно-генетично изследване

Беше извършено цялостно геномно секвениране и анализ на гени асоциирани с различни неврологични заболявания.

Резултат

В следствие на таргетния анализ на данните от ЦГС, бе установено хетерозиготно носителство на известен вероятно патогенен вариант в гена *GCH1* (*GTP cyclohydrolase I*) (Фигура 5).

Ген:	<i>GCH1</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000014.8:g.55310817T>C NM_000161.3:c.671A>G NP_000152.1:p.Lys224Arg	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0.0003709
rs ID:	rs41298442	Вид на мутацията:	missense
Генотип:	Хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PS4, PM2, PP1 и PP2
Класификация по ACMG:	вероятно патогенен		



Фигура 5. Визуализация на варианта c.671A>G в гена *GCH1* при пациента

Информация за гена: Генът *GCH1* кодира ензима GTP циклохидролаза I, който катализира първата стъпка в биосинтезата на тетрахидробиоптерин (BH4). BH4 е основен кофактор на хидроксилазите метаболизиращи фенилаланин, тирозин и триптофан, като по този начин участва в регулацията на нивата на допамин и серотонин в мозъка (12). Патологичните варианти в гена водят до клиничните прояви на L-DOPA зависима дистония с/без хиперфенилаланинемия. Заболяването е неврометаболитно, като се наблюдават форми с различен тип на унаследяване (автозомно-рецесивно или автозомно-

доминантно). Заболяването се проявява при хетерозиготни, хомозиготни или съставни хетерозиготни носители на патогенни алели в *GCHI* (OMIM ID: 602433).

Честота на заболяването: Заболяването е описано в базата данни Orphanet с честота 1-9 / 1 000 000.

1.2.1.6 Пациент WGS_027

Клинична картина

Пациентът е момче на 15 години с поставена диагноза – полимиозит.

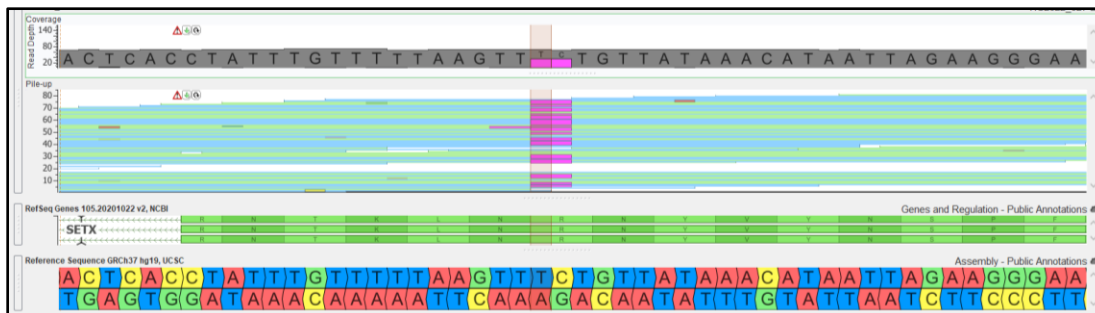
Молекулярно-генетично изследване

Беше извършено цялостно геномно секвениране и анализ на гени асоциирани с невромускулни заболявания.

Резултат

В следствие на таргетния анализ на данните, бе установено хетерозиготно носителство на вероятно патогенен вариант в гена *SETX* (*Senataxin*) (Фигура 6).

Ген:	<i>SETX</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000009.11:g.135153475_135153476del NM_015046.7:c.6824_6825del NP_055861.3:p.(Arg2275Lysfs*6)	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	-	Вид на мутацията:	frameshift deletion
Генотип:	Хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PVS1, PM2 и PP4
Класификация по ACMG:	<u>вероятно патогенен</u>		



Фигура 6. Визуализация на варианта c.6824_6825del в гена *SETX* при пациента

Информация за гена: Продукта на гена е АТР-зависима хеликаза, която участва при формирането на РНК:ДНК хибриди (R-примки) по време на транскрипция, генната регулация, стабилността на теломерите, инактивацията на X хромозомата по време на мейоза и митоза. Учените я наричат „пазителя на генома“, защото предотвратява процесите на невродегенерация и е основния фактор при запазване на геномната стабилност (13). Патологични мутации в гена *SETX* са асоциирани с две отделни неврологични заболявания - атаксия с окуломоторна апраксия тип 2 (автозомно рецесивно унаследяване) и амиотрофична латерална склероза тип 4, ювенилна (автозомно доминантно унаследяване) (OMIM ID: 602433).

Честота на заболяването: Заболяването е описано в базата данни Orphanet с честота <1 / 1 000 000.

1.2.1.7 Пациент WGS_077

Клинична картина

Касае за момиче на 1 година и поставената диагноза – мускулна хипотония.

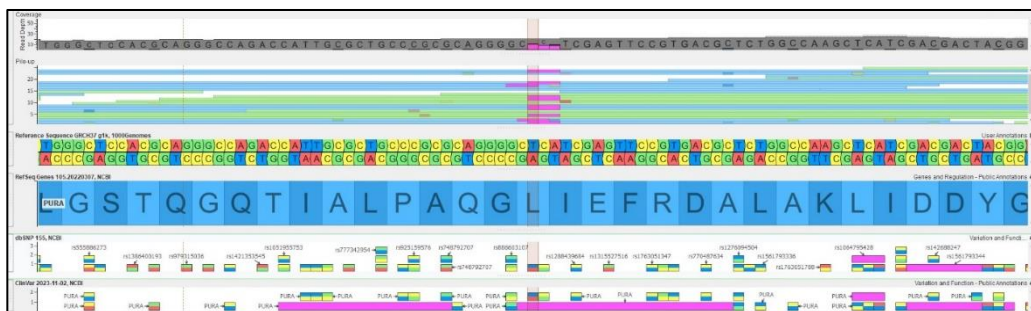
Молекулярно-генетично изследване

Беше извършено цялостно геномно секвениране и анализ на гени, асоциирани с невромускулни заболявания.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните бе установено хетерозиготно носителство на вероятно патогенен вариант в гена *PURA* (*Purine-rich element-binding protein A*)(Фигура 7).

Ген:	<i>PURA</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000005.9:g.139494350_139494352 del NM_005859.5:c.586_588del NP_005850.1:p.Ile196del	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	-	Вид на мутацията:	Inframe deletion
Генотип:	Хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PM1, PM2, PM4 и PM6
Класификация по ACMG:	<u>вероятно патогенен</u>		



Фигура 7. Визуализация на варианта c.586_588del в гена *PURA*

Информация за гена: Продукта на гена е консервативен протеин (Pur-alpha) с регулаторна роля при ДНК репликацията, генната транскрипция, РНК транспорта и иРНК трансляцията. *PURA* е от съществено значение за нормалното развитие на мозъка, образуването на синапси и пролиферацията на неврони, олигодендроцити и астроцити в ЦНС (14). Патологични варианти в гена са асоциирани с *PURA* – асоцииран синдром. Заболяването се унаследява по автозомно доминантен механизъм и се проявява при хетерозиготни носители на патологичен алел в гена *PURA* (OMIM ID: 616158).

Честота на заболяването: Заболяването е описано в базата данни Orphanet с честота <1 / 1 000 000.

1.2.2 Идентифицирани варианти с неясна клинична значимост при пациенти със заболявания на периферната нервна система и мускулатурата

1.2.2.1 Пациент WGS_100

Клинична картина

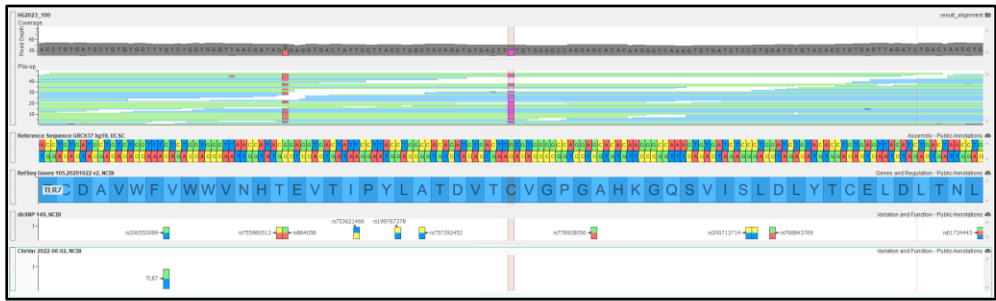
Пациентката е на 35 години със съмнение за множествена склероза и прогресивна неврологична симптоматика, изясняваща се в парализа на долните крайници.

Молекулярно-генетично изследване

При пациентката беше извършено цялостно геномно секвениране и анализ на гени асоциирани с различни неврологични заболявания.

Резултат: Вследствие на таргетния анализ на данните, бе установено хетерозиготно носителство на един вариант с неясна клинична значимост в гена *TLR7* (Фигура 8).

Ген:	<i>TLR7</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000023.10:g.12906068del NM_016562.4:c.2441del NP_057646.1:p.(Cys814LeufsTer12)	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	-	Вид на мутацията:	Frameshift делеция
Генотип:	Хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PM2
Класификация по ACMG:	<u>вариант с неясна клинична значимост</u>		



Фигура 8. Визуализация на варианта *TLR7*:c.2441del при пациентката

Информация за гена: Генът *TLR7* (*Toll-like receptor 7*) кодира рецепторен протеин, който е важен елемент от системата на вродения имунитет. Експресира се във всички клетки и тъкани, вкл. в микроглията и в невроните на ЦНС, като участва в производството на противовъзпалителни медиатори: интерферони, цитокини и хемокини (15, 16). Промяна на експресията и функцията на рецептора води до апоптоза на неврони и проява на невроимунни заболявания (15, 17).

Патологични варианти в гена водят до имунна недостатъчност при инфекция със SARS-CoV-2 (X-рецесивно унаследяване) и със системен лупус еритематодес, тип 17 (X-свързано доминантно). Имунологичните изследвания на пациентката не са в подкрепа на лупус, ние смятаме, че вариантът води до аномална продукция на интерферон, което от една страна действа протективно при вирусни инфекции (пациентката е прекарала лека форма на SARS-CoV-2 инфекция, за разлика от нейния баща от който го е унаследила варианта), но може да „отключи“ комплексна неврологична клиника вследствие на вирусна инфекция.

1.2.2.2 Пациент WGS_131

Клинична картина

Пациентът е момче на 10 години и поставена работна диагноза е миопатия.

Молекулярно-генетично изследване

При пациента беше извършено цялостно геномно секвениране и анализ на гени, асоциирани с различни невромускулни заболявания.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните бе установено хемизиготно носителство на един вариант с неясна клинична значимост в гена *MTM1* (*Myotubularin*) (Фигура 9).

Ген:	<i>MTM1</i>	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000023.10:g.149757952_149759891delinsCA NC_000023.10(NM_000252.3):c.-10-3115_-10-1176delinsCA	Вид на мутацията:	intronic inDel
rs ID:	-	Критерии за класификация по ACMG:	PM2
Генотип:	Хемизигот		
Класификация по ACMG:	<u>вариант с неясна клинична значимост</u>		



Фигура 9. Визуализация на варианта *MTM1:c.-10-3115_-10-1176delinsCA*

Информация за гена: Продуктът на гена *MTM1* (*Myotubularin*) е тирозин фосфатаза, локализирана в цитозола. Миотубуларин-1 участва в диференциацията на мускулните клетки и липидния метаболизъм. (18). Дефекти в гена са асоциирани с центронуклеарна миопатия (ЦНМ). Състоянието се унаследява по X-рецесивен механизъм и се проявява при хемизиготни носители на един патогенен алел.

1.2.3 Обобщение на получените резултати при пациентите с невромускулни заболявания

В настоящата група, бяха изследвани седемнадесет пациенти със засегната периферната нервна система и мускулатура, като десет бяха изследвани, чрез цялостно екзомно секвениране, а седем, чрез цялостно геномно секвениране. При седем пациента, бяха установени патологични варианти, които обясняват патологичния механизъм на заболяването. При двама пациенти, бе установен по един вариант с неясна клинична значимост, които са добри кандидати и може да обяснят клиничната картина на засегнатите пациенти. При осем пациенти, към момента на извършване на анализа на данните от ЦЕС или ЦГС не бяха установени варианти, асоциирани с фенотипа.

1.3 Пациенти със нарушение в неврологичното и интелектуалното развитие

Нарушенията на неврологичното и интелектуалното развитие (ИНПР) представляват група генетично и клинично хетерогенни заболявания, засягащи развитието и функцията на мозъка. Заболяванията са с различна етиология и са асоциирани с нарушение в груба и фина моторика, говора и експресивната реч, невъзможност за решаване на проблеми и проблемно социално-адаптивно поведение.

1.3.1 Идентифицирани патогенни варианти при пациенти с изоставане в нервно-психическото развитие без епилепсия

1.3.1.1 Пациент WES_143

Клинична картина

Пациента е момче на 1 година с лицев дисморфизъм и съмнение за синдром на Noonan.

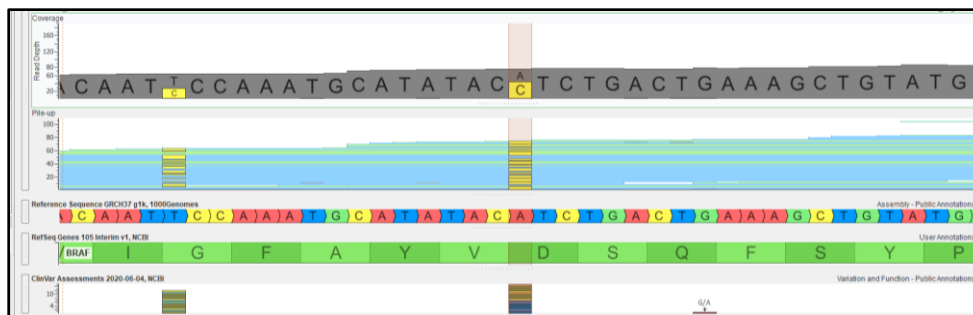
Молекулярно-генетично изследване

При пациента, беше извършено цялостно екзомно секвениране и анализ на гени, асоциирани с малформативни синдроми и интелектуален дефицит.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, бе установено хетерозиготно носителство на патогенен вариант в гена *BRAF* (*B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase*)(Фигура 10).

Ген:	<i>BRAF</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000007.13:g.140449165A>C NM_001374258.1:c.2034T>G NP_001361187.1:p.Asp678Glu	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	rs180177042	Вид на мутацията:	missense
Генотип:	Хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PS3, PS4, PM2, PP5
Класификация по ACMG:	<u>патогенен вариант</u>		



Фигура 10. Визуализация на варианта *BRAF:c.2034T>G*

Информация за гена: Генът *BRAF* (*B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase*) кодира серин/треонин киназа, която е елемент от RAS-MAPK сигналния път и участва в регулацията на ключови процеси като растеж и делене на клетките (19). Герминативните патологични варианти на *BRAF* се проявяват при хетерозиготни носители като автозомно-доминантна форма на расопатия с фенотип на синдром на Noonan, LEOPARD или Кардио-фацио-кутанен синдром (OMIM ID: 164757).

Честота на заболяването: Заболяването е описано в базата данни Orphanet, но няма конкретна честота. Смята се, че в световен мащаб са описани около 300-400 случая.

1.3.1.2 Пациент WES_247

Клинична картина

Касае се за момче на 5 години с задръжка на нервно-психичното развитие.

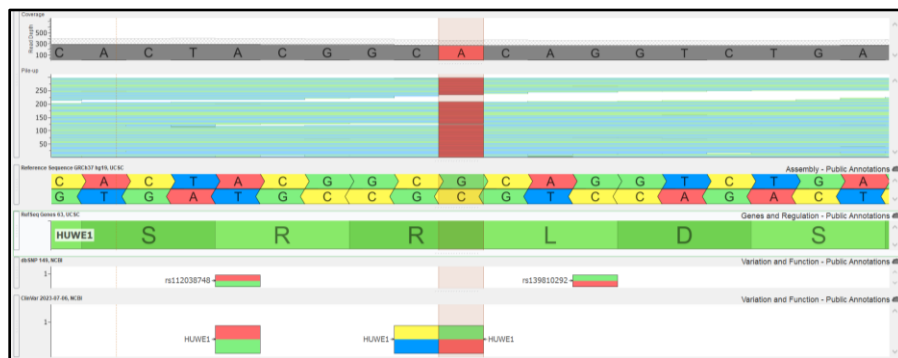
Молекулярно-генетично изследване

При пациента беше извършено цялостно екзомно секвениране и анализ на гени, асоциирани с ИНПР.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните бе установено хемизиготно носителство на патогенен вариант в гена *HUWE1* (*HECT, UBA And WWE Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 1*) (Фигура 11).

Ген:	<i>HUWE1</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000023.10:g.53578039G>A NM_031407.7:c.9208C>T NP_113584.3:p.Arg3070Cys	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	rs886041876	Вид на мутацията:	missense
Генотип:	Хемизигот	Критерии за класификация по ACMG:	PS4, PM2, PM5, PP3 и PP5
Класификация по ACMG:	патогенен вариант		



Фигура 11. Визуализация на варианта *HUWE1*:c.9208C>T

Информация за гена: Генът *HUWE1* (*HECT, UBA And WWE Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 1*) кодира една от Е3 убиквитин лигазите. Нормалната функция на протеина е важна за процеси, като апоптоза, репарация на ДНК, синаптогенезата, диференциация на невроните в кортекса и хипокампуса на ЦНС (20). Патогенни варианти в гена се проявяват при мъжете хемизиготни носители като синдромна форма на интелектуален дефицит, тип Turner (OMIM ID: 309590).

Честота на заболяването: Заболяването няма честота в базата данни Orphanet. Смята се, че в световен мащаб са описани около 300-400 случая.

1.3.1.3 Пациент WGS_004

Клинична картина

Пациентът е момче на 11 години с хиперактивност, дефицит на вниманието и изоставане на социално-комуникативните умения.

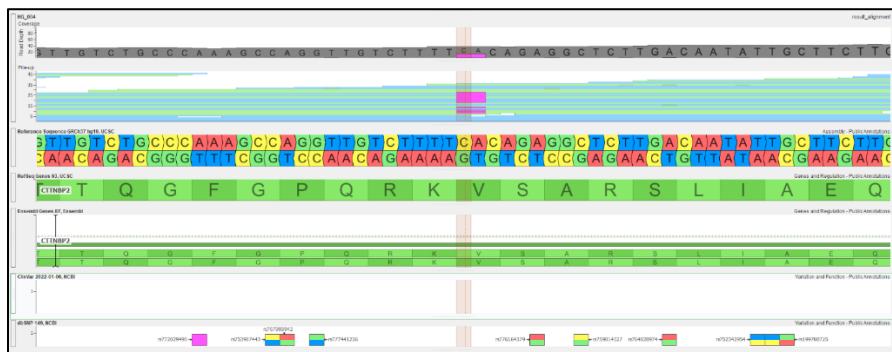
Молекулярно-генетично изследване

При пациента, беше извършено цялостно геномно секвениране и анализ на гени асоциирани с ИНПР.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, беше установено хетерозиготно носителство на вероятно патогенен вариант в гена *CTTNBP2* (*Cortactin Binding Protein 2*)(Фигура 12).

Ген:	<i>CTTNBP2</i>	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000007.13:g.117365241_117365242del NM_033427.2:c.4127_4128del NP_219499.1:p.(Val1376Glufs*12)	Вид на мутацията:	Frameshift делеция
rs ID:	-	Критерии за класификация по ACMG:	PVS1 и PM2
Генотип:	Хетерозигот	Класификация по ACMG:	вероятно патогенен



Фигура 12. Визуализация на варианта с.4127_4128del в гена *CTTNBP2* при пациента

Информация за гена: Генът *CTTNBP2* (*Cortactin Binding Protein 2*) кодира протеин – цитоскелетен регулатор на транспорта на CTTN (Cortactin) в невроните на хипокампуса, като по този начин контролира изграждането и поддържането на дендритите (21). През 2012 година, генът се класифицира като силен кандидат за асоциация с аутизъм (22-24). Функционалните изследвания върху мишки модели, показват различна тежест на клинична картина, зависимост от генотипа и вида на мутацията (OMIM ID: 609772) (25, 26).

Честота на заболяването: Аутизмът, асоцииран с този ген не е описан в базата данни Orphanet.

1.3.1.4 Пациент WGS_055

Клинична картина

Пациентът е момче на 3 години с лицев дисморфизъм и изоставане в развитието.

Молекулярно-генетично изследване

При пациента, беше извършено цялостно геномно секвениране и анализ на гени асоциирани с ИНПР.

Резултат

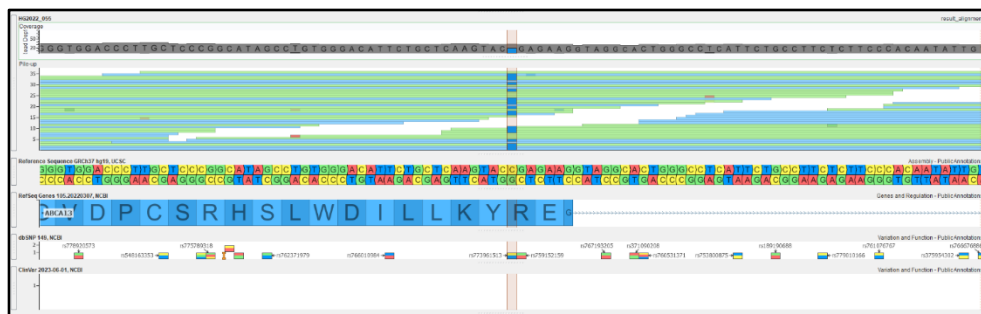
Вследствие на таргетния анализ на данните, бе установено съставно хетерозиготно носителство на два вероятно патогенни варианти в гена *ABCA13* (*ATP Binding Cassette Subfamily A Member 13*) (Фигура 13 и 14).

Ген:	<i>ABCA13</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000007.13:g.48311773del NC_000007.13(NM_152701.5):c.2510del NP_689914.3:p.(Leu837TyrfsTer21)	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	-	Вид на мутацията:	Frameshift делеция
Генотип:	Хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PVS1_Strong и PM2
Класификация по ACMG:	<u>вероятно патогенен вариант</u>		



Фигура 13. Визуализация на варианта *ABCA13:c.2510del*

Ген:	<i>ABCA13</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000007.13:g.48443470C>T NM_152701.5:c.12064C>T NP_689914.3:p.(Arg4022Ter)	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0.00004469
rs ID:	rs773961513	Вид на мутацията:	nonsense
Генотип:	Хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PVS1_Moderate, PS4_Supporting и PM2
Класификация по ACMG:	<u>вероятно патогенен вариант</u>		



Фигура 14. Визуализация на варианта *ABCA13:c.12064C>T*

Информация за гена: Протеинът, кодиран от гена *ABCA13* (*ATP-binding cassette, subfamily A, member 13*), участва в АТФ-зависим транспорт на холестерол и ганглиозиди през клетъчната мембрана на клетките. Дефекти в гена са асоциирани с предразположеност към шизофрения, биполарно разстройство и депресия (27). Gerik-Celebi et al. през 2023 докладват пациенти с изоставяне в развитието, носители на патологични варианти в гена *ABCA13* (28, 29). Според алгоритъма DOMINO при гена се очаква автозомно рецесивен модел на унаследяване (OMIM ID: 607807) (30).

Честота на заболяването: Заболяването не е описано в базата данни Orphanet. До момента са описани 10 пациенти от екип от Турция (29).

1.3.1.5 Пациент WGS_179

Клинична картина

Касае за момиче на 2 години с изоставане в развитието и поведенчески отклонения.

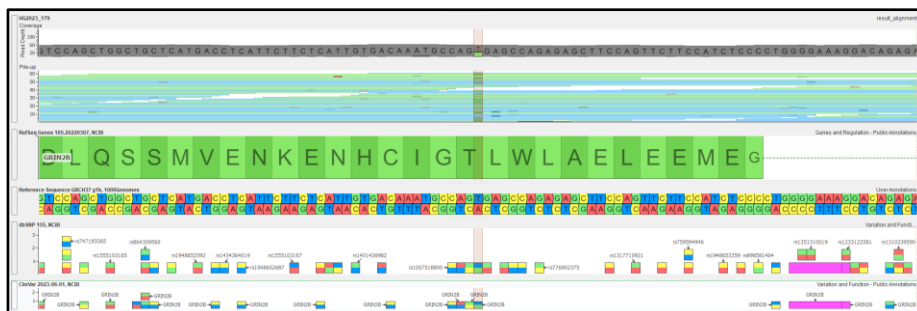
Молекулярно-генетично изследване

При пациентката, беше извършено цялостно геномно секвениране и анализ на гени асоциирани с ИНПР.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните беше установено хетерозиготно носителство на вероятно патогенен вариант в гена *GRIN2B* (*Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2B*) (Фигура 15).

Ген:	GRIN2B		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000012.11:g.13720165T>G NM_000834.5:c.2392A>C NP_000825.2:p.Thr798Pro	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	rs1948653017	Вид на мутацията:	missense
Генотип:	Хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PM2, PM6, PP2 и PP5
Класификация по ACMG:	<u>вероятно патогенен вариант</u>		



Фигура 15. Визуализация на варианта *GRIN2B:c.2392A>C*

Информация за гена: Генът *GRIN2B* (*Glutamate receptor, Ionotropic, N-methyl-D-aspartate, subunit 2B*) кодира N-метил-D-аспартатен рецептор, който представлява йонен канал, активиран от глутамат и глицин, пропусклив на Na⁺, K⁺ и Ca⁽²⁺⁾ йони. По-голямата част от NMDA - рецепторите са разположени постсинаптично върху дендритите и дендритните шипове. Участват при нормалното развитие на мозъка и синаптичната пластичност (31). Дефекти в гена са асоциирани с изоставане в развитието с или без епилепсия и епилептична енцефалопатия. Двете състояния се унаследяват по автозомно доминантен механизъм и се проявява при хетерозиготни носители на един патогенен алел (OMIM ID: 613970; 616139).

Честота на заболяването: Заболяването е описано в базата данни Orphanet с епидемиологична честота <1 / 1 000 000.

1.3.1.6 Пациент WGS_181

Клинична картина

Пациентката е на 7 години с не прогресиращ когнитивен дефицит и лека умствена изостаналост.

Молекулярно-генетично изследване

При пациентката беше извършено цялостно геномно секвениране и анализ на гени асоциирани с ИНПР.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, бе установено хетерозиготно носителство на вероятно патогенен вариант в гена *SPEN* (*Spn Family Transcriptional Repressor*) (Фигура 16).

Ген:	<i>SPEN</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000001.10:g.16258742G>T NM_015001.3:c.6007G>T NP_055816.2:p.(Glu2003Ter)	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	-	Вид на мутацията:	nonsense
Генотип:	Хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PVS1 и PM2
Класификация по ACMG:	вероятно патогенен вариант		



Фигура 16. Визуализация на варианта *SPEN:c.6007G>T*

Информация за гена: Генът *SPEN* (*SPEN Family transcriptional repressor*) кодира протеин (Msx2-interacting protein), който е хормоно-зависим транскрипционен репресор. Участва в ремоделирането на хроматина и в организирането на транскрипционните отговори на клетката. Ключова е ролята му при иницирането на процесите за инактивация на X хромозомата (32). Дефекти в гена са асоциирани със синдром на Radio-Tartaglia (RATARS), който се унаследява по автозомно доминантен механизъм (OMIM ID: 619312).

Честота на заболяването: Заболяването е описано в базата данни Orphanet, но няма епидемиологична честота.

1.3.2 Установени варианти с неясна клинична значимост при пациенти с изоставане в нервно-психическото развитие

От изследваните петнадесет пациенти от тази група, при двама бяха идентифицирани варианти с неясна клинична значимост, които може да са асоциирани с клиничния фенотип.

1.3.2.1 Пациент WGS_001

Клинична картина

Пациентът е момче на 10 години с диагноза ИНПР и аутизъм.

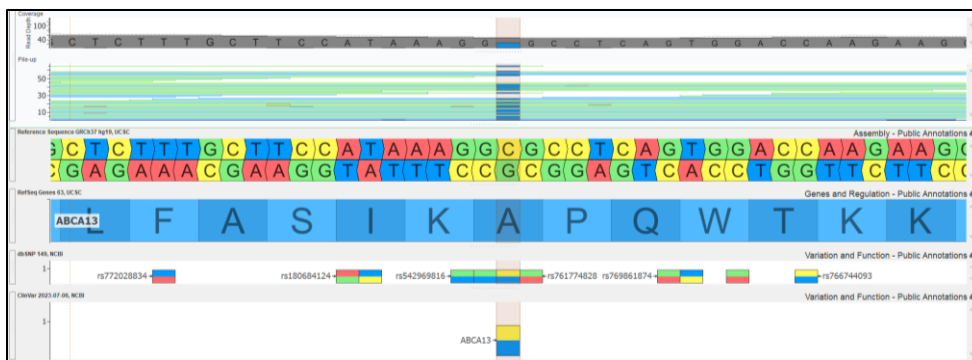
Молекулярно-генетично изследване

При пациента беше, извършено цялостно геномно секвениране и анализ на гени асоциирани с ИНПР.

Резултат

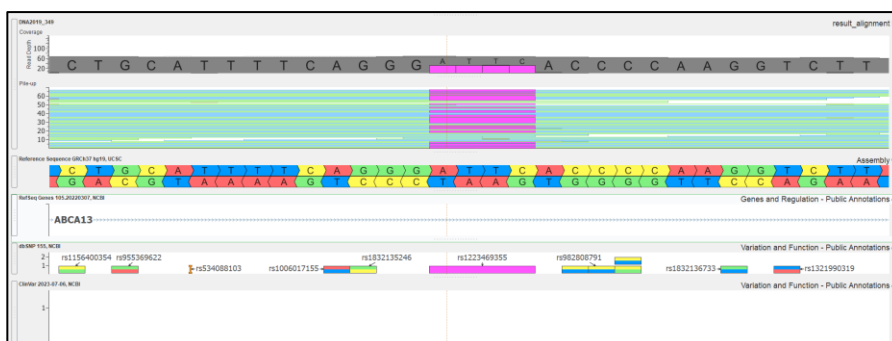
Вследствие на таргетния анализ на данните, бе установено съставно хетерозиготно носителство на два варианта с неясна клинична значимост в гена *ABCA13* (*ATP Binding Cassette Subfamily A Member 13*) (Фигури 17 и 18).

Ген:	<i>ABCA13</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000007.13:g.48431694C>T NM_152701.5:c.11831C>T NP_689914.3:p.Ala3944Val	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0.000176778
rs ID:	-	Вид на мутацията:	missense
Генотип:	хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PM2
Класификация по ACMG:	<u>вариант с неясна клинична значимост</u>		



Фигура 17. Визуализация на варианта *ABCA13*: c.11831C>T

Ген:	<i>ABCA13</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000007.13:g.48556229_48556232 del NC_000007.13 (NM_152701.5): c.13641-92_13641-89del	Популационна честота (gnomAD Genomes v3.1.2):	0
rs ID:	rs1223469355	Вид на мутацията:	интронна делеция
Генотип:	хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PM2
Класификация по ACMG:	<u>вариант с неясна клинична значимост</u>		



Фигура 18. Визуализация на варианта *ABCA13*:c.13641-92_13641-89del при пациента

Идентифицираните варианти бяха проверени за ефекта им върху сплайсинга, чрез платформата HSF (Human Splicing Finder) (33). Вариантът c.13641-92_13641-89del, води до създаване на ново сплайс-акцепторно място на 8 bp upstream в 51-ри интрон. Вариантът c.11831C>T, засяга и дестабилизира мотива ESE/ESS (Exonic splicing enhancer/Exonic splicing silencer), като по този начин повлиява сплайсинга. Подробно описание на гена и функцията на протеина, както и заболяването с което се асоциира са описани при пациент WGS_055.

1.3.2.2 Пациент WGS_003

Клинична картина

Пациентът е мъж на 20 години със съмнение за изоставане в развитието, психическо разстройство, полидактилия и алопеция.

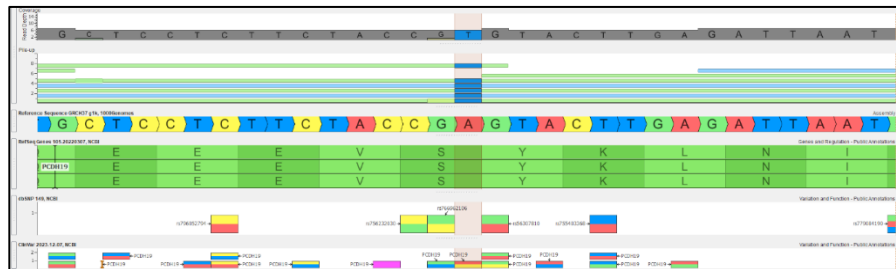
Молекулярно-генетично изследване

При пациента беше извършено цялостно геномно секвениране и анализ на гени асоциирани с ИНПР.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, бе установено хетерозиготно носителство на вариант с неясна клинична значимост в гена *PCDH19* (*Protocadherin 19*) (Фигура 19).

Ген:	<i>PCDH19</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000023.10:g.99663514A>T NM_001184880.1:c.82T>A NP_001171809.1:p.Ser28Thr	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	-	Вид на мутацията:	missense
Генотип:	хемизигот	Критерии за класификация по ACMG:	PM1, PM2 и PP2
Класификация по ACMG:	вариант с неясна клинична значимост		



Фигура 18. Визуализация на варианта *PCDH19*:c.82T>A при пациента

Информация за гена: Продуктът на гена *PCDH19* (*Protocadherin 19*) е трансмембранен протеин, част от делта-2 протокадхериновия подклас на семейството на кадхерините. Те играят важна роля в клетъчната адхезия, осигурявайки свързването на клетките. Протокадхерин-19 е калциево-зависим клетъчно-адхезивен протеин, който се експресира предимно в мозъка (34). Lim et al. през 2019 година доказват, че хемизиготни *Pcdh19*KO мъжки мишки показват фенотип отговарящ на аутистичния спектър (35). Патологични варианти в гена са асоциирани с X-свързана доминантна форма на епилептична

енцефалопатия. Докато хемизиготни носители (мъже) са асоциирани с емоционални и поведенчески нарушения (OMIM ID: 300088) (35-37).

1.3.3 Обобщение на получените резултати

Изследваните пациенти с изоставане в нервно-психичното развитие са петнадесет, като пет бяха изследвани, чрез цялостно екзомно секвениране, а десет, чрез цялостно геномно секвениране. При шест пациенти бяха установени патогенни варианти, асоциирани с клиничната картина. При двама пациенти, бе установен по един вариант с неясна клинична значимост, които са силни кандидати и би могло да обяснят клиничната картина на засегнатите. При седем пациента, към момента на извършване на анализа на данните от ЦЕС или ЦГС не бяха установени варианти, асоциирани със състоянията им.

1.4 Идентифицирани патологични варианти при пациенти с изоставане в нервно-психичното развитие и епилепсия

1.4.1 Пациент WES_057

Клинична картина

Пациентът е момче на 8 години с епилептични пристъпи.

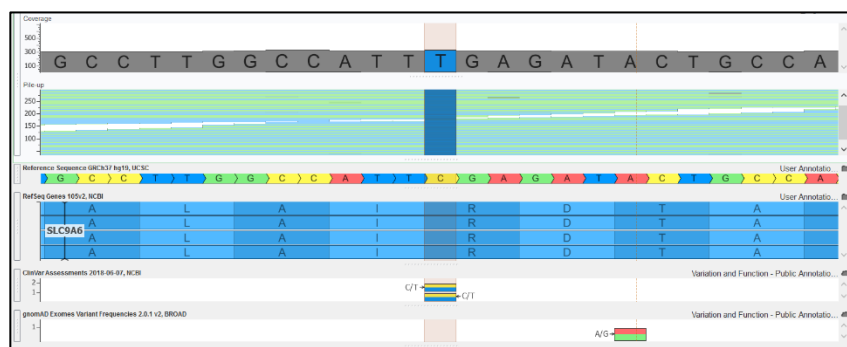
Молекулярно-генетично изследване

При пациента, беше извършено цялостно екзомно секвениране и анализ на гени асоциирани с моногенни форми на епилепсия.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, бе установено хемизиготно носителство на патогенен вариант в гена *SLC9A6* (*Solute Carrier Family 9 Member A6*) (Фигура 20).

Ген:	<i>SLC9A6</i>	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000023.10:g.135106524C>T NM_001379110.1:c.1342C>T NP_001366039.1:p.Arg448Ter	Вид на мутацията:	nonsense
rs ID:	rs122461162	Критерии за класификация по ACMG:	PVS1, PS4_Supporting, PM2 и PP5
Генотип:	хемизигот		
Класификация по ACMG:	<u>патогенен вариант</u>		



Фигура 20. На фигурата е представен районът от гена *SLC9A6* при пациента

Информация за гена: Генът *SLC9A6* кодира моновалентен натриево-селективен натрий/водороден антипортер (NHE, sodium/hydrogen exchanger), който функционира в мембраните на вътреклетъчните органели (като митохондрии и ендозоми) и участва в широк спектър от основни клетъчни процеси (38). Патологичните варианти на *SLC9A6*,

ведещи до загуба на функция (както е при пациента), се проявяват при мъжете хемизиготи и при хетерозиготните жени като синдромна форма на интелектуален дефицит, тип Christianson (OMIM ID: 300243).

Честота на заболяването: Заболяването е описано в базата данни Orphanet с епидемиологична честота 1-9 / 100 000.

1.4.2 Пациент WES_124

Клинична картина

Касае се за момиче на 7 години с мегаленцефалия и изоставане в НПР.

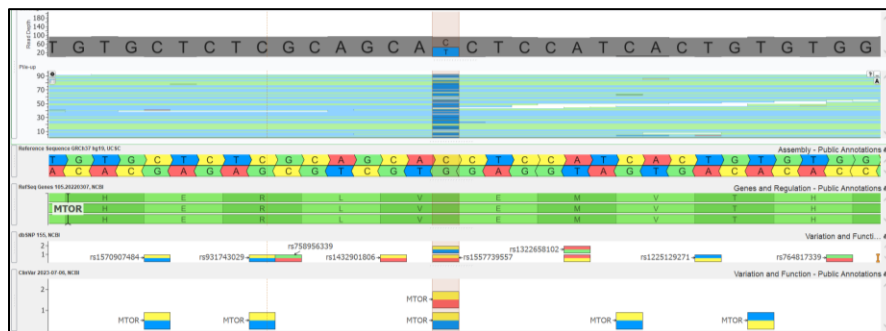
Молекулярно-генетично изследване

При пациентката беше извършено ЦЕС и анализ на гени, асоциирани с ИНПР.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, беше установено хетерозиготно носителство на патогенен вариант в гена *MTOR* (*Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase*) (Фигура 21).

Ген:	<i>MTOR</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000001.10:g.11174459C>T NM_004958.4:c.7216G>A NP_004949.1:p.Val2406Met	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	rs1557739557	Вид на мутацията:	missense
Генотип:	хетерозигот	Критерии за Класификация по ACMG:	PS4_Supporting, PM1, PM2, PM6, PP2 и PP5
Класификация по ACMG:	<u>патогенен вариант</u>		



Фигура 21. На фигурата е представен районът от гена *MTOR* при пациентката

Информация за гена: Продуктът на гена *MTOR* (*Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase*) е консервативна протеин киназа, която има централна роля в развитието на нервната система и регулирането на клетъчния растеж. Също така регулира и анаболни и катаболни процеси в PI3K/AKT/MTOR сигналния път (39). Патологични варианти в гена са асоциирани със синдром на Smith-Kingsmore, който се унаследява по автозомно доминантен механизъм (OMIM ID: 616638).

Честота на заболяването: Заболяването е описано в базата данни Orphanet с епидемиологична честота <1 / 1 000 000.

1.4.3 Пациент WES_241

Клинична картина

Касае се за момче на 4 години с неуточнени гърчове и умерена умствена изостаналост.

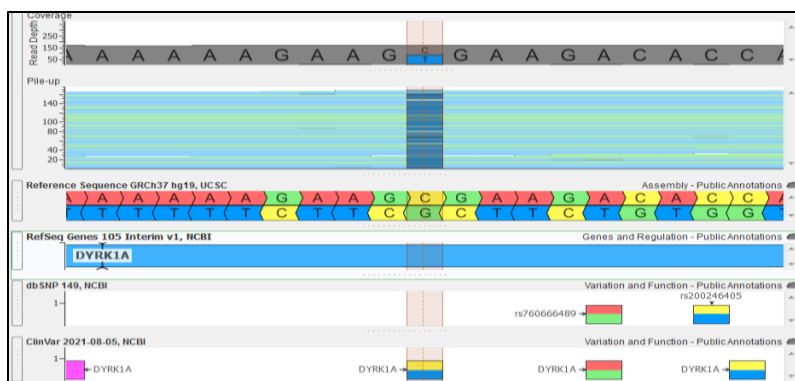
Молекулярно-генетично изследване

При пациента, беше извършено цялостно екзомно секвениране и анализ на гени асоциирани с интелектуален дефицит.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, беше установено хетерозиготно носителство на патогенен вариант в гена *DYRK1A* (*Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A*) (Фигура 22).

Ген:	<i>DYRK1A</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000021.8:g.38852961C>T NM_001347721.2:c.322C>T NP_001334650.1:p.(Arg108Ter)	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	rs1057518204	Вид на мутацията:	nonsense
Генотип:	хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PVS1, PS4, PM2 и PP5
Класификация по ACMG:	<u>патогенен</u>		



Фигура 22. Визуализация на варианта с.322С>Т в гена *DYRK1A* при пациента

Информация за гена: Генът *DYRK1A* (*Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A*) кодира киназа, която е част от DYRK-семейството, участва в редица клетъчни процеси, регулира неврогенезата, клетъчната пролиферация и развитието на мозъка (40). Патологичните мутации в гена водят до *DYRK1A* – асоциирано ИНПР. Заболяването се унаследява по автозомно доминантен начин и се проявява при хетерозиготни носители на патогенен алел в гена (OMIM ID: 614104).

Честота на заболяването: Заболяването е описано в базата данни Orphanet с епидемиологична честота $<1 / 1\,000\,000$.

1.4.4 Пациент WES_251

Клинична картина

Касае се за момче на 1 година с неясна етиология на епилептични пристъпи и мускулна хипотония.

Молекулярно-генетично изследване

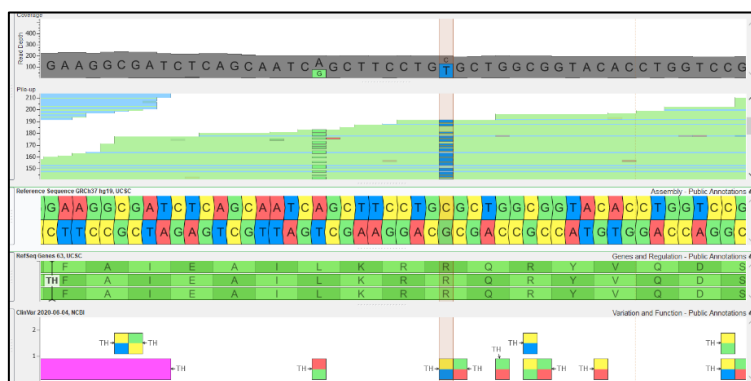
При пациента, беше извършено цялостно екзомно секвениране и анализ на гени асоциирани с моногенни форми епилепсия и метаболитни заболявания.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, бе установено съставно хетерозиготно носителство на два патогенни варианти в гена *TH* (*Tyrosine Hydroxylase*) (Фигура 23).

Ген:	TH		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000011.9:g.2189135C>T NM_000360.4:c.605G>A NP_000351.2:p.Arg202His	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0.000106303
rs ID:	rs80338892	Вид на мутацията:	missense
Генотип:	хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PS4, PM2 и PP5
Класификация по ACMG:	<u>патогенен</u>		

Ген:	TH		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000011.9:g.2189126A>G NM_000360.4:c.614T>C NP_000351.2:p.Leu205Pro	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0.00001228
rs ID:	rs121917763	Вид на мутацията:	missense
Генотип:	хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PS4, PS3, PM2 и PP5
Класификация по ACMG:	<u>патогенен</u>		



Фигура 23. Визуализация на вариантите с.605G>A и с.614T>C в гена *TH* при пациента

Информация за гена: Генът *TH* (*Tyrosine Hydroxylase*) кодира тирозин хидроксилаза, който е ключов ензим при биосинтеза на катехоламините: допамин, епинефрин и норепинефрин. Тирозин хидроксилазата катализира превръщането на L-допа от тирозин, допаминът се превръща в норадреналин и адреналин, които играят основна роля в автономната нервна система (41). Дефицитът му води до клиничните прояви на тирозин хидроксилазна недостатъчност или синдром на Segawa. Заболяването се характеризира с генетична и клинична хетерогенност и се унаследява автозомно рецесивно (OMIM ID: 605407).

Честота на заболяването: Заболяването е описано в базата данни Orphanet с епидемиологична честота 1-9 / 1 000 000.

1.4.5 Пациент WES_279

Клинична картина

Пациентът е на 15 години с ДЦП и идиопатична нефамилна дистония с ранно начало.

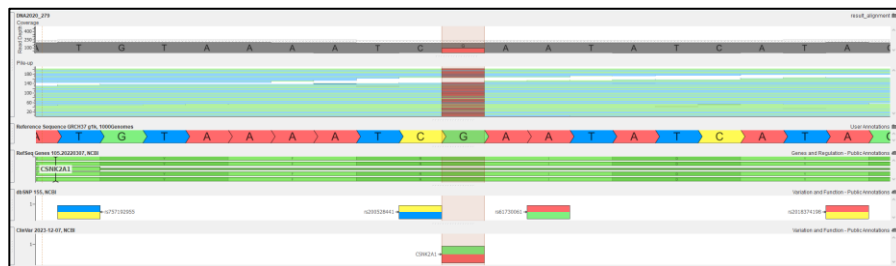
Молекулярно-генетично изследване

При пациента беше извършено цялостно екзомно секвениране и анализ на гени асоциирани с различни неврологични заболявания.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, беше установено хетерозиготно носителство на вероятно патогенен вариант в гена *CSNK2A1* (*Casein Kinase 2 Alpha 1*) (Фигура 24).

Ген:	<i>CSNK2A1</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000020.10:g.478391G>A NM_177559.3:c.400C>T NP_808227.1:p.(Arg134Ter)	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	rs2122537652	Вид на мутацията:	nonsense
Генотип:	хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PVS1, PM2 и PP5
Класификация по ACMG:	патогенен		



Фигура 24. Визуализация на варианта с.400C>T в гена *CSNK2A1* при пациента

Информация за гена: Генът *CSNK2A1* (*Casein Kinase 2 Alpha 1*) кодира алфа субединицата на ензима - казеин киназа II, който е серин/треонин киназа. Ензимът фосфорилира протеини и участва в различни клетъчни процеси, включително контрол на клетъчния цикъл, апоптоза и циркаден ритъм (42). Дефекти в гена са асоциирани със синдром на Okur-Chung, които се унаследява по автозомно доминантен механизъм (OMIM ID: 617062).

Честота на заболяването: Заболяването е описано в базата данни Orphanet без информация за епидемиологичната честота.

1.4.6 Пациент WES_317

Клинична картина

Пациентката е момиче на 4 години с изоставане в развитието, липса на говор и координация и тонично-клонични гърчове.

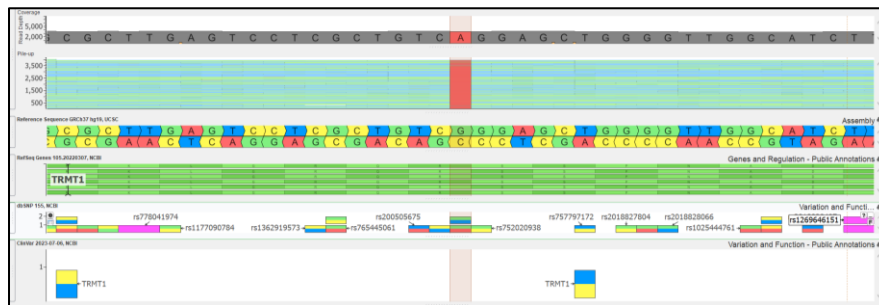
Молекулярно-генетично изследване

При пациентката, беше извършено цялостно екзомно секвениране и анализ на гени асоциирани с ИНПР.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, беше установено хомозиготно носителство на патогенен вариант в гена *TRMT1* (*TRNA Methyltransferase 1*) (Фигура 25).

Ген:	<i>TRMT1</i>	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0.000003986
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000019.9:g.13216374G>A NM_017722.4:c.1630C>T NP_060192.1:p.(Arg544Ter)	Вид на мутацията:	nonsense
rs ID:	rs763302328	Критерии за класификация по ACMG:	PVS1 и PM2
Генотип:	ХОМОЗИГОТ		
Класификация по ACMG:	патогенен		



Фигура 25. Визуализация на варианта с.1630C>T в гена *TRMT1*

Информация за гена: Генът *TRMT1* (*TRNA Methyltransferase 1*) кодира тРНК ензим, който действа като диметилтрансфераза, модифицирайки един гуанинов остатък на 26-та позиция на повечето тРНК-и (43). Патологичните мутации в гена са асоциирани с автозомно рецесивна форма на изоставане в развитието (OMIM ID: 618302).

Честота на заболяването: Заболяването е описано в базата данни Orphanet, но няма епидемиологична честота.

1.4.7 Пациент WES_343

Клинична картина

Пациентът е момче на 8 години с леко изоставане в развитието и гърчове при треска и висока температура (GEFR+).

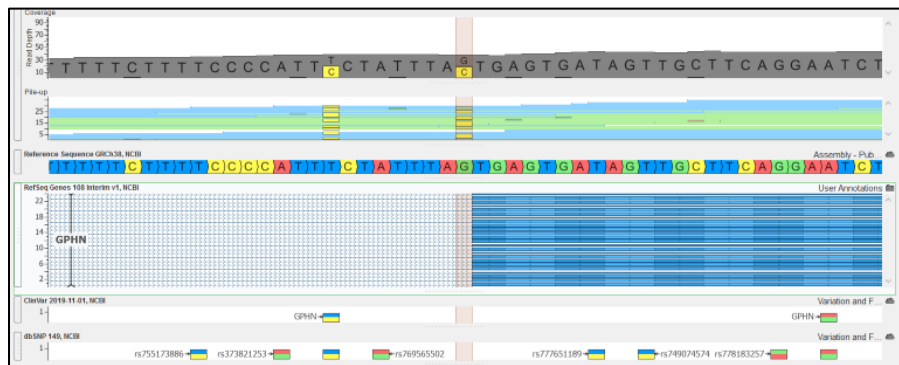
Молекулярно-генетично изследване

При пациента беше извършено ЦЕС и анализ на гени, асоциирани с моногенни форми на епилепсия.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, беше установено хетерозиготно носителство на патогенен вариант в гена *GPHN* (*Gephyrin*) (Фигура 26).

Ген:	<i>GPHN</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000014.8:g.67147824G>C NM_020806.5:c.65-1G>C	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	-	Вид на мутацията:	Splice acceptor
Генотип:	хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PVS1 и PM2
Класификация по ACMG:	<u>вероятно патогенен</u>		



Фигура 26. Визуализация на варианта с.65-1G>C в гена *GPHN*

Информация за гена: Продуктът на гена *GPHN* е протеина гефирин, който е от съществено значение за постсинаптичната локализация на инхибиторните невротрансмитерни рецептори в централната нервна система и за биосинтезата на молибденовия кофактор (MoCo) в различни периферни органи (44, 45). Патологичните варианти в гена *GPHN* се проявяват при хомозиготи и съставни хетерозиготи като автозомно-рецесивна форма на дефицит на молибденовия кофактор (OMIM ID: 615501).

Честота на заболяването: Заболяването е описано в базата данни Orphanet, но няма епидемиологична честота.

1.4.8 Пациент WES_357

Клинична картина

Пациентката е момиче на 8 години с комплексни парциални конвулсивни припадъци.

Молекулярно-генетично изследване

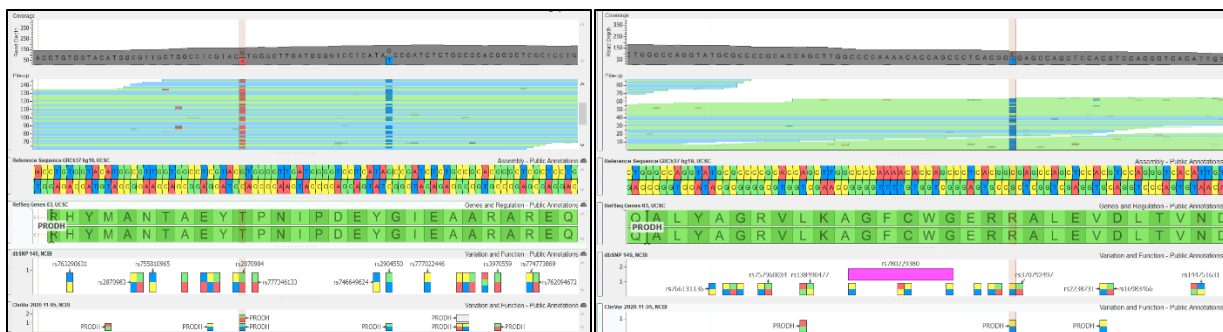
При пациентката беше извършено ЦЕС и анализ на гени асоциирани с моногенни форми на епилепсия.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, беше установено съставно хетерозиготно носителство на два вероятно патогенни варианти в гена *PRODH* (*Proline dehydrogenase 1*) (Фигура 27).

Ген:	<i>PRODH</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000022.10:g.18905964C>T NM_016335.5:c.1292G>A NP_057419.5:p.Arg431His	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0.07225
rs ID:	rs2904552	Вид на мутацията:	Missense
Генотип:	хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PS3, PS4 и BS1
Класификация по ACMG:	<u>вероятно патогенен</u>		

Ген:	<i>PRODH</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000022.10:g.18905859G>A NM_016335.5:c.1397C>T NP_057419.5:p.Thr466Met	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0.004630
rs ID:	rs2870984	Вид на мутацията:	missense
Генотип:	хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PS3, PS4 и BS1
Класификация по ACMG:	<u>вероятно патогенен</u>		



Фигура 27. Визуализация на вариантите в гена *PRODH*. Идентифицираните находки са маркирани

Информация за гена: Пролин дехидрогеназата (*PRODH*) е митохондриален ензим, който се експресира в бъбреците, черния дроб и мозъка (46). Мутации в гена са асоциирани с натрупване на пролин в плазмата и на глицин, хидроксипролин и пролин в урината водещи до хиперпролинемия тип 1, която се унаследява по автозомно рецесивен начин. Заболяването е с вариабилен фенотип, поради което честотата не е известна (OMIM ID: 239500).

Честота на заболяването: Заболяването няма епидемиологична честота в Orphanet.

1.4.9 Пациент WES_467

Клинична картина

Пациентката е момиче на 7 годишна възраст с изостане в двигателното развитие, умерена умствена изостаналост и епилепсия.

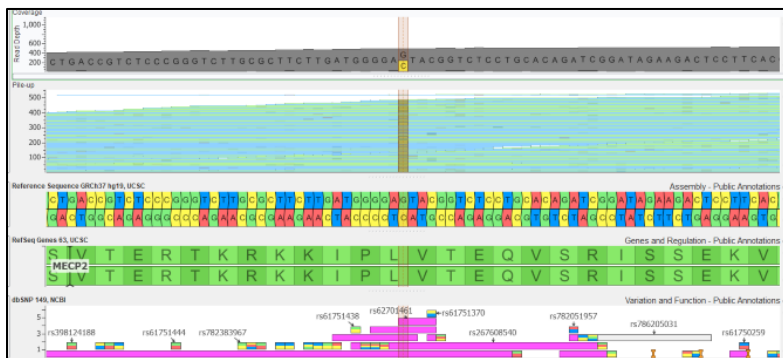
Молекулярно-генетично изследване

При пациентката, беше извършено цялостно екзомно секвениране и анализ на гени асоциирани с моногенни форми на епилепсия и ИНПР.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, беше установено хетерозиготно носителство на вероятно патогенен вариант в гена *MECP2* (*Methyl-CpG Binding Protein 2*) (Фигура 28).

Ген:	<i>MECP2</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000023.10:g.153296378G>C NM_001110792.2:c.937C>G NP_001104262.1:p.Leu313Val	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	-	Вид на мутацията:	missense
Генотип:	хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PM1, PM2, PP3 и PP5
Класификация по ACMG:	вероятно патогенен		



Фигура 28. Визуализация на варианта p.Leu313Val в гена *MECP2* при пациентката

Информация за гена: Продукта на гена *MECP2* (*Methyl-CpG Binding Protein 2*) е консервативен ядрен протеин, който действа като активатор или инхибитор на транскрипцията. Експресира се в невроните и в глията и контролира епигенетичните механизми в клетките (47). Патологични варианти в гена са асоциирани със синдрома на Rett и X-свързани форми на задръжка в нервно-когнитивното развитие. Синдромът на Rett се унаследява като X-свързан доминантен белег (OMIM ID: 312750).

Честота на заболяването: Заболяването е описано в базата данни Orphanet епидемиологична честота 1-9 / 100 000.

1.4.10 Пациент WES_541

Клинична картина

Пациентът е момче на 4 годишна възраст с епилептични припадъци.

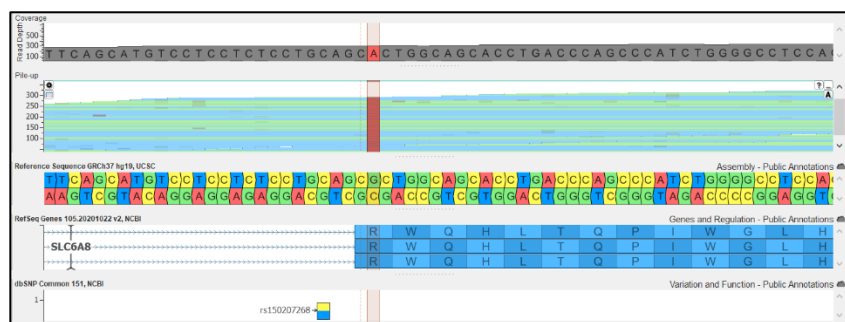
Молекулярно-генетично изследване

При пациента беше извършено цялостно екзомно секвениране и анализ на гени, асоциирани с моногенни форми на епилепсия.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, беше установено хемизиготно носителство на вероятно патогенен варианти в гена *SLC6A8* (*Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8*) (Фигура 29).

Ген:	<i>SLC6A8</i>	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000023.10:152960530G>A NM_005629.4:c.1769G>A NP_005620.1:p.Arg590His	Вид на мутацията:	missense
rs ID:	-	Критерии за класификация по ACMG:	PM1, PM2 и PP3
Генотип:	хемизигот		
Класификация по ACMG:	<u>вероятно патогенен</u>		



Фигура 29. Визуализация на варианта *SLC6A8*:c.1769G>A при пациента

Информация за гена: Продукта на гена *SLC6A8* (*Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8*) е мембранен протеин (креатин: натриев симпортер), чиято функция е да транспортира креатина в и извън клетките (48). Герминативните патологични варианти в *SLC6A8* се проявяват при хемизиготни носители като X-свързана рецесивна форма на синдром на церебрална креатинова недостатъчност, тип 1 (CTD) (OMIM ID: 300352).

Честота на заболяването: Заболяването няма епидемиологична честота в Orphanet.

1.4.11 Пациент WGS_053

Клинична картина

Пациентът е момче на 10 месеца, с регрес в психомоторното развитие и епилептични пристъпи и генерализирана мускулна хипотония.

Молекулярно-генетично изследване

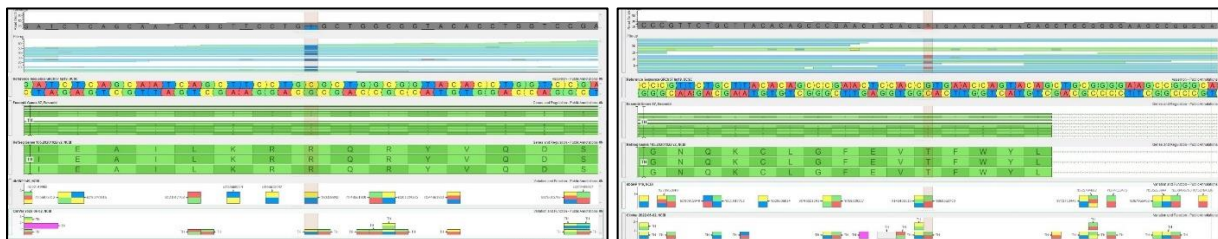
При пациента, беше извършено цялостно екзомно секвениране и анализ на гени асоциирани с метаболитни заболявания.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, беше установено съставно хетерозиготно носителство на два патогенни варианти в гена *TH* (*Tyrosine Hydroxylase*) (Фигура 31).

Ген:	<i>TH</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000011.9:g.2189135C>T NM_000360.4:c.605G>A NP_000351.2:p.Arg202His	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0.000106303
rs ID:	rs80338892	Вид на мутацията:	missense
Генотип:	хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PS4, PM2 и PP5
Класификация по ACMG:	<u>патогенен</u>		

Ген:	<i>TH</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000011.9:g.2186980G>A NM_000360.4:c.1118C>T NP_000351.2:p.Thr373Met	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0.000004017
rs ID:	rs868563700	Вид на мутацията:	missense
Генотип:	хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PM1, PM2, PP2, PP3 и PP4
Класификация по ACMG:	<u>вероятно патогенен</u>		



Фигура 31. Визуализация на вариантите c.605G>A и c.1118C>T в гена *TH*

Патологични варианти в *TH* водят до клиничните прояви на тирозин хидроксилазна недостатъчност или синдром на Segawa (OMIM ID: 605407). Подробно описание на гена и продукта му, както и клиничната картина на заболяването са описани при пациент WES_251.

1.4.12 Обобщение на получените резултати

Изследваната група от пациенти са общо осемнадесет, като 14 бяха изследвани, чрез цялостно екзомно секвениране, а 4 чрез цялостно геномно секвениране. При 11 пациенти бяха установени патологични варианти, асоциирани с клиниката и беше поставена правилна генетична диагноза. При седем пациента, към момента на извършване на анализа на данните от ЦЕС или ЦГС не бяха установени варианти, които да обяснят състоянията им.

1.5 Пациенти с епилептични пристъпи без изоставане в нервно-психическото развитие

В тази група са пациенти с един или няколко епилептични пристъпи, като към момента на извършването на генетичното изследване не е установено засягане на неврологичното, интелектуалното и психическото развитие. Чрез цялостно екзомно секвениране, бяха изследвани четирима на възраст между една и единадесет години. Не бяха идентифицирани патологични или вероятно патологични варианти, асоциирани с различни моногенни форми на епилепсия. При един пациент, беше установен вариант с неясна клинична значимост в гена *SCN1B*.

1.5.1 Пациент WES_007

Клинична картина

Пациентът е момче на 4 години с епилептични пристъпи след субфебрилна температура.

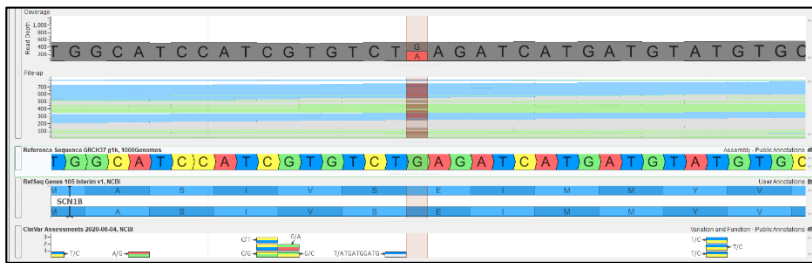
Молекулярно-генетично изследване

При пациента, беше извършено цялостно екзомно секвениране и анализ на гени асоциирани с моногенни форми на епилепсия.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, беше установено хетерозиготно носителство на един вариант с неясна клинична значимост в гена *SCN1B* (*Sodium Voltage-Gated Channel Beta Subunit 1*) (Фигура 32).

Ген:	<i>SCN1B</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000019.9:g.35530050G>A NM_001037.5:c.478G>A NP_001028.1:p.Glu160Lys	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	-	Вид на мутацията:	missense
Генотип:	хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PM2 и PP3
Класификация по ACMG:	<u>вариант с неясна клинична значимост</u>		



Фигура 32. Вариант *SCN1B* с.478G>A (p.Glu160Lys) при пациента

Информация за гена: Генът *SCN1B* (*Sodium Voltage-Gated Channel Beta Subunit 1*) кодира бета-1 субединицата на волтаж-зависимите натриеви канали (49). Патологичните варианти в гена *SCN1B*, са асоциирани с епилептична енцефалопатия, тип 52 (автозомно рецесивен механизъм) и епилепсия с фебрилни гърчове (автозомно доминантно унаследяване).

1.5.2 Обобщение на получените резултати

Към момента на извършване на анализа на данните от ЦЕС, при трима от пациентите не бяха установени варианти, асоциирани със състоянията им.

1.6 Пациенти с комплексна неврологична клинична картина и неизяснена етиология

Пациентите с комплексна неврологична клинична картина са 22-ма, като половината са изследвани, чрез цялостно екзомно секвениране, а останалите, чрез цялостно геномно секвениране. Всички са на възраст до 8 години.

1.6.1 Идентифицирани патогенни варианти при пациенти с комплексна неврологична клинична картина и неизяснена етиология

1.6.1.1 Пациент WES_015

Клинична картина

Изследван е тъканен материал на фетус след настъпила вътреутробна смърт и ехографски данни за вътреутробна ретардация, хипертрофия на миокарда и кардиомегалия.

Молекулярно-генетично изследване

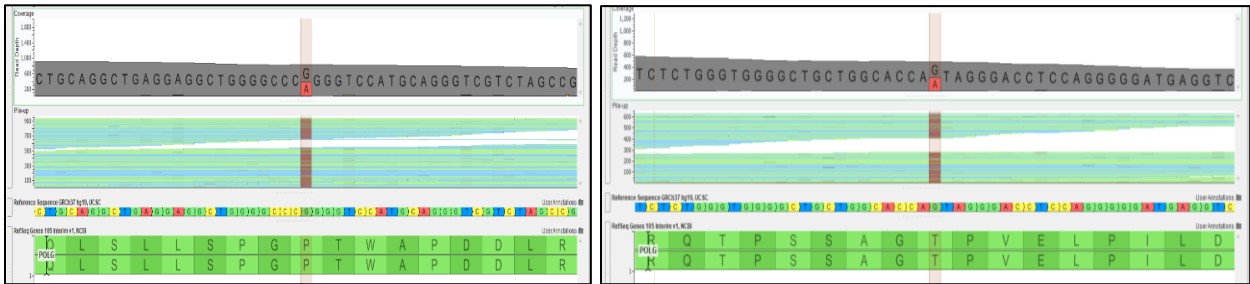
Беше извършено цялостно екзомно секвениране и анализ на гени, асоциирани метаболитни заболявания и болести на натрупването.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, беше установено хетерозиготно носителство на два патогенни варианти в гена *POLG* (*DNA Polymerase Gamma, Catalytic Subunit*) (Фигура 33).

Ген:	<i>POLG</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000015.9:g.89868870G>A NM_001126131.2:c.1760C>T NP_001119603.1:p.Pro587Leu	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0.001545
rs ID:	rs113994096	Вид на мутацията:	missense
Генотип:	хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PS4_Moderate, PM1, PM2, PP2 и PP3
Класификация по ACMG:	<u>патогенен</u>		

Ген:	<i>POLG</i>	
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000015.9:g.89873415G>A NM_001126131.2:c.752C>T NP_001119603.1:p.Thr251Ile	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1): 0.001548
rs ID:	rs113994094	Вид на мутацията: missense
Генотип:	хетерозигот	Класификация по ACMG: PS4_Moderate, PM1, PM2, PP2 и PP3
Класификация по ACMG:	<u>патогенен</u>	



Фигура 33. Визуализация на вариантите с.1760C>T (ляво) и с.752C>T (дясно)

Информация за гена: Продуктът на гена *POLG* (*DNA Polymerase Gamma, Catalytic Subunit*) е гама субединицата на ДНК полимеразата, която участва при репликацията и репарацията на митохондриалната ДНК. Патогенните варианти в *POLG* са асоциирани със спектър от заболявания (POLG-асоциирани заболявания) с припокриваща клинична картина (50). POLG-асоциираните заболявания се унаследяват автозомно доминантно или автозомно рецесивно. При пациентите с автозомно-рецесивна форма клиничните прояви са по-тежки и с по-ранно начало вкл. преди раждането (OMIM ID: 174763).

Честота на заболяването: Заболяването е с честота 1-9 / 1 000 000 в Orphanet.

1.6.1.2 Пациент WES_028

Клинична картина

Пациентката е момиче на 10 години със съмнение за синдром на Pitt-Hopkins.

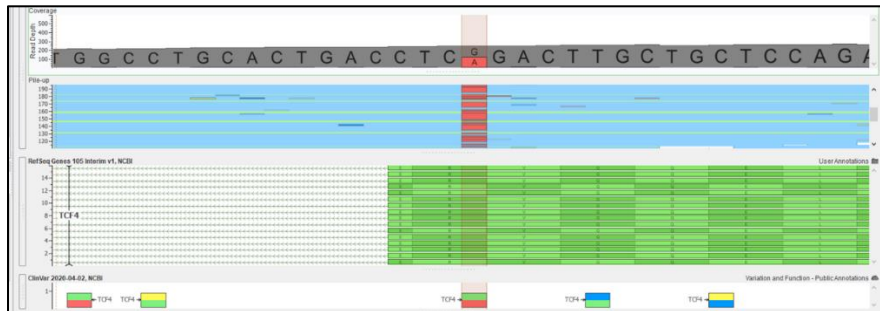
Молекулярно-генетично изследване

Беше извършено цялостно екзомно секвениране и анализ на гени асоциирани с ИНПР.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, беше установено хетерозиготно носителство на патогенен вариант в гена *TCF4* (*Transcription Factor 4*) (Фигура 34).

Ген:	<i>TCF4</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000018.9:g.52896081G>A NM_001083962.2:c.1876C>T NP_001077431.1:p.(Arg626Ter)	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	rs1131691735	Вид на мутацията:	nonsense
Генотип:	хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PVS1, PS4_Moderate, PM2 и PP5
Класификация по ACMG:	<u>патогенен</u>		



Фигура 34. Вариант *TCF4*:c.1876C>T при пациентката. Мястото на замяната е маркирано

Информация за гена: Генът *TCF4* (*Transcription Factor 4*) кодира транскрипционен фактор, който се свързва към специфични региони на ДНК и участва в контрола на активността на други гени (51). Дефекти в гена са асоциирани със синдром на Pitt-Hopkins, който се унаследява автозомно доминантно (OMIM ID: 610954).

Честота на заболяването: Заболяването е описано в базата данни Orphanet с епидемиологична честота 1-9 / 1 000 000.

1.6.1.3 Пациент WES_133

Клинична картина

Пациентката е момиче на 2 години с прогресиращо неврологично заболяване и фамилна обремененост.

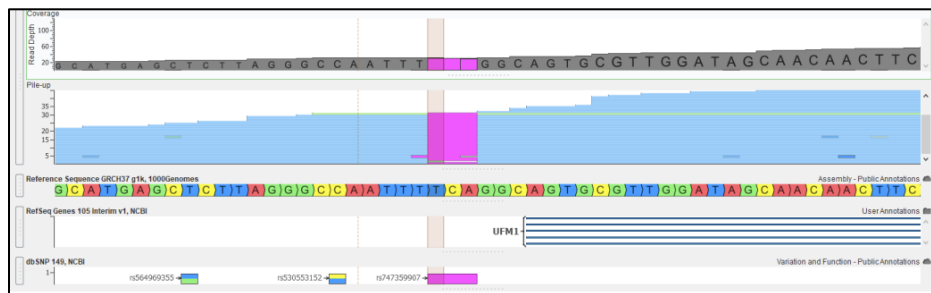
Молекулярно-генетично изследване

Беше извършено цялостно екзомно секвениране и анализ на гени, асоциирани с неврологични заболявания.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, беше установено хомозиготно носителство на патогенен вариант в гена *UFM1* (*Ubiquitin Fold Modifier 1*) (Фигура 35).

Ген:	<i>UFM1</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000013.10:g.38923902_38923904 del NM_001286704.1:c.-273_-71 delTCA	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	rs747359907	Вид на мутацията:	делеция
Генотип:	ХОМОЗИГОТ	Критерии за класификация по ACMG:	PS4_Moderate, PS3, PM2 и PP5
Класификация по ACMG:	<u>патогенен</u>		



Фигура 35. Вариант *UFM1*:c.-273_-271delTCA при пациентката

Информация за гена: Продукта на гена е протеин - убиквитин, който се свързва ковалентно с клетъчни протеини (52). Патологичните варианти в гена *UFM1* се проявяват, като автозомно рецесивна форма на левкодистрофия с хипомиелинизация, тип 14 (OMIM ID: 617899).

Честота на заболяването: Заболяването е описано в базата данни Orphanet с епидемиологична честота $<1 / 1\,000\,000$.

1.6.1.4 Пациент WES_172

Клинична картина

Касае се за момче на 14 години с полимарформативен синдром.

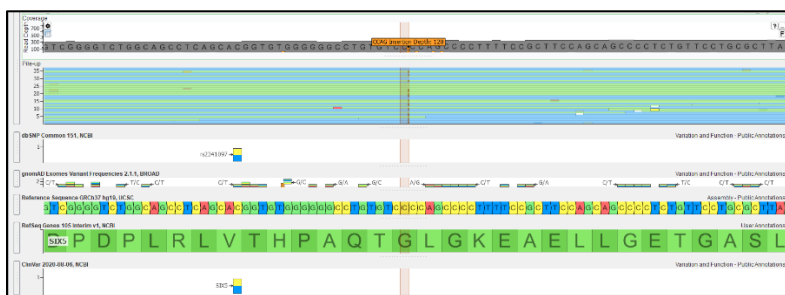
Молекулярно-генетично изследване

Беше извършено цялостно екзомно секвениране и анализ на гени асоциирани с ИНПР и аномалии на ЦНС с неуточнена етиология.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, беше установено хетерозиготно носителство на патогенен вариант в гена *SIX5* (*SIX Homeobox 5*) (Фигура 36).

Ген:	SIX5		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000019.9:g.46268923_46268926 dupCCAG NM_175875.5:c.2053_2056dupCTGG NP_787071.3:p.(Gly686AlafsTer18)	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	-	Вид на мутацията:	дупликация
Генотип:	хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PVS1 и PM2
Класификация по ACMG:	<u>вероятно патогенен</u>		



Фигура 36. Вариант *SIX5* c.2053_2056dupCTGG при пациента

Информация за гена: *SIX5* (*SIX Homeobox 5*) кодира транскрипционен фактор, който участва в регулирането на органогенезата. Патогенни варианти в гена са асоциирани с автозомно доминантна форма на Бранхиоторенален синдром. Заболяването се характеризира с вариабилна експресивност, непълна пенетрантност и генетична хетерогенност (53) (OMIM ID: 610896).

Честота на заболяването: Заболяването е описано в базата данни Orphanet с епидемиологична честота 1-9 / 100 000.

1.6.1.5 Пациент WES_238

Клинична картина

Касае се за момче на 3 години с вроден нистагъм, задръжка в говорното развитие, дефицит на финната моторика и дискоординационен синдром.

Молекулярно-генетично изследване

Беше извършено цялостно екзомно секвениране и анализ на гени, асоциирани с различни неврологични заболявания.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, беше установено хетерозиготно носителство на един патогенен и един вероятно патогенен вариант в гена *COL18A1* (*Collagen Type XVIII Alpha 1 Chain*) (Фигура 37).

Ген:	<i>COL18A1</i>	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0.000008193
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000021.8:g.46897323A>G, NM_030582.4:c.1469-2A>G	Вид на мутацията:	splice acceptor
rs ID:	rs765919785	Критерии за класификация по ACMG:	PVS1, PM2 и PP5
Генотип:	хетерозигот	Класификация по ACMG:	<u>патогенен</u>

Ген:	<i>COL18A1</i>	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000021.8:g.46925341C>A NM_030582.4:c.3623C>A NP_085059.2:p.(Ser1208Ter)	Вид на мутацията:	nonsense
rs ID:	-	Критерии за класификация по ACMG:	PVS1 и PM2
Генотип:	хетерозигот	Класификация по ACMG:	<u>вероятно патогенен</u>



Фигура 37. На фигурите са представени екзон 6 (вариант *COL18A1*, NM_030582.4:c.1469-2A>G) - ляво и екзон 36 (вариант *COL18A1* c.3623C>A, (p.Ser1208Ter)) - дясно на гена *COL18A1* при пациента

Информация за гена: Генът *COL18A1* кодира колаген XVIII, като три алфа 1 субединици, се прикрепят една към друга, за да образуват колаген XVIII. Колаген XVIII е локализиран в базалните мембрани на тъканите в цялото тяло (54). Патологичните варианти в гена *COL18A1* са асоциирани със синдром на Knobloch, тип 1. Заболяването е с автозомно-рецесивен механизъм на унаследяване (OMIM ID: 267750).

Честота на заболяването: Заболяването е описано в базата данни Orphanet с епидемиологична честота <1 / 1 000 000.

1.6.1.6 Пациент WES_259

Клинична картина

Касае се за момиче на 4 години със забавено двигателни и нервно-психическо развитие, изразена мускулна хипотония и лицев дисморфизъм.

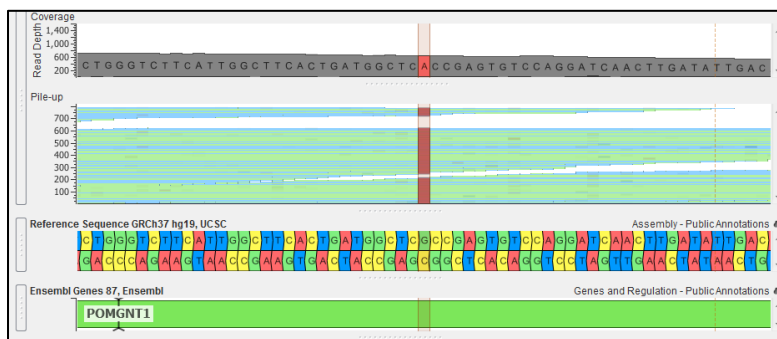
Молекулярно-генетично изследване

Беше извършено цялостно екзомно секвениране и анализ на гени, асоциирани с различни неврологични заболявания.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, беше установено хомозиготно носителство на патогенен вариант в гена *POMGNT1* (*Protein O-mannose beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase*) (Фигура 38).

Ген:	<i>POMGNT1</i>	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000001.10:g.46662690G>A NM_017739.4:c.187C>T NP_060209.4:p.(Arg63Ter)	Вид на мутацията:	nonsense
rs ID:	rs193919337	Критерии за класификация по ACMG:	PVS1, PS4_Supporting, PM2 и PP5
Генотип:	ХОМОЗИГОТ	Класификация по ACMG:	патогенен



Фигура 38. Визуализация на варианта c.187C>T в гена *POMGNT1* при пациентката

Информация за гена: Продуктът на гена *POMGNT1* (*Protein O-mannose beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase*) е О-маноза бета-1,2-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза, протеин, който участва в синтеза на О-манозил гликан и е от съществено значение за поддържането на дистрофин-гликопротеиновия комплекс (DGC) (55). Патогенни варианти в гена *POMGNT1* се асоциират с вродена мускулна дистрофия-дистрогликанопатия, тип

A3 (вродена, с мозъчни и очни аномалии); тип В3 (вродена с изоставане в нервно-психичното развитие), тип С3 (вродена, тип пояс-крайник) и пигментен ретинит. Заболяванията се унаследяват по автозомно рецесивен начин (ОМIM ID: 613151).

Честота на заболяването: Заболяването е описано в базата данни Orphanet с епидемиологична честота 1-9 / 100 000.

1.6.1.7 Пациент WES_271

Клинична картина

Касае се за момиче на 1 година с микроцефалия, нервно-психическо изоставане, лицев дисморфизъм, спастично повишен мускулен тонус на крайниците и ограничен обем на движение на крайниците.

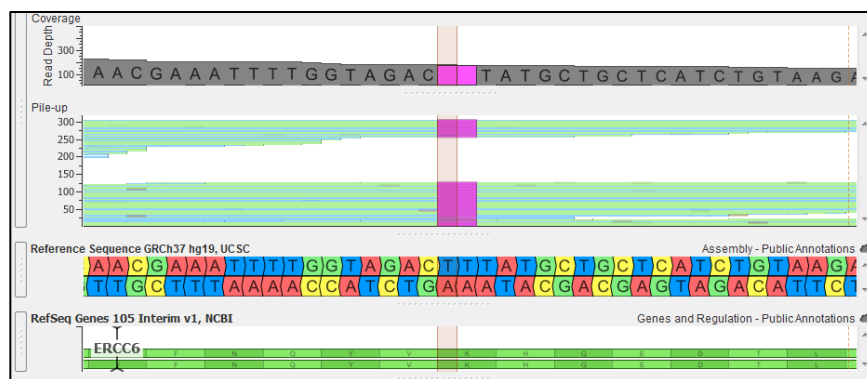
Молекулярно-генетично изследване

Беше извършено цялостно екзомно секвениране и анализ на гени, асоциирани с различни неврологични състояния.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, беше установено хомозиготно носителство на патогенен вариант в гена *ERCC6* (*ERCC Excision Repair 6, Chromatin Remodeling Factor*) (Фигура 39).

Ген:	<i>ERCC6</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000010.10:g.50684322_50684323del NM_000124.4:c.2321_2322del NP_000115.1:p.(Lys774SerfsTer7)	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	-	Вид на мутацията:	frameshift deletion
Генотип:	ХОМОЗИГОТ	Критерии за класификация по ACMG:	PVS1, PP4 и PM2
Класификация по ACMG:	<u>патогенен</u>		



Фигура 39. Визуализация на варианта с.2321_2322del в гена *ERCC6* при пациентката

Информация за гена: Генът *ERCC6* (*ERCC Excision Repair 6, Chromatin Remodeling Factor*) кодира ДНК-свързващ протеин, който участва в процеса на репарацията на ДНК чрез изрязване на нуклеотиди (NER) (56). Синдромът на Cockayne се унаследява по автозомно рецесивен начин и се проявява при хомозиготни и съставни хетерозиготни носители на патологични алели в гена *ERCC6* (OMIM ID: 133540).

Честота на заболяването: Заболяването е описано в базата данни Orphanet, но няма епидемиологична честота.

1.6.1.8 Пациент WGS_031

Клинична картина

Пациентката е дете на 9 месечна възраст с полимарформативен синдром.

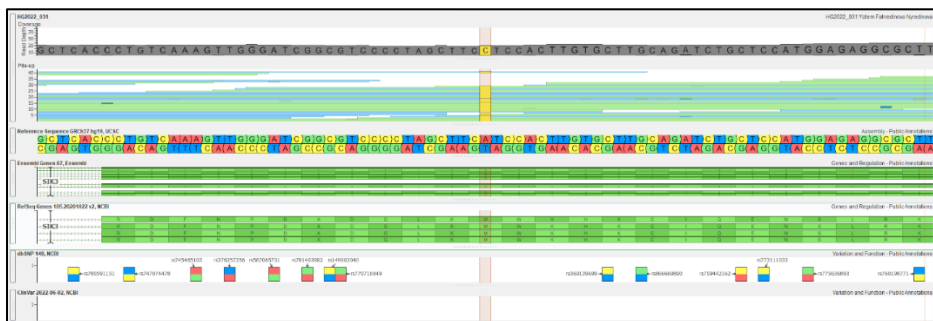
Молекулярно-генетично изследване

Беше извършено цялостно геномно секвениране и анализ на гени, асоциирани с различни неврологични заболявания.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, беше установено хомозиготно носителство на два вероятно патогенни варианти в гените *SIK3* (*SIK Family Kinase 3*) и *P4HA1* (*Prolyl 4-Hydroxylase Subunit Alpha 1*) (Фигура 40 и 41).

Ген:	<i>SIK3</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000011.9:g.116747674A>C NM_025164.6:c.950T>G NP_079440.3:p.Met317Arg	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	-	Вид на мутацията:	missense
Генотип:	ХОМОЗИГОТ	Класификация по ACMG:	PM1, PM2, PP2, PP3 и PP4
Класификация по ACMG:	<u>вероятно патогенен</u>		



Фигура 40. Визуализация на варианта *SIK3:c.950T>G*

Информация за гена: Генът *SIK3* (*SIK Family Kinase 3*) кодира серин/треонин-протеин киназа, която участва в mTOR сигналния път, регулира диференциацията на хондроцитите по време на скелетогенезата. До момента патологичен вариант в хомозиготно състояние в гена *SIK3* е докладван при двама пациенти в едно семейство със спондилоепиметафизарна дисплазия, тип Краков (57). Състоянието се унаследява автосомно рецесивно и проявява при хомозиготни или съставни хетерозиготни носители на патологични алели в гена *SIK3* (OMIM ID: 618162).

Честота на заболяването: Заболяването няма епидемиологична честота поради малкия брой на докладвани пациенти.

Ген:	<i>P4HA1</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000010.10:g.74803709G>A NM_000917.4:c.1084C>T NP_000908.2:p.(Arg362Ter)	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0.00003613
rs ID:	rs755867852	Вид на мутацията:	nonsense
Генотип:	ХОМОЗИГОТ	Критерии за класификация по ACMG:	PVS1 и PM2
Класификация по ACMG:	<u>вероятно патогенен</u>		



Фигура 41. Визуализация на варианта *P4HA1:c.1084C>T*

Информация за гена: Генът *P4HA1* (*Prolyl 4-Hydroxylase Subunit Alpha 1*) кодира алфа-1 субединицата на ензима пролил 4 - хидроксилаза, който участва в пост-транслационната модификация на проколагеновите фибрили. До момента патогенни варианти в съставно хетерозиготно носителство в гена са докладвани при двама пациенти от едно семейство с колагенопатия (58). Данните от публикациите в научната литература сочат за автосомно рецесивен механизъм на унаследяване и проява на клиничен фенотип при хомозиготни или съставни хетерозиготни носители на алели водещи до загуба на функция (OMIM ID: 176710) (58).

Честота на заболяването: Заболяването няма честота, поради малкия брой на докладвани пациенти.

Обсъждане на получените резултати при пациент WGS_031: След биоинформатичния анализ се установи, че при пациентката са налице две ултраредки заболявания, проявили са се в резултат на хомозиготно носителство на два вероятно патогенни варианта в различни гени. Теоретично, има възможност да е налице хетерозиготна делеция на района където са локализирани двата гена и поради тази причина при визуализацията на вариантите да се получава информация за хомозиготно носителство. Но, това което ни направи впечатление при самия анализ, бяха високия брой на варианти в хомозиготно състояние в гени локализирани на различни хромозоми.

При тази пациентка извършихме анализ на райони със загуба на хетерозиготност, като установихме висок процент на хомозиготни трактове (ROH) в генома – >10%. Наличието на обширни хомозиготни трактове (> 3 Mb), върху множество хромозоми е признак за кръвно родство между родителите на пробанда (59). Получените данни са в подкрепа на теорията ни и показват, че хомозиготното носителство на вариантите в гените *SIK3* и *P4HA1*, най-вероятно е вследствие на генетично установената близко родствена връзка между родителите на пациентката. Според наличната медицинска документация и

клиничните характеристики на фенотипа ѝ, към момента на извършения анализ, смятаме, че на този етап поставените диагнози – сподилоепиметафизарна дисплазия, тип Краков и P4HA1-асоциирана колагенопатия, отговарят на клиничната картина.

Поради високият брой на хомозиготни трактове, не изключваме възможността при пациентката да е налице и друго заболяване, чиято клиника би се разгърнала на по-късен етап от живота ѝ. При наличие на друга клинична насоченост, цялостното геномно секвениране позволява да се извърши повторен анализ на данните.

1.6.1.9 Пациент WGS_044

Клинична картина

Пациентката е дете на 6 месечна възраст с полимарформативен синдром.

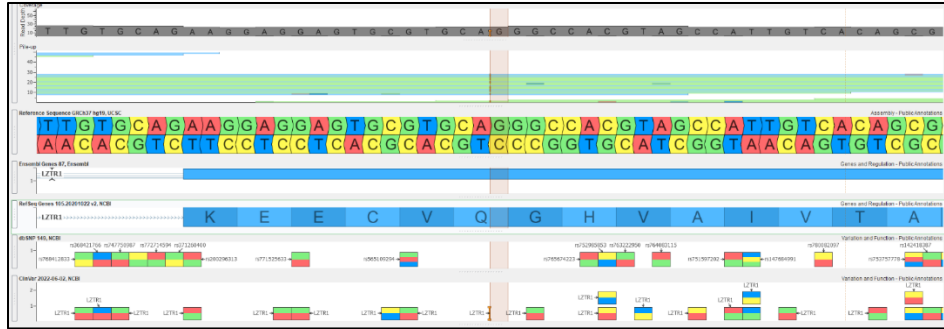
Молекулярно-генетично изследване

Беше извършено цялостно геномно секвениране и анализ на гени, асоциирани с различни неврологични заболявания.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, беше установено хетерозиготно носителство на патогенен вариант в гена *LZTR1* (*Leucine Zipper Like Post Translational Regulator 1*) (Фигура 42).

Ген:	<i>LZTR1</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000022.10:g.21348232dup NM_006767.4:c.1373dup NP_006758.2:p.(His459Profs*210)	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	rs1924703709	Вид на мутацията:	frameshift duplication
Генотип:	хетерозигот	Класификация по ACMG:	PVS1, PM2 и PP5
Класификация по ACMG:	<u>патогенен</u>		



Фигура 42. Визуализация на варианта *LZTR1:c.1373dup*

Информация за гена: Генът *LZTR1* кодира протеин, който принадлежи към суперсемејство от протеини BTB/POZ (broad complex, tramtrack, bric-a-brac/poxvirus и zinc finger) (60). Патологични варианти в гена *LZTR1* водят до синдром на Noonan с автозомно рецесивно и автозомно доминантно унаследяване, както и предразположението към шваноматоза с автозомно доминантно унаследяване (OMIM ID: 600574).

Честота на заболяването: Заболяването е докладвано в базата данни Orphanet с епидемиологична честота 1-5 / 10 000.

1.6.1.10 Пациент WGS_046

Клинична картина

Пациентката е момиче на 11 месечна възраст с изоставане в нервно-психическото развитие, лицев дисморфизъм, симптоматична епилепсия и данни за мускулна хипотония.

Молекулярно-генетично изследване

Беше извършено цялостно геномно секвениране и анализ на гени, асоциирани с различни неврологични заболявания.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, беше установено хомозиготно носителство на патогенен вариант в гена *UFM1* (*Ubiquitin Fold Modifier 1*).

Ген:	<i>UFMI</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000013.10:g.38923902_38923904 del NM_001286704.1:c.-273_-71 delTCA	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	rs747359907	Вид на мутацията:	делеция
Генотип:	хомозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PS4_Moderate, PS3, PM2 и PP5
Класификация по ACMG:	<u>патогенен</u>		

Вариантът е идентифициран при пациент WES_133, като описанието, информацията за гена и асоциираната клинична картина са описани при гореспоменатия пациент.

1.6.1.11 Пациент WGS_047

Клинична картина

Пациентът е момче на 4 месечна възраст с вентилаторна недостатъчност, ИНПР, лицев дисморфизъм, епилепсия и данни за мускулна хипотония.

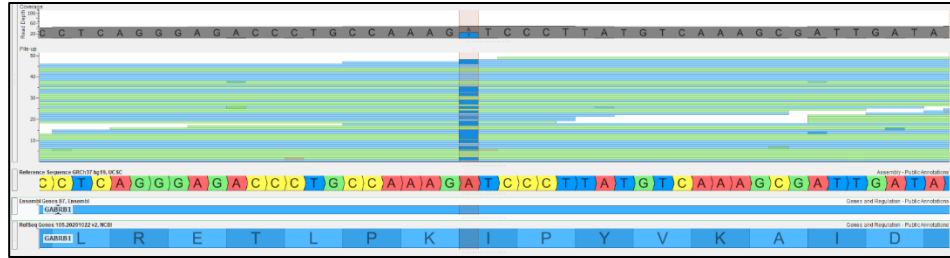
Молекулярно-генетично изследване

Беше извършено цялостно геномно секвениране и анализ на гени, асоциирани с различни неврологични заболявания.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните от ЦГС, беше установено хетерозиготно носителство на вероятно патогенен вариант в гена *GABRB1* (*Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Beta1*) (Фигура 43).

Ген:	<i>GABRB1</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000004.11:g.47408761A>T NM_000812.4:c.898A>T NP_000803.2:p.Ile300Phe	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	0	Вид на мутацията:	missense
Генотип:	хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PS2, PM2 и PP3
Класификация по ACMG:	<u>вероятно патогенен</u>		



Фигура 43. Визуализация на варианта *GABRB1:p.Ile300Phe*

Информация за гена: Продуктът на гена е рецептор на гама-аминомаслената киселина (GABA) A, той е йонен канал с множество субединици, който подпомага предаването на инхибиторни синаптични сигнали (невротрансмисията) в ЦНС. GABA е основният инхибиторен невротрансмитер в мозъка на бозайниците (61). Патологични варианти в гена *GABRB1* (*Gamma-Aminobutyric Acid Receptor, Beta-1*) са асоциирани с епилептична енцефалопатия на развитието, тип 45, която се унаследява по автозомно доминантен механизъм (OMIM ID: 617153).

Честота на заболяването: Заболяването не е докладвано в базата данни Orphanet и няма епидемиологична честота. Описани са около двадесет случая в световен мащаб.

1.6.1.12 Пациент WGS_057

Клинична картина

Касае се за момче на 8 години с забавено двигателно развитие и умствено изоставане.

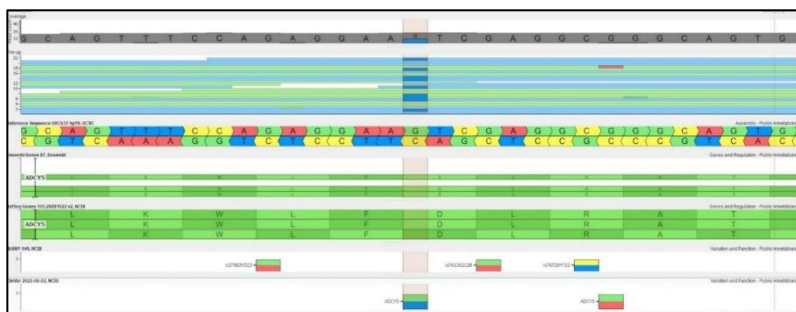
Молекулярно-генетично изследване

Беше извършено цялостно геномно секвениране и анализ на гени, асоциирани с различни неврологични заболявания.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, беше установено хетерозиготно носителство на вероятно патогенен вариант в гена *ADCY5* (*Adenylate Cyclase 5*) (Фигура 44).

Ген:	<i>ADCY5</i>		
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000003.11:g.123014949G>T NM_183357.3:c.3045C>A NP_899200.1:p.Asp1015Glu	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
rs ID:	rs1007363034	Вид на мутацията:	missense
Генотип:	хетерозигот	Критерии за класификация по ACMG:	PS4_supporting, PM2, PP2, PP3 и PP5
Класификация по ACMG:	<u>вероятно патогенен</u>		



Фигура 44. Визуализация на варианта *ADCY5:c.3045C>A*

Информация за гена: Генът кодира аденилат циклаза 5, който участва при превръщането на аденозин трифосфат (АТР) в цикличен аденозин монофосфат (сАМР). Патологични варианти в гена *ADCY5* са асоциирани с фамилна дискинезия и лицева миокимия, която се унаследява по автозомно доминантен или автозомно рецесивен механизъм (OMIM ID: 619647, 606703).

Честота на заболяването: Заболяването е докладвано в базата данни Orphanet с епидемиологична честота $<1 / 1\,000\,000$.

1.6.1.13 Пациент WGS_083

Клинична картина

Касае се за момче на 8 години с тежко изоставане психо-моторното развитие и мускулна хипотония.

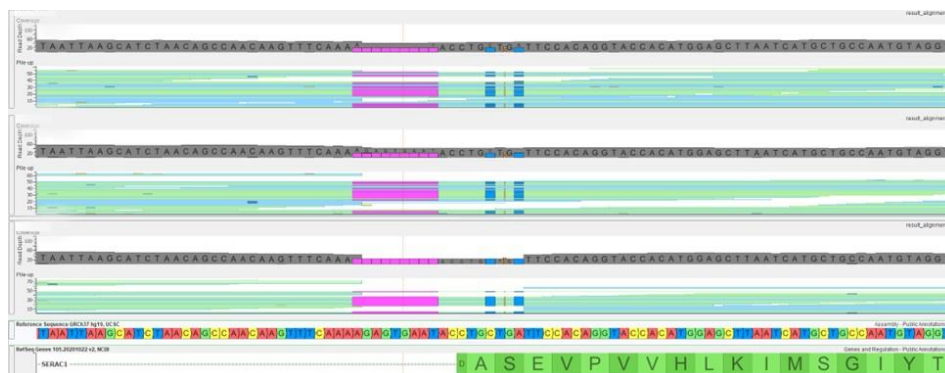
Молекулярно-генетично изследване

Беше извършено цялостно геномно секвениране и анализ на гени, асоциирани с различни метаболитни и митохондриални заболявания.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните от ЦГС, беше установено хомозиготно носителство на патогенен вариант в гена *SERAC1* (*Serine Active Site Containing 1*). Вариантът е унаследен от родителите му, които са хетерозиготни носители (Фигура 45).

Ген:	<i>SERAC1</i>	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0.00004600
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000006.11:g.158534471_158534487 delinsCCTGTTGGT NM_032861.4:c.1822_1828+10 delinsACCAACAGG	Вид на мутацията:	frameshift делеция
rs ID:	rs1554260851	Критерии за класификация по ACMG:	PVS1, PS4, PM2, и PP5
Генотип:	ХОМОЗИГОТ		
Класификация по ACMG:	<u>патогенен</u>		



Фигура 45. Визуализация на варианта при пациента и родителите му

Информация за гена: Генът *SERAC1* кодира протеин (Serine active site-containing protein 1) който поддържа нормалната функция на митохондриите и вътреклетъчния транспорт на фосфолипиди. Патологични варианти в гена са асоциирани с MEGDEL синдром, който представлява 3-метилглутаконова ацидурия с глухота, енцефалопатия и Leigh-подобен синдром, които се унаследява автозомно рецесивно (62-64) (OMIM ID: 614739).

Честота на заболяването: Заболяването е докладвано в базата данни Orphanet с епидемиологична честота <1 / 1 000 000.

1.6.1.14 Пациент WGS_140

Клинична картина

Пациентът е момиче на 2 години с интраутеринна ретардация, забавяне в моторното развитие, атаксична церебрална парализа, фонова ретинопатия и двустранна атрофия на зрителния нерв.

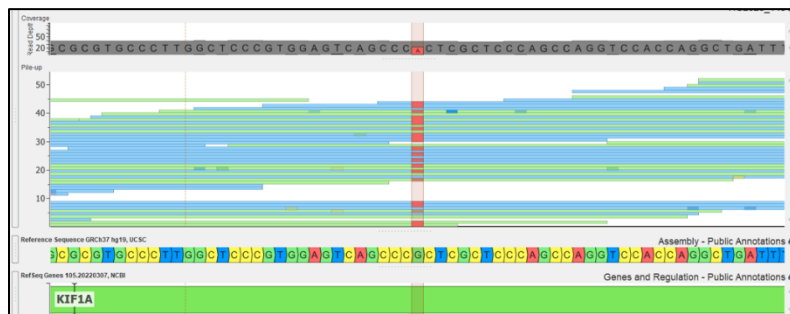
Молекулярно-генетично изследване

Беше извършено цялостно геномно секвениране и анализ на гени, асоциирани с различни неврологични заболявания.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, беше установено хетерозиготно носителство на патогенен вариант в гена *KIF1A* (*Kinesin Family Member 1A*) (Фигура 46).

Ген:	<i>KIF1A</i>	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000002.11:g.241723194G>A NM_001244008.2:c.760C>T NP_001230937.1:p.Arg254Trp	Вид на мутацията:	missense
rs ID:	rs879253888	Критерии за класификация по ACMG:	PS3, PS4_Moderate, PM1, PM2, PM5, PP2, PP3 и PP5
Генотип:	хетерозигот	Класификация по ACMG:	<u>патогенен</u>



Фигура 46. Визуализация на варианта *KIF1A:c.760C>T*

Информация за гена: Протеинът, кодиран от този ген е кинезин и функционира като anterograden моторен протеин, който транспортира мембранни органели по протежението на аксоналните микротубули. Продукта на генът *KIF1A* играе важна роля в аксоналния транспорт (65). Патологични варианти в гена *KIF1A* (*Kinesin-like protein KIF1A*) са асоциирани със няколко неврологични заболявания. Симптомите на пациентката отговарят на клиничната картина на NESCAV синдрома, като заболяването е прогресивно и с вариабилна клинична картина (OMIM ID: 614255).

Честота на заболяването: Заболяването е докладвано в базата данни Orphanet с епидемиологична честота $<1 / 1\,000\,000$.

1.6.1.15 Пациент WGS_152

Клинична картина

Пациентката е момиче на 1 година и 8 месеца с хипертрофична кардиомиопатия, ИНПР, лицев дисморфизъм и генерализирана мускулна хипотония.

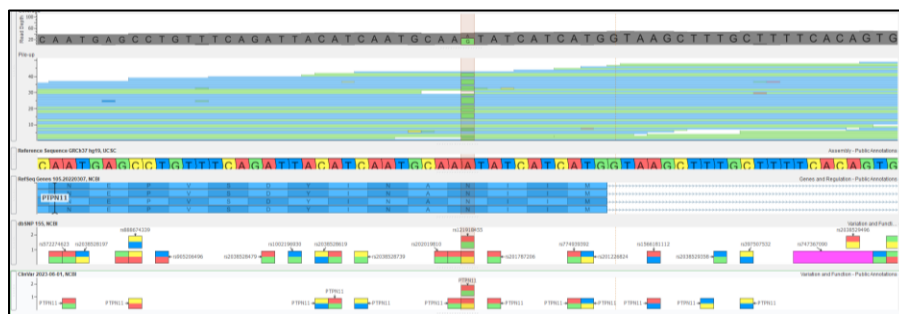
Молекулярно-генетично изследване

Беше извършено цялостно геномно секвениране и анализ на гени, асоциирани с различни неврологични заболявания.

Резултат

Вследствие на таргетния анализ на данните, беше установено хетерозиготно носителство на патогенен вариант в гена *PTPN11* (*Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 11*) и носителство на микродупликация на район на 17-та хромозома (17p13.3) с неясна клинична значимост (Фигура 47 и 48).

Ген:	<i>PTPN11</i>	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000012.11:g.112915524A>G NM_002834.5:c.923A>G NP_002825.3:p.Asn308Ser	Вид на мутацията:	missense
rs ID:	rs121918455	Критерии за класификация по ACMG:	PS4, PS3, PS2, PM5, PM2, PM1, PP5 и PP3
Генотип:	хетерозигот		
Класификация по ACMG:	<u>патогенен</u>		



Фигура 47. Визуализация на варианта *PTPN11*:c.923A>G

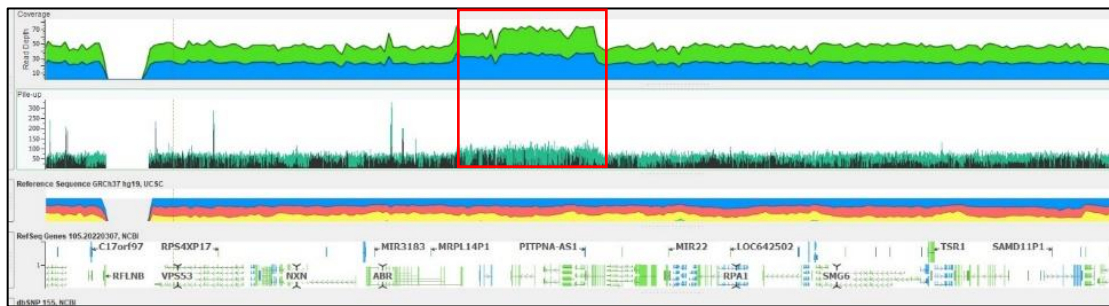
Информация за гена: Генът *PTPN11* (Protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor-type, 11) кодира протеин-тирозин фосфатаза, като дефекти в гена са асоциирани със синдром на Noonan (OMIM ID: 163950), синдром на LEOPARD (OMIM ID: 151100) или метакондроматоза (OMIM ID: 156250). Състоянията се унаследяват по автозомно доминантен механизъм.

Честота на заболяването: Заболяването е докладвано в базата данни Orphanet с епидемиологична честота <1 / 1 000 000.

Хромозомна вариация с неясна клинична значимост:

Наименования на варианта по HGVS	Структурна вариация	Гени	Популационна честота (gnomAD SV v.2.1)
NC_000017.10:g.(?_1121027)_1450337dup	микродупликация (>329 Kb)	<i>ABR, BHLHA9, TRARG1, YWHAЕ, CRK, MYO1C, INPP5K, PTPNA-AS1, PTPNA</i>	0

Следствие на приложени биоинформатични алгоритми за детекция на структурни вариации, установихме наличие на микродупликация на район от хромозома 17 (17p13.3) с размер от поне 329 Kb, обхващаща изброените гени (Фигура 49). Дупликации с по-малки размери са докладвани при пациенти с хетерогенна клинична картина, включваща различна степен на изоставане в развитието, лицев дисморфизъм, аутистични прояви и мускулна слабост (66, 67).



Фигура 48. Визуализация на идентифицираната микродупликация при пациентката

1.6.2 Идентифицирани варианти с неясна клинична значимост при пациенти с комплексна неврологична клинична картина и неизяснена етиология

От изследваните двадесет и двама пациенти при двама идентифицирахме два варианта с неясна клинична значимост, които би могло да са асоциирани с клиничния им фенотип.

1.6.2.1 Пациенти WGS_067 и WGS_068

Клинична картина

Касае се за момче на 7 години и момиче на 10 години – брат и сестра с еднаква клинична картина и поради тази причина ще ги опиша в един общ раздел. Сиблингите са с тежко изоставане в двигателното и интелектуално развитие – не проходили самостоятелно, не говорят (алалия), с прогресираща церебеларна дисфункция, атаксия и епилептичен синдром. Имат по-малка сестра на 5 години със същата клинична картина.

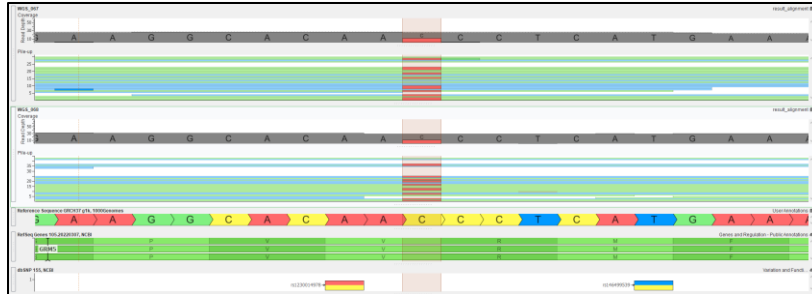
Молекулярно-генетично изследване

При двамата беше извършено цялостно геномно секвениране и анализ на гени, асоциирани с различни неврологични заболявания.

Резултат

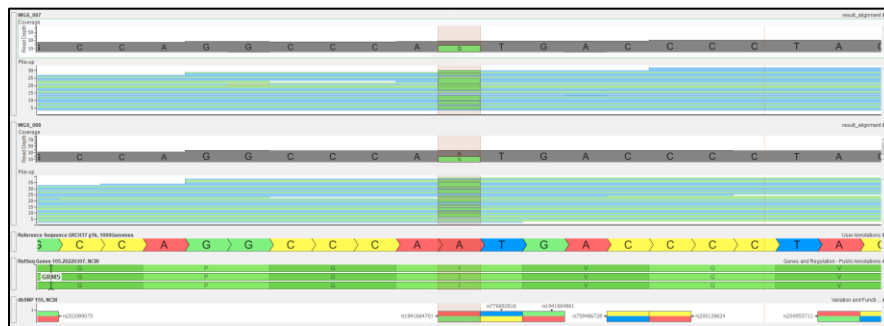
Вследствие на таргетния анализ на данните, при пациентите беше установено съставно хетерозиготно носителство на два варианта с неясна клинична значимост в гена *GRM5* (*Glutamate Metabotropic Receptor 5*) (Фигура 49 и 50).

Ген:	<i>GRM5</i>	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000011.9:g.88780470C>A NM_001143831.3:c.571G>T NP_001137303.1:p.Val191Phe	Вид на мутацията:	missense
rs ID:	-	Критерии за класификация по ACMG:	PM2 и PP3
Генотип:	хетерозигот		
Класификация по ACMG:	<u>вариант с неясна клинична значимост</u>		



Фигура 49. Визуализация на варианта *GRM5*:c.571G>T при двамата пациента

Ген:	<i>GRM5</i>	Популационна честота (gnomAD Exomes v2.1.1):	0
Наименования на варианта по HGVS:	NC_000011.9:g. 88780601A>G NM_001143831.3:c.440T>C NP_001137303.1:p.Ile147Thr	Вид на мутацията:	missense
rs ID:	-	Критерии за класификация по ACMG:	PM2 и PP3
Генотип:	хетерозигот		
Класификация по ACMG:	<u>вариант с неясна клинична значимост</u>		



Фигура 50. Визуализация на варианта *GRM5*:c.440T>C при двамата пациента

Информация за гена и обсъждане на получените резултати: Глутаматът е основният възбуждащ невротрансмитер в ЦНС. Той активира йонотропни канали и осем metabotropни G-протеин-свързани рецептори (GPCRs), които са експресирани в невронните и глиалните клетки. mGlu5 и mGlu1 са metabotropните глутаматни (mGlu) рецептори от клас I и функционират като хомодимери при глутаматергичната невротрансмисия, която е необходима за поддържането на нормалната мозъчна функция.

Генът *GRM5* (*Glutamate Metabotropic Receptor 5*) кодира metabotropен глутаматен рецептор 5 (mGluR5), чието активиране задейства фосфатидилинозитол-калциевия сигналния път. Активирането на mGlu рецептори от група I активира и ERK1/2 MAP-киназия и фосфатидилинозитол3-киназия (PI-3-K) сигнални пътища, които имат роля

при клетъчната пролиферация, диференциация и синаптична пластичност. Двата metabotropни рецептора от клас I са локализирани върху постсинаптичната мембрана, където местоположението им се поддържа от скелетните протеини homer и shank. mGlu5 рецептора участва в регулирането на активността на невронната мрежа и синаптичната пластичност, като основно се експресира в кортекса, хипокампуса, стриатума, базалните подкорови ядра на мозъка и nucleus accumbens (свързващото звено между лимбичната и екстрапирамидната система) (68, 69).

Въпреки, че mGlu5R и mGlu1R имат сходна функция и активират фосфатидилинозитол – калциевата система, те се различават по механизмите на вътреклетъчно освобождаване на Ca^{2+} . Активирането на mGluR1 води до еднократно усилено освобождаване на Ca^{2+} (като импулс), докато активирането на mGluR5 води до повтарящо и ритмично (тип осцилации) освобождаване на калциеви йони (68, 70).

Повишената активност на глутаматните рецептори може да доведе до редица неврологични заболявания. Нормалната глутаматергична невротрансмисия и активиране на глутаматните рецептори от една страна има трофичен ефект (нормално функциониране на нервната система), а от друга страна, токсичен ефект - свръхактивността на рецепторите води до повишено освобождаване на калциеви йони, дегенерация и клетъчна смърт (71).

Патологични варианти на *GRM1* (*Glutamate Metabotropic Receptor 1*) са асоциирани с автозомно рецесивна форма на спиноцеребеларна атаксия, докладвана и описана за първи път от български екип (72). Като се вземе в предвид гореописаното за взаимодействието, което имат двата рецептора, смятаме че, клиниката която се очаква да се прояви при наличие на патологични варианти в гена *GRM5* би била подобна на тази описана от Guergelcheva et al., през 2012 година. На този етап не може да се даде категорична информация за функционалните последици на идентифицираните варианти (с.571G>T и с.440T>C) при пациентите ни, необходими са допълнителни анализи, които ще потвърдят или отхвърлят теорията ни.

1.6.3 Обобщение на получените резултати

Изследваните пациенти с комплексна неврологична клинична картина и неизяснена етиология са общо двадесет и двама, като единадесет бяха изследвани, чрез цялостно екзомно секвениране и останалите, чрез цялостно геномно секвениране. При петнадесет пациенти, бяха установени патологични варианти, асоциирани с клиниката на които им беше поставена правилна генетична диагноза. При двама пациенти (брат и сестра) беше установено съставно хетерозиготно носителство на два варианта с неясна клинична значимост в гена *GRM5*. При пет пациенти не бяха установени варианти, асоциирани със състоянията им.

VI. ОБСЪЖДАНЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Неврогенетичните заболявания са голяма и хетерогенна група, засягащи централната, периферната нервна система и/или мускулите. Те представляват повече от осемдесет процента от всички редки заболявания, което не е изненадващо, ако се вземе в предвид факта, че 1/3 от гените в човешкия геном се експресират в мозъка (73).

Поради хетерогенната клинична картина, която често е припокриваща и зависи от тежестта на фенотипа, поставянето на генетична диагноза е голямо предизвикателство. Честотата на тези заболявания е в границите между 6–9/10 000 до < 1/1 000 000, като последната е характерна за ултраредките заболявания.

1. Обсъждане на получените резултати

При тридесет и девет пациенти (51.3%) идентифицирахме 46 патогенни или вероятно патогенни варианти, което доведе до поставяне на генетична диагноза при засегнатите. Трима от тях – двама с тирозин хидроксилазна недостатъчност и един с автозомно доминантна форма на допамин - зависима дистония, започнаха терапия, която значително подобри здравословното им състояние. При пациентите с комплексна неврологична клинична картина и неизяснена етиология, генетичният дефект, бе установен при 68.18%. При нито един от пациентите с бенигна форма на епилепсия (4-ма) не се установи патогенна или вероятно патогенна находка, която да обясни пристъпите. Идентифицирани бяха 18 нови и неописани патогенни варианти, асоциирани с клиничния фенотип на пациентите (Таблица 3).

Таблица 3. Описание на идентифицираните неизвестните патогенни варианти

Ген	Номенклатура по HGVS
<i>MSL3</i>	NM_078629.4:c.1125_1141dup NP_523353.2:p.Met381Argfs*30
<i>PURA</i>	NM_005859.5:c.586_588del NP_005850.1:p.Ile196del
<i>MTOR</i>	NM_004958.4:c.7216G>A NP_004949.1:p.Val2406Met
<i>DYRK1A</i>	NM_001347721.2:c.322C>T NP_001334650.1:p.(Arg108*)
<i>TRMT1</i>	NM_017722.4:c.1630C>T NP_060192.1:p.(Arg544*)
<i>CSNK2A1</i>	NM_177559.3:c.400C>T NP_808227.1:p.(Arg134*)
<i>GPHN</i>	NM_020806.5:c.65-1G>C
<i>MECP2</i>	NM_001110792.2:c.937C>G NP_001104262.1:p.Leu313Val
<i>COL18A1</i>	NM_030582.3:c.3623C>A NP_085059.2:p.(Ser1208*)

Ген	Номенклатура по HGVS
<i>SLC6A8</i>	NM_005629.4:c.1769G>A NP_005620.1:p.Arg590His
<i>ABCA13</i>	NC_000007.13(NM_152701.5):c.2510del NP_689914.3:p.(Leu837Tyrfs*21)
<i>GRIN2B</i>	NM_000834.5:c.2392A>C NP_000825.2:p.Thr798Pro
<i>SPEN</i>	NM_015001.3:c.6007G>T NP_055816.2:p.(Glu2003*)
<i>TH</i>	NM_000360.4:c.1118C>T NP_000351.2:p.Thr373Met
<i>SIK3</i>	NM_025164.6:c.950T>G NP_079440.3:p.Met317Arg
<i>P4HA1</i>	NM_000917.4:c.1084C>T NP_000908.2:p.(Arg362*)
<i>GABRB1</i>	NM_000812.4:c.898A>T NP_000803.2:p.Ile300Phe
<i>ERCC6</i>	NM_000124.4:c.2321_2322del NP_000115.1:p.(Lys774Serfs*7)

В резултат на бionформатичния анализ на данните от ЦЕС и ЦГС и интерпретация на идентифицираните находки, бяха докладвани 11 редки заболявания с честота от 1-5 / 10 000 до 1-9 / 1 000 000 и 27 ултравредки с честота <1 / 1 000 000, като шестнадесет са без епидемиологична честота поради малкия брой на докладвани пациенти. За по-голяма част от тези заболявания няма налична таргетна терапия, но поставянето на диагноза позволи по-добро менажиране на заболяването от страна на лекуващите лекари, даде възможност за прогноза на хода на болестта и планиране на превенцията в засегнатите семейства.

При пациент с номер WGS_031, бяха установени две ултравредки заболявания – спондилоепиметафизарна дисплазия, тип Краков и P4HA1 - асоциирана колагенопатия, които към момента на анализа, отговарят на проявената клинична картина на пациентката. Цялостното геномно секвениране позволи да се направи анализ на райони със загуба на хетерозиготност, което показва близко кръвно родство между родителите ѝ. Не се изключва възможността, при пациентката да е налице и друго заболяване, което би се проявило в напреднал етап от развитието ѝ.

Пациенти с идентифицирани варианти с неясна клинична значимост

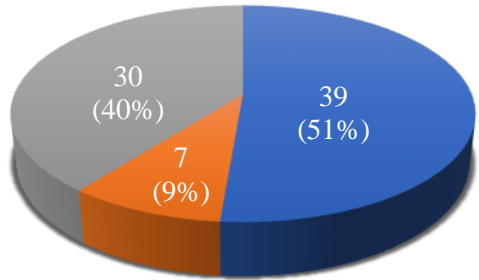
При седем от пациентите идентифицирахме осем варианта с неясна клинична значимост (*TLR7*:c.2441del; *MTM1*:c.-10-3115_-10-1176delinsCA; *ABCA13*:c.11831C>T; *ABCA13*:c.13641-92_13641-89del; *PCDH19*:c.82T>A; *SCN1B*:c.478G>A; *GRM5*:c.571G>T и *GRM5*:c.440T>C), които биха могли да са асоциирани с фенотипа им.

Пациенти с негативен резултат след ЦЕС или ЦГС

След извършване на таргетния биоинформатичен анализ при 30 пациенти (40%) не беше установен генетичен вариант, който да обясни клиничната картина на засегнатите. От тези пациенти двадесет са изследвани, чрез цялостно екзомно и 10, чрез цялостно геномно секвениране.

Обобщение на получените резултати е направено на фигура 51.

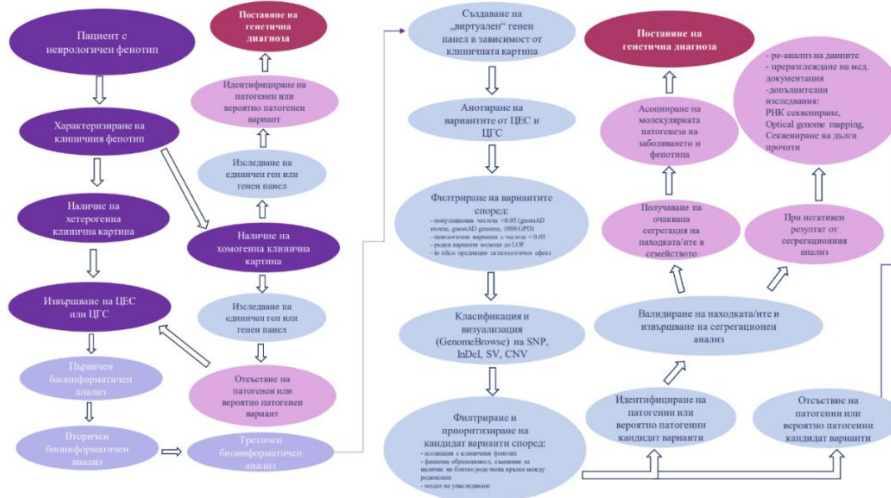
Резултати от анализ на данните от ЦЕС и ЦГС



- Брой на пациенти с идентифицирани патогенни / вероятно патогенни варианти
- Брой на пациенти с идентифицирани VUS
- Брой на пациенти без находка

Фигура 51. Получените резултати след извършения анализ на данните от ЦЕС и ЦГС при пациентската група, като общия брой на пациентите е 76

Изследването позволи да се изработи ефективно алгоритъм за прилагане на ЦЕС или ЦГС и таргетен биоинформатичния анализ при пациенти с неврологични заболявания (Фигура 52).



Фигура 52. Предложен алгоритъм за прилагане на цялостно екзомно и цялостно геномно секвениране при пациенти с хетерогенна неврологична клинична картина и биоинформатичен анализ на данните

2. Бъдещи направления

Бъдещи направления при пациентите без установена находка

При тази група пациенти една от насоките за бъдещо направление е извършване на повторен анализ след 6 месеца до 1 година. При пациентите: WES_133, WES_279, WGS_001, WGS_004, WGS_046, WGS_047, WGS_055, идентифицираните находки са следствие от реанализ на данните, след преразглеждане на актуалната медицинска

документация, допълване на списъка с гени от виртуалния генен панел, подобряване и индивидуализиране на бионформатичния подход.

По отношение на допълнителни изследвания, които може да се направят при тези пациенти, възможностите са следните: 1) ЦГС на къси прочити - при пациенти без находка от ЦЕС; 2) Трио анализ (чрез ЦЕС или ЦГС); 3) Секвениране от трето поколение (ЦГС на дълги прочити); 4) РНК секвениране;

Бъдещи направления при пациентите с установени варианти с неясна клинична значимост

При пациентите с установени варианти с неясна клинична значимост, първоначална стъпка е да се изследват родителите, чрез сегрегационен анализ, като целта е да се установи носителския статут в семейството. При пациенти WGS_003 (*PCDH19*:c.82T>A), WGS_131 (*MTM1*:c.-10-3115_-10-1176delinsCA) и WES_007 (*SCN1B*:c.478G>A), към момента не е извършен такъв анализ, поради нежелание от страна на родителите. При тази ситуация периодично се проверява научната информация за конкретните варианти или при необходимост се извършва реанализ на данните след разширяване на генния панел. При пациенти WGS_100 (*TLR7*:c.2441del), WGS_001 (*ABCA13*:c.11831C>T и c.13641-92_13641-89del), WGS_067 и WGS_068 (*GRM5*:c.571G>T и c.440T>C) извършихме сегрегационен анализ, като пациентката с номер WGS_100 (*TLR7*:c.2441del) е унаследила варианта от баща си, а пациентите WGS_001, WGS_067 и WGS_068 са съставно хетерозиготни носители на описаните варианти и всеки един от вариантите е унаследен от някой от родителите. Пациент WGS_001 има клинично здрав брат, който е хетерозиготен носител само на единия вариант (*ABCA13*:c.11831C>T).

Допълнителните изследвания, които може да се направят при пациенти WGS_100 и WGS_001 включват анализ на кристалографски данни на протеини, чрез изработване на 3D модел (Protein Data Bank). Определяне на функционалните последици от генния вариант, чрез РНК секвениране и не на последно място функционални анализи, чрез използване на моделни организми (*Drosophila melanogaster*, мишки) и човешки клетки.

Бъдещи направления при семейството с варианти в гена *GRM5*

При семейството с идентифицирани варианти в *GRM5*, бе извършен сегрегационен анализ, с цел да се установи носителския статут. Резултатите от този анализ показаха, че клинично здравите лица (родителите и двама сиблинги) са хетерозиготни носители на

един от идентифицираните варианти. В семейството има и трето засегнато дете със същата клинична картина, като то също е съставен хетерозиготен носител на двата варианта (с.571G>T и с.440T>C). С цел потвърждаване или отхвърляне на асоциацията с определена патогенеза на гени с неясна клинична значимост, какъвто е *GRM5*, необходими са допълнителни анализи, които включват: определяне на честотата в конкретната популацията (в този случай е ромска популация) при клинично здрави или засегнати лица; колаборации с различни консорциуми и организации, които работят в областта; използване на достъпни платформи от типа на GeneMatcher; изследване на функционалните ефекти на идентифицираните варианти, чрез тъканно-специфична експресия, както и *in vivo* функционални анализи използвайки човешки клетки и животински моделни организми.

3. Заключение

Редките неврологични заболявания са като айсберг – виждаме пациентите, които са диагностицирани рано или оцеляват достатъчно дълго, за да получат лечение, но не и тези, които не оцеляват. Те са водеща причина за детската смъртност в света и ранното идентифициране на генетичния дефект е най-важният определящ фактор за получаване на възможност за оцеляване на засегнатите. Съвременните геномни технологии допринасят за по-добро молекулярно характеризирание на редките заболявания, но предоставят и нови възможности за дефиниране на комплексността на патогенните механизми.

Получените резултати потвърдиха предимствата и приложимостта на съвременните геномни технологии (ЦЕС и ЦГС) при пациенти с недиагностицирани заболявания. В този дисертационен труд са описани първите пациенти с комплексна клинична картина и неизяснена етиология, изследвани, чрез цялостно геномно секвениране в България и това е най-многобройната група изследвана, чрез съвременни геномни технологии (ЦЕС и ЦГС), като диагностичната успеваемост в резултат на проведените изследвания е 51.3%. Установяването на молекулярната патогенеза на състоянията, прекрати диагностичната одисея на пациентите, даде възможност за прогноза на хода на заболяванията, терапия и планиране на превенцията в засегнатите семейства.

VII ИЗВОДИ

6.1 Установени бяха 46 патогенни и вероятно патогенни варианта, от които 15 са асоциирани с 11 редки заболявания (1-5/10,000 до 1-9/1,000,000) и тридесет и един варианта, асоциирани с 27 ултраредки болести с честота $<1/1,000,000$.

6.2 Идентифицирани са 18 нови неописани варианти, асоциирани с клиничния фенотип на пациентите с неврологична симптоматика (*MSL3:c.1125_1141dup*; *PURA:c.586_588del*; *MTOR:c.7216G>A*; *DYRK1A:c.322C>T*; *TRMT1:c.1630C>T*; *CSNK2A1:c.400C>T*; *GPHN:c.65-1G>C*; *MECP2:c.937C>G*; *COL18A1:c.3623C>A*; *SLC6A8:c.1769G>A*; *ABCA13:c.2510del*; *GRIN2B:c.2392A>C*; *SPEN:c.6007G>T*; *TH:c.1118C>T*; *SIK3:c.950T>G*; *P4HA1:c.1084C>T*; *GABRB1:c.898A>T* и *ERCC6:c.2321_2322del*).

6.3. 8 варианта бяха класифицирани, като варианти с неясно клинично значение и биха могли да са асоциирани с молекулярната патогенеза на заболяването при засегнатите пациенти.

6.4. От установените 8 варианта с неясно клинично значение, два са в ген, който към момента на изследването не е асоцииран с конкретно заболяване, но участва в сигнални пътища и молекулни механизми, регулиращи активността на невронната мрежа и синаптичната пластичност.

6.5. При една пациентка беше идентифицирано хомозиготно носителство на патогенни варианти, асоциирани с две ултраредки заболявания – спондилоепиметафизарна дисплазия, тип Краков и P4HA1-асоциирана колагенопатия.

6.6. Прилагането на таргетен биоинформатичен анализ на данни от цялостно екзомно или геномно секвениране има потенциала да установи генетични дефекти, асоциирани с фенотипа при 51.3% (39/76) от изследваните пациентите с неврологична клинична картина. Най-висок е процентът при пациентите с комплексна клинична картина и неизяснена етиология – 68.18% (15/22).

VIII ПРИНОСИ

1. Приноси с научна стойност

1. Идентифицирани са осемнадесет неописани патогенни или вероятно патогенни генетични варианти, асоциирани с клиничния фенотип на изследваните пациенти с неврологични заболявания. Идентифицираните находки са докладвани в базата данни Clinvar.

2. Съставена е собствена база данни на редки неврологични заболявания и техния генетичен статус.

3. Предложена е хипотеза за вероятен молекулярен механизъм на неописано неврологично заболяване, асоциирано с два варианта с неясна клинична значимост в гена *GRM5*.

2. Приноси с приложен характер

1. Разработен и усъвършенстван е индивидуален подход за биоинформатичен анализ на данни от цялостно екзомно и геномно секвениране, подход който многократно увеличи диагностичната успеваемост при идентифициране на патогенни и вероятно патогенни варианти.

2. Изработен е алгоритъм за прилагане на ЦЕС или ЦГС при пациенти с неврологични заболявания.

3. За първи път в България, чрез цялостно геномно секвениране са изследвани пациенти с неврологични заболявания и са охарактеризирани известни и нови патогенни и вероятно патогенни варианти.

IX. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Atanasoska M.**, Vazharova R., Stevanovic G., et al (2023). Dopa-responsive dystonia in Bulgarian patients: report of three cases. *Eur J Hum Genet.* <https://doi.org/10.1038/s41431-023-01370-4>. Импакт фактор: 5.351; Q index – Q1
2. **Atanasoska M.**, Vazharova R., Popova A., et al. “Mutational and clinical spectrum of the *PAX6* gene in Bulgarian patients with aniridia”. *C. R. Acad. Bulg. Sci.* (приета за публикация с протокол № 2/24.02.2022 г.); Q index – Q3
3. Toncheva D, **Atanasoska M**, Marinova M, Borovska P, Serbezov D. (2023). Prevalence of Rare Variants Associated with Monogenic Diseases in Pre-contact Caribbean Communities. *C. R. Acad. Bulg. Sci.* 2023; 76(4):532-540. Q index – Q3
4. Янева Стайкова С. и **Атанасоска М.**, Шишиньов С., и съав. (2023). NESCAV синдром: клиничен случай. *Редки болести и лекарства сираци*; 14 (3-4) <https://doi.org/10.36865/2023.v14i3-4.187>.

X. ПРЕЗЕНТАЦИИ ПО НАУЧНИ ФОРУМИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Устен доклад на тема: *Избор на цялостно геномно секвениране при недиагностицирани случаи с неврологична симптоматика.* 14-та Национална конференция по редки болести и лекарства сираци, 2023, Пловдив, България
2. Устен доклад на тема: *Whole exome and whole genome sequencing for the diagnosis of rare paediatric neurological disorders.* 15th European Paediatric Neurology Society Congress, 2023, Prague, Czech Republic

XI. ПОСТЕРИ И УЧАСТИЯ ПО НАУЧНИ ФОРУМИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Atanasoska M., Vazharova R., Balabanski L., Staykova-Yaneva S., Toncheva D. *Whole genome sequencing inadvertently reveals first degree consanguinity: A clinical case.* European Human Genetics Conference 2023, 10-13 June, Glasgow, Scotland.
2. Atanasoska M, Vazharova R, Balabanski L, Staykova-Yaneva S, Toncheva D. *Shortening the diagnostic odyssey in patients with rare diseases through WES.* 13th National conference for rare diseases and orphan drugs, Plovdiv, Bulgaria, 2022.
3. Atanasoska M, Vazharova R, Balabanski L, Staykova-Yaneva S, Toncheva D. *Basilicata-Akhtar syndrome in Bulgarian patient: a case report.* European conference for rare disease, virtual, 2022.

4. Атанасоска М, Въжарова Р, Балабански Л, Янева Стайкова С, Тончева Д. *Пренатална изява на POLG-асоциирано заболяване в резултат на хетерозиготни патологични варианти в гена кодиращ митохондриалната ДНК полимераза*. 12-та Национална конференция по редки болести и лекарства сираци, виртуална, 2021.

5. Atanasoska M, Vazharova R, Balabanski L, Staykova-Yaneva S, Toncheva D. *Tyrosine hydroxylase deficiency associated with DOPA-responsive dystonia in a Bulgarian family*. The European Human Genetics Conference 2021, virtual, 2021.

XII. ИСПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Antonarakis SE, Beckmann JS. Mendelian disorders deserve more attention. *Nat Rev Genet.* 2006;7(4):277-82.
2. Deltas C. Digenic inheritance and genetic modifiers. *Clin Genet.* 2018;93(3):429-38.
3. Rahit K, Tarailo-Graovac M. Genetic Modifiers and Rare Mendelian Disease. *Genes (Basel).* 2020;11(3).
4. Negi SK, Guda C. Global gene expression profiling of healthy human brain and its application in studying neurological disorders. *Sci Rep.* 2017;7(1):897.
5. Toncheva D. *Genomic Medicine* 2015.
6. Marwaha S, Knowles JW, Ashley EA. A guide for the diagnosis of rare and undiagnosed disease: beyond the exome. *Genome Med.* 2022;14(1):23.
7. Collins FS, Fink L. The Human Genome Project. *Alcohol Health Res World.* 1995;19(3):190-5.
8. Shi Y, Ghosh M, Kovtunovych G, Crooks DR, Rouault TA. Both human ferredoxins 1 and 2 and ferredoxin reductase are important for iron-sulfur cluster biogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823(2):484-92.
9. Sheftel AD, Stehling O, Pierik AJ, Elsasser HP, Muhlenhoff U, Webert H, et al. Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(26):11775-80.
10. Basilicata MF, Bruel AL, Semplicio G, Valsecchi CIK, Aktas T, Duffourd Y, et al. De novo mutations in MSL3 cause an X-linked syndrome marked by impaired histone H4 lysine 16 acetylation. *Nat Genet.* 2018;50(10):1442-51.
11. Brunet T, McWalter K, Mayerhanser K, Anbouba GM, Armstrong-Javors A, Bader I, et al. Defining the genotypic and phenotypic spectrum of X-linked MSL3-related disorder. *Genet Med.* 2021;23(2):384-95.
12. Longo N. Disorders of bipterin metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 2009;32(3):333-42.
13. Groh M, Albuлесcu LO, Cristini A, Gromak N. Senataxin: Genome Guardian at the Interface of Transcription and Neurodegeneration. *J Mol Biol.* 2017;429(21):3181-95.
14. Molitor L, Bacher S, Burczyk S, Niessing D. The Molecular Function of PURA and Its Implications in Neurological Diseases. *Front Genet.* 2021;12:638217.
15. Li H, Liu S, Han J, Li S, Gao X, Wang M, et al. Role of Toll-Like Receptors in Neuroimmune Diseases: Therapeutic Targets and Problems. *Front Immunol.* 2021;12:777606.
16. Adhikarla SV, Jha NK, Goswami VK, Sharma A, Bhardwaj A, Dey A, et al. TLR-Mediated Signal Transduction and Neurodegenerative Disorders. *Brain Sci.* 2021;11(11).
17. Lehmann SM, Rosenberger K, Kruger C, Habbel P, Derkow K, Kaul D, et al. Extracellularly delivered single-stranded viral RNA causes neurodegeneration dependent on TLR7. *J Immunol.* 2012;189(3):1448-58.
18. Jungbluth H, Gautel M. Pathogenic mechanisms in centronuclear myopathies. *Front Aging Neurosci.* 2014;6:339.
19. Scorrano G, David E, Cali E, Chimenz R, La Bella S, Di Ludovico A, et al. The Cardiofaciocutaneous Syndrome: From Genetics to Prognostic-Therapeutic Implications. *Genes (Basel).* 2023;14(12).
20. D'Arca D, Zhao X, Xu W, Ramirez-Martinez NC, Iavarone A, Lasorella A. Huwe1 ubiquitin ligase is essential to synchronize neuronal and glial differentiation in the developing cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(13):5875-80.
21. Hu HT, Shih PY, Shih YT, Hsueh YP. The Involvement of Neuron-Specific Factors in Dendritic Spinogenesis: Molecular Regulation and Association with Neurological Disorders. *Neural Plast.* 2016;2016:5136286.
22. Iossifov I, Ronemus M, Levy D, Wang Z, Hakker I, Rosenbaum J, et al. De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron.* 2012;74(2):285-99.

23. Guo H, Wang T, Wu H, Long M, Coe BP, Li H, et al. Inherited and multiple de novo mutations in autism/developmental delay risk genes suggest a multifactorial model. *Mol Autism*. 2018;9:64.
24. Xie Y, Wang H, Hu B, Zhang X, Liu A, Cai C, et al. Dendritic Spine in Autism Genetics: Whole-Exome Sequencing Identifying De Novo Variant of CTTNBP2 in a Quad Family Affected by Autism Spectrum Disorder. *Children (Basel)*. 2022;10(1).
25. Shih PY, Hsieh BY, Tsai CY, Lo CA, Chen BE, Hsueh YP. Autism-linked mutations of CTTNBP2 reduce social interaction and impair dendritic spine formation via diverse mechanisms. *Acta Neuropathol Commun*. 2020;8(1):185.
26. Shih PY, Hsieh BY, Lin MH, Huang TN, Tsai CY, Pong WL, et al. CTTNBP2 Controls Synaptic Expression of Zinc-Related Autism-Associated Proteins and Regulates Synapse Formation and Autism-like Behaviors. *Cell Rep*. 2020;31(9):107700.
27. Knight HM, Pickard BS, Maclean A, Malloy MP, Soares DC, McRae AF, et al. A cytogenetic abnormality and rare coding variants identify ABCA13 as a candidate gene in schizophrenia, bipolar disorder, and depression. *Am J Hum Genet*. 2009;85(6):833-46.
28. Gerik-Celebi HB, Aydin H, Bolat H, Unsel-Bolat G. Clinical and Genetic Characteristics of Patients with Unexplained Intellectual Disability/Developmental Delay without Epilepsy. *Mol Syndromol*. 2023;14(3):208-18.
29. Gerik-Celebi HB. Association of ABCA13 Gene Variants with Autism Spectrum Disorder and Other Neuropsychiatric Disorders. *Molecular Syndromology*. 2023.
30. Quinodoz M, Royer-Bertrand B, Cisarova K, Di Gioia SA, Superti-Furga A, Rivolta C. DOMINO: Using Machine Learning to Predict Genes Associated with Dominant Disorders. *Am J Hum Genet*. 2017;101(4):623-9.
31. Bell S, Maussion G, Jefri M, Peng H, Theroux JF, Silveira H, et al. Disruption of GRIN2B Impairs Differentiation in Human Neurons. *Stem Cell Reports*. 2018;11(1):183-96.
32. Robert-Finestra T, Tan BF, Mira-Bontenbal H, Timmers E, Gontan C, Merzouk S, et al. SPEN is required for Xist upregulation during initiation of X chromosome inactivation. *Nat Commun*. 2021;12(1):7000.
33. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(9):e67.
34. Silvia Bassani CM, Maria Passafaro. Chapter 21 - Neurodevelopment and PCDH19-related developmental and epileptic encephalopathy (PCDH19-DDE). In: Colin R. Martin VRP, Rajkumar Rajendram, editor. *Diagnosis, Management and Modeling of Neurodevelopmental Disorders*: Academic Press; 2021. p. 241-52.
35. Lim J, Ryu J, Kang S, Noh HJ, Kim CH. Autism-like behaviors in male mice with a Pcdh19 deletion. *Mol Brain*. 2019;12(1):95.
36. de Lange IM, Rump P, Neuteboom RF, Augustijn PB, Hodges K, Kistemaker AI, et al. Male patients affected by mosaic PCDH19 mutations: five new cases. *Neurogenetics*. 2017;18(3):147-53.
37. Kolc KL, Moller RS, Sadleir LG, Scheffer IE, Kumar R, Gecz J. PCDH19 Pathogenic Variants in Males: Expanding the Phenotypic Spectrum. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1298:177-87.
38. Kerner-Rossi M, Gulinello M, Walkley S, Dobrenis K. Pathobiology of Christianson syndrome: Linking disrupted endosomal-lysosomal function with intellectual disability and sensory impairments. *Neurobiol Learn Mem*. 2019;165:106867.
39. Besterman AD, Althoff T, Elfferich P, Gutierrez-Mejia I, Sadik J, Bernstein JA, et al. Functional and structural analyses of novel Smith-Kingsmore Syndrome-Associated MTOR variants reveal potential new mechanisms and predictors of pathogenicity. *PLoS Genet*. 2021;17(7):e1009651.
40. Pijuan I, Balducci E, Soto-Sanchez C, Fernandez E, Barallobre MJ, Arbones ML. Impaired macroglial development and axonal conductivity contributes to the neuropathology of DYRK1A-related intellectual disability syndrome. *Sci Rep*. 2022;12(1):19912.

41. Atanasoska M, Vazharova R, Stevanovic G, Bradinova I, Staykova SY, Balabanski L, et al. Dopa-responsive dystonia in Bulgarian patients: report of three cases. *Eur J Hum Genet*. 2023.
42. Okur V, Cho MT, Henderson L, Retterer K, Schneider M, Sattler S, et al. De novo mutations in CSNK2A1 are associated with neurodevelopmental abnormalities and dysmorphic features. *Hum Genet*. 2016;135(7):699-705.
43. Xiong QP, Li J, Li H, Huang ZX, Dong H, Wang ED, et al. Human TRMT1 catalyzes m(2)G or m(2)(2)G formation on tRNAs in a substrate-dependent manner. *Sci China Life Sci*. 2023;66(10):2295-309.
44. Kirsch J, Wolters I, Triller A, Betz H. Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons. *Nature*. 1993;366(6457):745-8.
45. Chooi G, Ko J. Gephyrin: a central GABAergic synapse organizer. *Exp Mol Med*. 2015;47:e158.
46. Bender HU, Almashanu S, Steel G, Hu CA, Lin WW, Willis A, et al. Functional consequences of PRODH missense mutations. *Am J Hum Genet*. 2005;76(3):409-20.
47. Banerjee A, Romero-Lorenzo E, Sur M. MeCP2: making sense of missense in Rett syndrome. *Cell Res*. 2013;23(11):1244-6.
48. Farr CV, El-Kasaby A, Freissmuth M, Sucic S. The Creatine Transporter Unfolded: A Knotty Premise in the Cerebral Creatine Deficiency Syndrome. *Front Synaptic Neurosci*. 2020;12:588954.
49. Zhu Z, Bolt E, Newmaster K, Osei-Bonsu W, Cohen S, Cuddapah VA, et al. SCN1B Genetic Variants: A Review of the Spectrum of Clinical Phenotypes and a Report of Early Myoclonic Encephalopathy. *Children (Basel)*. 2022;9(10).
50. Rahman S, Copeland WC. POLG-related disorders and their neurological manifestations. *Nat Rev Neurol*. 2019;15(1):40-52.
51. Sweatt JD. Pitt-Hopkins Syndrome: intellectual disability due to loss of TCF4-regulated gene transcription. *Exp Mol Med*. 2013;45(5):e21.
52. Jiang Q, Wang Y, Xiang M, Hua J, Zhou T, Chen F, et al. UFL1, a UFMylation E3 ligase, plays a crucial role in multiple cellular stress responses. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14:1123124.
53. Hoskins BE, Cramer CH, Silvius D, Zou D, Raymond RM, Orten DJ, et al. Transcription factor SIX5 is mutated in patients with branchio-oto-renal syndrome. *Am J Hum Genet*. 2007;80(4):800-4.
54. Mahajan VB, Olney AH, Garrett P, Chary A, Dragan E, Lerner G, et al. Collagen XVIII mutation in Knobloch syndrome with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Med Genet A*. 2010;152A(11):2875-9.
55. Endo T. Glycobiology of alpha-dystroglycan and muscular dystrophy. *J Biochem*. 2015;157(1):1-12.
56. Licht CL, Stevnsner T, Bohr VA. Cockayne syndrome group B cellular and biochemical functions. *Am J Hum Genet*. 2003;73(6):1217-39.
57. Csukasi F, Duran I, Barad M, Barta T, Gudernova I, Trantirek L, et al. The PTH/PTHrP-SIK3 pathway affects skeletogenesis through altered mTOR signaling. *Sci Transl Med*. 2018;10(459).
58. Zou Y, Donkervoort S, Salo AM, Foley AR, Barnes AM, Hu Y, et al. P4HA1 mutations cause a unique congenital disorder of connective tissue involving tendon, bone, muscle and the eye. *Hum Mol Genet*. 2017;26(12):2207-17.
59. Gonzales PR, Andersen EF, Brown TR, Horner VL, Horwitz J, Rehder CW, et al. Interpretation and reporting of large regions of homozygosity and suspected consanguinity/uniparental disomy, 2021 revision: A technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med*. 2022;24(2):255-61.
60. Zhang H, Cao X, Wang J, Li Q, Zhao Y, Jin X. LZTR1: A promising adaptor of the CUL3 family. *Oncol Lett*. 2021;22(1):564.
61. Whiting PJ, Bonnert TP, McKernan RM, Farrar S, Le Bourdelles B, Heavens RP, et al. Molecular and functional diversity of the expanding GABA-A receptor gene family. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;868:645-53.

62. Wortmann SB, Vaz FM, Gardeitchik T, Vissers LE, Renkema GH, Schuurs-Hoeijmakers JH, et al. Mutations in the phospholipid remodeling gene SERAC1 impair mitochondrial function and intracellular cholesterol trafficking and cause dystonia and deafness. *Nat Genet.* 2012;44(7):797-802.
63. Pronicka E, Piekutowska-Abramczuk D, Ciara E, Trubicka J, Rokicki D, Karkucinska-Wieckowska A, et al. New perspective in diagnostics of mitochondrial disorders: two years' experience with whole-exome sequencing at a national paediatric centre. *J Transl Med.* 2016;14(1):174.
64. Maas RR, Iwanicka-Pronicka K, Kalkan Ucar S, Alhaddad B, AlSayed M, Al-Owain MA, et al. Progressive deafness-dystonia due to SERAC1 mutations: A study of 67 cases. *Ann Neurol.* 2017;82(6):1004-15.
65. Nair A, Greeny A, Rajendran R, Abdelgawad MA, Ghoneim MM, Raghavan RP, et al. KIF1A-Associated Neurological Disorder: An Overview of a Rare Mutational Disease. *Pharmaceuticals (Basel).* 2023;16(2).
66. Blazejewski SM, Bennison SA, Smith TH, Toyo-Oka K. Neurodevelopmental Genetic Diseases Associated With Microdeletions and Microduplications of Chromosome 17p13.3. *Front Genet.* 2018;9:80.
67. Da Silva JD, Gonzaga D, Barreta A, Correia H, Fortuna AM, Soares AR, et al. Refining the Clinical Spectrum of the 17p13.3 Microduplication Syndrome: Case-Report of a Familial Small Microduplication. *Biomedicines.* 2022;10(12).
68. Ledonne A, Mercuri NB. Insights on the Functional Interaction between Group 1 Metabotropic Glutamate Receptors (mGluR1) and ErbB Receptors. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21).
69. Dore AS, Okrasa K, Patel JC, Serrano-Vega M, Bennett K, Cooke RM, et al. Structure of class C GPCR metabotropic glutamate receptor 5 transmembrane domain. *Nature.* 2014;511(7511):557-62.
70. Catania MV, D'Antoni S, Bonaccorso CM, Aronica E, Bear MF, Nicoletti F. Group I metabotropic glutamate receptors: a role in neurodevelopmental disorders? *Mol Neurobiol.* 2007;35(3):298-307.
71. Pin JP, Acher F. The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2002;1(3):297-317.
72. Guergueltcheva V, Azmanov DN, Angelicheva D, Smith KR, Chamova T, Florez L, et al. Autosomal-recessive congenital cerebellar ataxia is caused by mutations in metabotropic glutamate receptor 1. *Am J Hum Genet.* 2012;91(3):553-64.
73. Alazami AM, Patel N, Shamseldin HE, Anazi S, Al-Dosari MS, Alzahrani F, et al. Accelerating novel candidate gene discovery in neurogenetic disorders via whole-exome sequencing of prescreened multiplex consanguineous families. *Cell Rep.* 2015;10(2):148-61.

Електронни източници:

1. <http://www.cshlp.org>
2. <http://www.ensembl.org>
3. www.genecards.org
4. <http://www.orphadata.org>
5. <http://www.mitomap.org>
6. <https://franklin.genoox.com>
7. <https://varsome.com/>
8. <https://www.uniprot.org/>
9. <https://gnomad.broadinstitute.org/>
10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
11. <https://evs.gs.washington.edu/EVS/>
12. <http://varnomen.hgvs.org/>
13. <https://hsf.genomnis.com/>
14. <https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP/>
15. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>