МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА „МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ”
ЦЕНТЪР ПО МОЛЕКУЛНА МЕДИЦИНА

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ И ГЕНОМНИ ПРОМЕНИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ЕПИЛЕПСИЯ, ИНТЕЛЕКТУАЛЕН ДЕФИЦИТ И ВРОДЕНИ АНОМАЛИИ

ВАЛЕНТИНА ЛЮБЕНОВА ПЕЙЧЕВА

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“

ОБЛАСТ НА ВИСШЕ ОБРАЗОВАНИЕ: 4 „ПРИРОДНИ НАУКИ, МАТЕМАТИКА И ИНФОРМАТИКА”; ПРОФЕСИОНАЛНО НАПРАВЛЕНИЕ: 4.3. „БИОЛОГИЧЕСКИ НАУКИ”
ДОКТОРСКА ПРОГРАМА: „МОЛЕКУЛЯРНА БИОЛОГИЯ”

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:

АКАД. ВАНЬО ИВАНОВ МИТЕВ, ДМ, ДБН
ПРОФ. РАДКА ПЕТРОВА КЪНЕВА, ДБ

София, 2019г.

Дисертационният труд съдържа 212 страници, 83 фигури, 24 таблици.

Цитирани са 393 литературни източника и 19 интернет сайта.

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

Всички включени в дисертацията изследвания са извършени в Център по Молекулна Медицина, Катедра по Медицинска Химия и Биохимия, Медицински Университет – София.

Настоящото изследване е финансирано частично от проект Грант ДТК/67/2009, ФНИ, МОН, както и проекти № МУ359/2015 и № МУ444/2016, СМН, МУ- София. Изследванията, обект на настоящата дисертация, са одобрени от КЕНИМУС.

Дисертационният труд е представен на заседание на катедрен съвет на Катедра „Медицинска Химия и Биохимия", Медицински Университет - София, на 13.12.2018г. и насрочен за защита на 25.03.2019 г.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 25.03.2019г. в Катедра Медицинска Химия и Биохимия, Медицински Университет София, ул. Здраве 2, гр. София, пред научно жури в състав:

Председател:
акад. проф. Ваньо Митев, дм, дбн; становище
Членове:
доц. д-р Теодора Чамова, дм; рецензия
доц. д-р Венета Георгиева- Абаджиева, дм; рецензия
проф. Магдалена Чорбаджиева, дб; становище
акад. проф. Иван Иванов, дбн становище
Резервни членове:
проф. Алексей Славков Савов, дб
проф. д-р Людмила Бончева Ангелова, дб

Номерацията на фигурите и таблиците не отговаря на тази в дисертационния труд.

Материалите по защитата са на разположение в Центъра по Молекулна Медицина, сградата на СБАЛАГ "Майчин дом" на ул. Здраве №2, ет. 1

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА „МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ”
ЦЕНТЪР ПО МОЛЕКУЛНА МЕДИЦИНА

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ И ГЕНОМНИ ПРОМЕНИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ЕПИЛЕПСИЯ, ИНТЕЛЕКТУАЛЕН ДЕФИЦИТ И ВРОДЕНИ АНОМАЛИИ

ВАЛЕНТИНА ЛЮБЕНОВА ПЕЙЧЕВА

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“

ОБЛАСТ НА ВИСШЕ ОБРАЗОВАНИЕ: 4 „ПРИРОДНИ НАУКИ, МАТЕМАТИКА И ИНФОРМАТИКА”; ПРОФЕСИОНАЛНО НАПРАВЛЕНИЕ: 4.3. „БИОЛОГИЧЕСКИ НАУКИ”
ДОКТОРСКА ПРОГРАМА: „МОЛЕКУЛЯРНА БИОЛОГИЯ”

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:

АКАД. ВАНЬО ИВАНОВ МИТЕВ, ДМ, ДБН
ПРОФ. РАДКА ПЕТРОВА КЪНЕВА, ДБ

София, 2019г.

Използвани съкращения:

Използвани съкращения на кирилица:

АД	Автозомно Доминантен
АК	АминоКиселина
АР	Автозомно Рецесивен
бдв	базови двойки
ГГЕ	Генетична Генерализирана Епилепсия
ГТКП	Генерализирани Тонично – Клонични Пристъпи
ЕЕ	Епилептична Енцефалопатия
ИГЕ	Идиопатична Генерализирана Епилепсия
ИД	Интелектуален Дефицит
КТ	Компютърна Томография
НПР	Невро-Психическо Развитие
СГХ	Сравнителна Геномна Хибридизация
ЦНС	Централна Нервна Система
ЯМР	Ядрено-Магнитен Резонанс

Използвани съкращения на латиница:

aCGH	array Comparative Genomic Hybridization – микрочипова Сравнителна Геномна Хибридизация
ACMG	American College of Medical Genetics - Американски Колеж по Медицинска Генетика
ADHD	Attention Deficit and Hyperactivity Disorder – синдром на хиперактивност и дефицит на внимание
ADNFLE	Autosomal Dominant Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy; автозомно доминантна епилепсия на фронталния лоб
BECTS	Benign Epilepsy with Cetro- Temporal Spikes – Бенигнена детска епилепсия с центро темпорални пики
BP	BreakPoints – точки на счупване
BFNC	Benign Familial Neonatal Convulsions - Бенигнени Фамилни Неонатални Конвулсии
BFNIC	Benign Familial Neonatal-Infantile Convulsions - Бенигнени Фамилни Неонатално-Инфантилни Конвулсии
CAE	Childhood Absence Epilepsy - Детска Абсансна Епилепсия
CdLS	Cornelia de Lange Syndrome – Синдром на Cornelia de Lange
CNVs	Copy Number Variations – Промени в броя копия
ddNTP	DideoxyNucleotide TriPhosphates - Дидезоксинуклеотид трифосфати
DGV	Database of Genomic Variants
DS	Dravet Syndrome - Синдром на Dravet
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization – Флуоресцентна ин ситу Хибридизация
FS+	Febrile Seizures + - Фебрилни Гърчове плюс
GEFS+	Generalized Epilepsy wit Febrile Seizure + -Генерализирана Епилепсия с Фебрилни Гърчове плюс
GLUT1-DS	GLUT1 Deficiency Syndrome -Синдром на Дефицит на глюкозния транспортер GLUT1
IQ	Intelligence Quotient – Коефициент на Интелигентност
LCRs	Low Copy Repeats - нискокопийни повторени последователности
MAE	Myoclonic Astatic Epilepsy - Миоклонично Астатична Епилепсия
MLPA	Multiplex Ligation dependent Probe Amplification - Мултиплексен амплификационен анализ на лигирани проби
NEE	Neonatal Epileptic Encephalopathy - Неонатална Епилептична Енцефалопатия
qPCR	Количествена Полимеразна Верижна Реакция в реално време

Съдържание:

1. Въведение 4
2. Цел и задачи 6
2.1. Цел 6
2.2. Задачи 6
3. Материали и методи 7
3.1. Клиничен материал и биологични проби 7
3.1.1. Клиничен материал 7
3.1.2. Биологични проби 8
3.2. Преданалитична обработка на материала 8
3.2.1. Изолиране на ДНК чрез полуавтоматична система CHEMAGEN® Magnetic Separation Station (Perkin Elmer) 8
3.2.2. Проверка на качеството на изолираната ДНК 8
3.3. Аналитична обработка на биологичния материал 8
3.3.1. Намножаване на фрагменти ДНК чрез полимеразна верижна реакция (Polymerase Chain Reaction, PCR) и качествен контрол на PCR реакцията 8
3.3.2. Директно секвениране (Секвениране по Sanger) 9
3.3.3. Мултиплексен амплификационен анализ на лигирани проби (MLPA) 10
3.3.4. Микрочипов анализ чрез метода на сравнителна геномна хибридизация (array Comparative Genomic Hybridization, aCGH) 11
3.3.5. Потвърдителен и сегрегационен PCR в реално време (qPCR) на откритите чрез aCGH аберации 13
3.4. Биоинформатичен анализ на получените резултати 14
3.4.1. Биоинформатичен анализ на резултатите от директното секвениране 14
3.4.2. Биоинформатичен анализ на резултатите, получени от MLPA анализа 15
3.4.3. Биоинформатичен анализ на резултатите, получени от микрочиповия анализ 16
4. Резултати и обсъждане 18
4.1. Мутационен анализ на *SCN1A* гена 18
4.1.1. Клиничен материал 18
4.1.2 Секвениране по Сангер на *SCN1A* гена 19
4.1.2.1. Патогенни варианти в *SCN1A* гена 20
4.1.2.1.1. Патогенни варианти, докладвани в литературните източници и бази-данни 22
4.1.2.1.2. Патогенни варианти, несъобщени в литературните източници 24
4.1.2.2. Варианти с вероятно патогенен ефект в *SCN1A* гена 26
4.1.2.3. Варианти с вероятно непатогенен ефект, открити в *SCN1A* гена 31
4.1.3. MLPA анализ на *SCN1A* гена 33
4.2. Мутационен анализ на *SLC2A1* гена 33
4.2.1. Клиничен материал 34
4.2.2. Секвениране по Сангер на *SLC2A1* гена 34
4.2.3. MLPA анализ на *SLC2A1* гена 37
4.3. Мутационен анализ на *KCNQ2* гена 38
4.3.1. Клиничен материал 38
4.3.2. Секвениране по Сангер на *KCNQ2* гена 38
4.3.3. MLPA анализ на *KCNQ2* гена 42
4.4. Микрочипов анализ на пациентите със синдромни състояния 44
4.4.1. Клиничен материал 44
4.4.2. Микрочипова сравнителна геномна хибридизация (aCGH) 46
4.4.2.1. Патогенни хромозомни микроаберации 50
4.4.2.2. Аберации с неясно клинично значение и вероятно патогенен ефект 61

4.5. Изграждане на диагностичен алгоритъм при пациенти с различни форми на епилепсия, или неизяснена диагноза, включваща епилепсия в комбинация с интелектуален дефицит и други вродени аномалии..... 72
5. Обобщение..... 75
6. Изводи..... 78
7. Приноси..... 79
7.1. Приноси с научно - фундаментален характер..... 79
7.2. Приноси с научно - приложен характер..... 79
8. Публикации и научни прояви във връзка с дисертационния труд..... 80
8.1. Публикации във връзка с дисертационния труд..... 80
8.2. Научни прояви във връзка с дисертационния труд..... 81
9. Участия в проекти..... 83
10. Използвана литература..... 84

1. Въведение

Епилепсията е най-честото неврологично заболяване, засягащо приблизително 3% от световната популация. Заболяването представлява изключително значим здравен и социален проблем в световен мащаб, тъй като повлиява както здравето, така и качеството на живот в засегнатите индивиди и техните семейства. Епилепсията е най - честа сред децата със заболеваемост в световната популация около 70/100 000 деца на възраст под две години (Миланов и съавт., 2016). Честотата на детската епилепсия е най - висока през първата година от живота, като част от новородените имат ясно очертани епилептични синдроми, за които няма друга причина освен възможно генетично предразположение. При генетичните епилепсии епилептичните пристъпи са основен симптом на заболяването, пристъпите са най - често генерализирани като в по – голямата си част са фамилно – унаследяеми, но съществуват и спорадични случаи.

Такива електро-клинични синдроми са генерализираната епилепсия с фебрилни гърчове плюс (GEFS+ синдром) и нейната тежка форма синдром на Драве (DS), абсансните епилепсии с ранно начало (EOAE, CAE, JAE) и тежката епилептична енцефалопатия синдром на дефицит на глюкозния транспортер (GLUT1-DS), миоклонично – астатичната епилепсия (MAE), както и бенигнените фамилни неонатални конвулсии (BFNC). В основата на изява на всяко едно от тях разнообразни генетични фактори с един основен ген, мутации в който се откриват при значителен процент от пациентите. Например, генът *SCN1A* кодира субединица на потенциал- зависим натриев канал, отговорен за генерирането и предаването на нервния импулс в инхибиторните GABA-ергични интерневрони в мозъка. Мутации в *SCN1A* са генетичната причина за изява на епилепсия от GEFS+ спектъра при 10% от пациентите, а при неговата тежка форма, DS, de novo *SCN1A* мутации са генетичната причина за заболяването при 70 – 80% от болните (Marini et al., 2011; McTague et al., 2016). Генът *SLC2A1* кодира основния глюкозен транспорер през кръвно-мозъчната бариера при човека и бозайниците. Между 1 и 12% от случаите на детски абсансни епилепсии и GLUT1-DS се дължат на мутации в *SLC2A1* (Suls et al., 2009; Arsov et al., 2012). Генът *KCNQ2*, заедно с продукта на друг ген, *KCNQ3*, формира тетрамерен потенциал- зависим калиев канал, участващ в регулацията на възбудимостта на неврона чрез възстановяването на потенциала на покой на мембраната. Над 80% от децата с неонатални конвулсии, стартиращи през първите месеци от живота на новороденото, се дължат на различни видове мутации в *KCNQ2* гена (Singh et al., 1998; Zara et al., 2013).

Спектърът на мутации в гореспоменатите гени е изключително разнообразен – различни по тип точкови мутации, малки делеции и инсерции на части от гена или целия ген. В този смисъл е нужно прилагането на различни молекулярно–генетични методи с цел пълното покриване на спектъра от възможни патогенни мутации, които стоят в основата на тези електро-клинични синдроми.

Съществуват и по - комплексни синдромни състояния, при които епилепсията се явява в комбинация с други невропсихични проблеми като интелектуален дефицит (ИД), изоставане в невропсихическото развитие (НПР), аутистични стигми и вродени аномалии, засягащи различни органи и системи. В голямата си част тези синдроми се дължат на така наречените промени в броя копия (CNVs), които представляват загуба (делеция) или придобиване (дупликация) на фрагмент от хромозомата. Те могат да варират по размер и да засягат както отделни гени, така и множество гени с важно функционално значение за ембриоталното развитие на нервната система и в този смисъл се явяват причина за изява на болестни състояния като генетични генерализирани епилепсии (ГГЕ), епилептични енцефалопатии (ЕЕ), ИД, аутизъм и вродени аномалии. Много проучвания през последните години предполагат, че общи молекулни пътища стоят в основата на патогенезата на различни заболявания на нервната система, вземайки предвид високата коморбидност, наблюдавана при ИД и други когнитивно-поведенчески проблеми, в комбинация с епилепсия, аутизъм и шизофрения (Lo-Castro et al., 2014, Robertson et al., 2016). Явлението фенотипна плейотропия се наблюдава както при случаи на идентифицирани еднонуклеотидни замени в редица гени, така и при патогенни CNVs, засягащи големи хромозомни райони.

Всичко това разширява обхвата на генетичните причини, стоящи в основата на ГГЕ/ЕЕ и комплексните синдромни състояния, включващи епилепсия, което предполага един сложен генетичен фон с множество взаимодействия, специфични за всеки индивид, правещо задачата за точно идентифициране на генетичните основи на епилепсията и други невропсихиатрични заболявания изключително трудна. В настоящото проучване, чрез прилагането на широк спектър от молекулярно-генетични и геномни подходи успяхме да охарактеризираме генетично 10.1% от пациентите с разнообразна клинична симптоматика. Това в някои случаи има изключително важно значение за избора на правилната антиконвулсантна терапия и бъдеща профилактика. Във всички случаи поставянето на генетична диагноза позволява избягването на ненужни диагностични процедури, както и дава адекватна оценка за риска от унаследяване с оглед на бъдещи бременности.

2. Цел и задачи

2.1. Цел

Целта на настоящото проучване е да се открият генетичните причини за изява на различни електро-клинични синдроми при пациенти с идиопатична (генетична) епилепсия, както и при синдромни състояния, включващи епилептични пристъпи в комбинация с интелектуален дефицит с или без вродени аномалии, и да се определят оптималните молекулярно-генетични и геномни методи и системен ход на изследване.

2.2. Задачи

- Подбор на пациенти за генетична и геномна диагностика на идиопатична (генетична) епилепсия, интелектуален дефицит и други вродени аномалии.
- Събиране на биологичен материал от пациенти и родственици и обогатяване на ДНК банката в ЦММ.
- Секвенционен и MLPA анализ на ген *SCN1A*, при пациенти със съмнение за генерализирана епилепсия с фебрилни гърчове +, миоклонично–астатична епилепсия или синдром на Драве.
- Секвенционен и MLPA анализ на ген *SLC2A1*, при пациенти със съмнение за детска абсансна епилепсия или синдром на дефицит на глюкозния транспортер GLUT1.
- Секвенционен и MLPA анализ на ген *KCNQ2*, при пациенти със съмнение за бенигнени фамилни неонатални и неонатално-инфантилни конвулсии или неонатална епилептична енцефалопатия.
- Приложение на сравнителна геномна хибридизация за диагностика на пациенти със съмнение за синдромно състояние, включващо епилепсията в комбинация с интелектуален дефицит, невропсихични проблеми и вродени аномалии.
- Верифициране на получените резултати от сравнителната геномна хибридизация с метода на количествен PCR в реално време (qPCR).
- Изграждане на диагностичен системен ход като алгоритъм от различни подходи за адекватен молекулярно-генетичен анализ при различни форми на епилепсия в зависимост от първоначалната насочваща диагноза.

3. Материали и методи

3.1. Клиничен материал и биологични проби

3.1.1. Клиничен материал

В рамките настоящото проучване бяха изследвани общо 208 пациенти (90 момичета и 118 момчета) на възраст от 0 до 28 години. 98 пациенти са с данни за фамилна история за епилепсия, а 110 са спорадични случаи. Разпределението на пациентите според насочващите диагнози е:

- FS+/GEFS+ - 72 пациенти
- Dravet синдром (DS) – 10 пациенти
- Миоклонично - астатична епилепсия (MAE) – 10 пациента
- Детска абсансна епилепсия (CAE) – 7 пациенти
- Бенигнени фамилни неонатални конвулсии (BFNC) – 13 пациенти
- Неонатална епилептична енцефалопатия 10 (NEE 10) – 2 пациенти
- Синдром на GLUT1 дефицит – 14 пациента
- Неизяснена или генетична (идиопатична) генерализирана епилепсия (ГГЕ) – 41 пациенти
- Генерализирана епилепсия в комбинация с интелектуален дефицит, разстройства в поведението, дисморфизми, мозъчни аномалии и други синдромни черти – 39 пациенти, събрани в рамките на предишни години в ДНК банката на ЦММ.

Пациентите бяха насочени към Центъра по Молекулна Медицина (ЦММ) от водещи лекари - невролози от следните клинични звена:

- Клиника по Детска Неврология, Университетска Болница по неврология и Психиатрия „Св. Наум“, МУ-София.
- Клиника по неврология, Университетска болница „Александровска”, МУ-София.
- Детска неврологична клиника СБАЛДБ „Проф.Иван Митев”, МУ-София.
- Клиника по педиатрия и генетични болести, УМБАЛ „Свети Георги”, Пловдив.
- Педиатрична клиника, Болница „Токуда”, София, България.
- Болница по Педиатрия, Диагностично – консултативен център”Александровска”, МУ-София.

3.1.2. Биологични проби

Венозна кръв, взета чрез затворена вакутейнер система при спазване на стандартните процедури за стерилност. За изолирането на ДНК кръвта бе събрана във вакутейнери с EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) (10 мл). След изолирането, ДНК от пациентите и техните семейства бяха съхранени в елуиращ буфер при -80ºC в сектор БиоБанка на ЦММ, при стриктно спазване на изискванията за конфиденциалност.

3.2. Преданалитична обработка на материала

3.2.1. Изолиране на ДНК чрез полуавтоматична система CHEMAGEN® Magnetic Separation Station (Perkin Elmer)

Изолирането на ДНК от кръвни лимфоцити с Chemagen полуавтоматичната сепарираща система е базирано на използването на магнитни частици в присъствието на електромагнитно поле. Техниката за изолиране на ДНК се провежда в следните етапи:

- Получаване на клетъчно-ядрен лизат и разграждане на белтъците и РНК
- Свързване на ДНК с магнитните частици.
- Активиране на магнитното поле и миене на ДНК пробите.
- Елуиране на ДНК.

3.2.2. Проверка на качеството на изолираната ДНК

Качеството на получената високомолекулна ДНК беше определено посредством два подхода:

- 0.8% агарозна електрофореза
- спектрофотометрично определяне на количеството и качеството на ДНК с помощта на NanoDrop (Thermo Scientific)

3.3. Аналитична обработка на биологичния материал

3.3.1. Намножаване на фрагменти ДНК чрез полимеразна верижна реакция (PCR – Polymerase Chain Reaction) и качествен контрол на PCR реакцията

Беше извършено PCR намножаване на всички екзони и екзон- интронни граници чрез PCR на следните гени: *SCN1A*, *SLC2A2* или *KCNQ2*. Компонентите и условията за провеждане на PCR реакцията са представени на таблици 1 и 2.

Таблица 1. PCR реактиви, използвани за амплификация на екзоните от *SCN1A*, *KCNQ2* и *SLC2A1* гените

PCR на екзони 1 и 16 от *KCNQ2* гена и екзони 1 и 5-6 от *SLC2A1* гена		**PCR на всички останали екзони от *SCN1A, KCNQ2* и *SLC2A1***	
PCR buffer (10x)	1 µl	PCR buffer (10x)	1 µl
dNTPs (10 nM)	0.8 µl	dNTPs (10 nM)	0.8 µl
primer F (10 pmol)	0.5 µl	primer F (10 pmol)	0.5 µl
primer R (10 pmol)	0.5 µl	primer R (10 pmol)	0.5 µl
DMSO	0.5 µl	-	-
Prime Taq (5 U/µl)	0.05 µl	Prime Taq (5 U/µl)	0.05 µl
H_20	4.65 µl	H20	5.15 µl
ДНК матрица	2.0 µl	ДНК матрица	2.0 µl
Краен обем	**10 µl**	**Краен обем**	**10 µl**

Таблица 2. Условия за протичане на PCR реакцията

Етап	**Температура**	**Време**	**Брой цикли**
Начална денатурация	95 ^{0}C	10 мин	1
Денатурация	95 ^{0}C	30 сек	35
Хибридизаия	55- 66^{0}C*	50 сек	
Елонгация	72 ^{0}C	50 сек	
Крайна елонгация	72 ^{0}C	10 мин	1
Съхранение	10 ^{0}C	∞	-

***** Температурата на хибридизация се определя експериментално и е различна за използваните при анализите праймери.

Качественият контрол на получените ампликони беше осъществен чрез използването на положителна и отрицателна контрола в 2% хоризонтална агарозна електрофореза.

3.3.2. Директно секвениране (Секвениране по Sanger)

Секвенирането по Sanger е референтен метод за директен прочит на нуклеотидната последователност на ДНК. Методът се основава на свойството на дидезоксинуклеотидите (ddNTP) да прекъсват синтеза на ДНК на мястото на включването им. По този начин те маркират позицията на определена нуклеотидна база. При използването на ddNTP, комбинирано с PCR

амплификация, се образуват голям брой фрагменти, които се анализират чрез електрофоретично разделяне според дължината им. Всеки един от ddNTP е маркиран с различно флуоресцентно багрило, излъчващо светлина с различна дължина на вълната. Директното секвениране протича в следните етапи:

- Намножаване (амплификация) на търсения фрагмент чрез PCR
- Пречистване на PCR продукта чрез ExoSap
- Секвенционна реакция
- Пречистване чрез преутаяване на секвенционния продукт
- Електрофоретично разделяне и отчитане на секвенционните реакции

3.3.3. Мултиплексен амплификационен анализ на лигирани проби (MLPA)

При пациентите, при които не открихме точкови мутации, малки делеции/инсерции чрез метода на секвениране по Sanger, проведохме мултиплексен амплификационен анализ на лигирани проби (Multiplex Ligation Probe Amplification - MLPA) на *SCN1A*, *KCNQ2* и *SLC2A1* гените. Методиката на MLPA представлява полуколичествен метод за определяне на брой копия в до 60 ДНК последователности с един мултиплексно базиран PCR. Използва се за откриване на вътрегенни или цялостногенни промени в броя копия (Copy Number Variations - CNVs). MLPA анализът може да бъде разделен на пет основни етапа: ДНК денатурация и хибридизация, лигиране, PCR реакция, разделяне на PCR продуктите чрез капилярна електрофореза и фрагментен анализ на данните.

Според препоръките на производителя, за всеки MLPA експеримент е препоръчително да се използват най - малко три референтни контролни проби или на всеки седем проби една трябва да е референтна контрола. Референтните контроли трябва да са разпределени на случаен принцип сред останалите проби и трябва да отговарят на следните условия:

• Да не са мутантни и да са от изолирани от здрави индивиди - от същия биологичен материал, от който е изолирана и пробата (в случая ДНК от кръв).

• Да бъдат с качество и количество, максимално близко до изследваните проби.

Анализът за търсене на големи делеции, инсерции и пренареждания в *SCN1A*, *KCNQ2* и *SLC2A1* гените беше проведен с помощта на китове, разработени от фирмата MRC-Holland (Amsterdam, Holland): SALSA MLPA KIT P137-B1 SCN1A, SALSA MLPA probemix P166-C1 KCNQ2 и SALSA MLPA probemix P138-B2 SLC2A1, следвайки инструкциите на производителя.

3.3.4. Микрочипов анализ чрез метода на сравнителна геномна хибридизация (array Comparative Genomic Hybridization, aCGH)

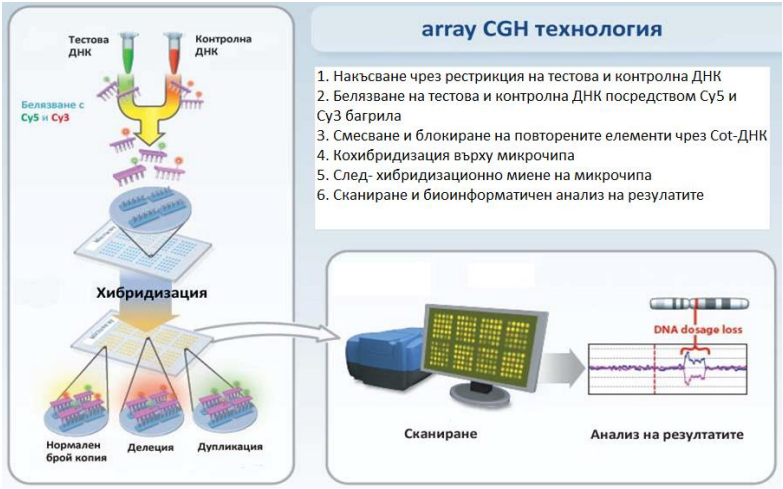
В рамките на настоящото проучване бе проведен микрочипов анализ чрез метода на сравнителната геномна хибридизация (array Comparative Genomic Hybridization- aCGH) на група пациенти със синдромни епилепсии, непоказали точкови мутации и/или инсерции/делеции, включващи цели екзони в известните, свързани с различни форми на епилепсията гени - *SCN1A*, *KCNQ2*, *SLC2A1*. При част от пациентите с изява на комплексен синдромен фенотип беше проведена директно aCGH без предварителен скрининг за наличие на точкови варианти в гореспоменатите гени. Целта ни беше да скринираме генома на всеки от селектираните пациенти за така наречените вариации в броя копия (Copy Number Variations- CNVs) - дупликации и делеции, засягащи хромозомни региони, съдържащи един или множество гени.

В настоящото проучване използвахме микрочипови платформи SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 4x180K и SurePrint G3 Unrestricted CGH ISCA v2, 4x180K (Agilent Technologies) с възможност за едновременнно изследване на 4 пациента и 4 контроли, и резолюция от 180Kb = 180,880 броя 60-мерни олигонуклеотидни проби, имобилизирани върху микрочипа.

Техниката на микрочиповия анализ включва следните етапи (фигура 1):

- **Предварително пречистване на ДНК** – цели се премахването на излишни белтъци и други компоненти, съдържащи се в буферите за изолиране.
- **Накъсване на тестова и контролна ДНК чрез рестрикция** - прави се с цел формиране на по - малки фрагменти, които впоследствие ще са с подходяща дължина за правилно провеждане на процеса на белязване. Накъсването се извършва чрез ензими - рестриктази AluI и RsaI, изолирани от бактерии и съдържащи се в кита за белязване.
- **Белязване на тестовата и контролна ДНК** - белязването на ДНК се осъществява на принципа на ник (nick) транслацията. Процесът се извършва чрез бактериална ДНК полимераза, наречена Exo - Klenow фрагмент и случайни праймери (random primers). По време на белязването тестовата и контролната ДНК се свързват с флуоресцентните багрила – цианини, излъчващи в различен спектър на дължината на вълната. Cy5 излъчва в червения спектър при λ= 650 nm, а Cy3 излъчва в зеления спектър при λ= 550 nm.
- **Пречистване след белязването** - чрез колонки с нитроцелулозен филтър, предоставени от фирмата производител.
- **Измерване на специфичната активност на белязване на пробите**

- **Подготовка на пробите за хибридизация** - прехибридизационен етап – прави се с цел инактивиране повторените последователности в генома, тъй като те биха дали допълнителен шум по време на сканирането и екстракцията на информация от микрочипа.
- **Хибридизация върху микрочипа** – извършва се в хибридизационна камера, снабдена с ротатор на строго определена температура (67^{o}C) за 24 часа.
- **Промивка на микрочиповете** – извършва се чрез използването на два промиващи буфера, осигурени от фирмата-производител.
- **Сканиране на микрочиповете** - За целите на настоящото проучване използвахме двуканален микрочипов скенер модел G2505C (Agilent Technologies), с λ=550—610 nm за зеления лазер и λ= 650—750 nm за червения лазер. Сканирането беше с резолюция от порядъка на 3 µm, поради високата гъстота на олигонуклеотидите, имобилизирани върху чипа (180,880 олигонуклеотида).



Фигура 1. Схематично представяне на принципа на aCGH технологията. Адаптирана от Theisen, 2008.

3.3.5. Потвърдителен и сегрегационен PCR в реално време (qPCR) на открите чрез aCGH аберации

Количественият PCR в реално време (qPCR) е лесен за изпълнение, евтин и точен метод, което го прави подходяща техника за потвърждаване на открити чрез aCGH микрохромозомни промени в сравнение с други използвани методи като FISH (Fluorescent in situ Hybridization) и MLPA. В съчетание с ниската цена и бързина на изпълнение, метода показва и висока чувствителност и специфичност, което го прави подходящ за рутинната клинична практика.

За целите на потвърдителния анализ използвахме SYBR Green технологията и Rotorgene апаратура. Получените резултати бяха анализирани чрез ΔΔCt метода на относително количествено определяне (Relative quantification – RQ стойност). Успоредно с тестовата ДНК от пациента бяха използвани три контролни ДНК от здрави индивиди с проверен нормален брой копия в тестовия и контролния фрагмент. Всяка тестова и контролна ДНК беше анализирана в три повторения на тестовия фрагмент и три повторения на контролния фрагмент.

Компонените за изготвяне на PCR микса за всяка реакция, както и условията за провеждане на qPCR анализа са представени в таблица 3.

Таблица 3. Използвани консумативи и условия за извършване на qPCR анализа

<table>
<tr><th colspan="2">Компоненти на реакционната смес</th><th colspan="4">Програма на рестрикционната реакция</th></tr>
<tr><td>2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix</td><td>10 µl</td><td>Етап</td><td>Температура</td><td>Време</td><td>Цикли</td></tr>
<tr><td>праймер F(10pmol)</td><td>0.5 µl</td><td>Начална денатурация</td><td>95 °C</td><td>10 мин</td><td>1</td></tr>
<tr><td>праймер R (10pmol)</td><td>0.5 µl</td><td>Денатурация</td><td>95 °C</td><td>15 сек</td><td rowspan="2">40</td></tr>
<tr><td>H_20</td><td>12 µl</td><td>Хибридизация и елонгиране</td><td>60 °C</td><td>1 мин</td></tr>
<tr><td>ДНК</td><td>2 µl</td><td colspan="4" rowspan="2">Забележка: QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix съдържа Hot Start полимераза, SYBR Green PCR буфер, микс от dNTPs, SYBR Green багрило, ROX багрило за нормализиране на флуоресцентния сигнал.</td></tr>
<tr><td>Краен обем</td><td>25 µl</td></tr>
</table>

Използван метод и дизайн на експеримента:

- **Избор на ампликони** - беше избран малък фрагмент като част от засегнатия район с дължина не по - голяма от 250 бдв (оптимално около 150 бдв), както и вътрешен контролен фрагмент на същата или на друга хромозома, за който е известно, че е с нормален брой копия.
- **Оптимизация на условията на амплификация за всяка двойка праймери** – бяха оптимизирани температура на хибридизация, количество от праймерите, количеството ДНК матрица, като наличието на специфичните таргетни ампликони беше проверено на 2% агарозна гел електрофореза.
- **Количествен PCR анализ в реално време** чрез използване на Rotorgene апаратура и софтуер (QIAGEN) и SYBR Green технологията за белязване на тестовите и контролни фрагменти.
- **Анализ на получените резултати** беше извършен чрез метода на относително количествено определеляне (RQ стойност) на амплифицирания чрез желаните праймери тестов фрагмент в сравнение със същия фрагмент в здрави контролни индивиди, налични в ДНК банката на ЦММ. Изчислението на RQ стойностите се извърши чрез следните формули:

$$\Delta Ct \text{ тестов фрагмент} = Ct \text{ (калибратор ДНК)} - Ct \text{ (тест ДНК)},$$
$$\Delta Ct \text{ контролен фрагмент} = Ct \text{ (калибратор)} - Ct \text{ (тест ДНК)},$$

където калибратор е контролна ДНК с нормален брой копия, а Ct- критичен праг на амплификация, през който започва да се отчита флуоресцентен сингнал.

3.4. Биоинформатичен анализ на получените резултати

3.4.1. Биоинформатичен анализ на резултатите от директното секвениране

При анализа на получените резултати бяха използвани следните софтуерни програми:

- **FinchTV** - лесен за използване инструмент за първична обработка и анализ на малък обем ДНК секвенции (www.geospiza.com). Съвместим е с повечето операционни системи.

- **SeqScape** – Софуеръът е разработен от Termofisher Scientific (https://www.thermofisher.com) и е подходящ за обработка на голям обем ДНК секвенции.

За да се определи ефекта, който намерените молекулни варианти биха имали върху структурата и функцията на съответните протеини бяха използвани предикционните програми:

- **PolyPhen-2** (http://genetics.bwh.harvard.edu/)
- **PROVEAN/SIFT** (http://provean.jcvi.org/)
- **Mutation taster** (www.mutationtaster.org/)

За определяне на ефекта върху сплайсинга на намерените варианти, засягащи сплайс-местата на екзоните на трите изследвани гена, бяха използвани предикционните алгоритми:

- **NetGene2** (http://www.cbs.dtu.dk)
- **Human Splicing Finder** (http://www.umd.be/HSF3/)

Изключването на честите полиморфизми и идентифицирането на вече съобщени мутации бе извършено чрез проверка на установените варианти в публичните бази-данни:

- **Ensembl** (http://www.ensembl.org)
- **1000Genomes** (http://www.internationalgenome.org/)
- Human Gene Mutation Database - **HGMD** (www.hgmd.cf.ac.uk)
- Exome Aggregation Consortium - **ExAc** (http://exac.broadinstitute.org/)
- **ClinVar** (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar)
- база - данни за *SCN1A* мутации на Лабораторията по Молекулярна генетика, Университет на Антверпен (http://www.molgen.vib-ua.be/SCN1AMutations/)

3.4.2. Биоинформатичен анализ на резултатите, получени от MLPA анализа

Получените профили на пациентите бяха нормализирани и сравнени с профилите на нормални, здрави индивиди чрез използване на два софтуера:

- **GeneMapper** (Thermofisher Scientific) – използва се за анализ на данни от фрагментен анализ, като микросателитни маркери, анализ за генотипиране, загуба на хетерозиготност и други.
- **CoffalyserNet** (MRC- Holland) - програма за MLPA анализ, съвместима с файлове, получени директно от капилярни електрофорезни системи. Разработен е от фирмата – производител на MLPA китовете.

3.4.3. Биоинформатичен анализ на резултатите, получени от микрочиповия анализ

- **Feature Extraction програма** (FE) (Agilent Technologies) - Той има за цел извличане (екстракция) на данните от скенера, или интензитетите на светене на багрилата и превръщането им в логаритмични съотношения така, че да са възможни в последствие анализа и интерпретацията на резултатите. Освен текстовия файл, необходим за анализиращия софтуер, FE програмата генерира и доклад за контрол на качеството (Quality Control - QC report), съдържащ статистическа информация за това как е протекъл микрочиповия експеримент.
- **Cytosure Interpet програма** (Oxford Gene Technologies) и **Cytogenomics програма** (Agilent Technologies) - Софтуерни продукти за анализ на извлечените от FE софтуера .txt данни, интерпретация и анотация на намерените aCGH аберации в генома. Анализът на данните се извършва чрез картиране по два референтни геномни секвенции (NCBI36/hg18 и GRCh37/hg19). Двата софтуера включват и анотации към публични бази - данни, съдържащи информация за известни синдроми, гени, директна причина или асоциирани със заболяване, някои от които са:

- **OMIM** - Online Mendelian Inheritance of Man: https://www.omim.org
- **GeneCards**: https://www.genecards.org
- **DECIPHER**: https://decipher.sanger.ac.uk/
- **ISCA** Consortium: http://dbsearch.clinicalgenome.org
- **ClinVar**: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar
- **Database of Genomic Variants**: http://dgv.tcag.ca

Като реални аберации бяха отчетени само тези, при които отклонението на интензитета на поне 4 съседни клона достига статистическа значимост (граница на статистическа значимост $p \leq 0.05$). Логаритмичното съотношение log2 между интензитетите на флуоресценция на Cy5 - белязаните проби и Cy3 - белязаните проби между +0,3 и -0.6 отразява нормален брой копия. Стойности <-0,6 показват загуба на генетичен материал в изследвания локус в сравнение с

контролата, или делеция. Стойности на log2 >0,3 показват умножаване на генетичния материал в изследвания локус в сравнение с контролната ДНК, или дупликация.

Използвана апаратура

- Автоматизирана система за изолиране и пречистване на ДНК и РНК - Модел: Chemagen, Magnetic Separation Module I (Perkin Elmer);
- ABI PRISM ® Автоматичен ДНК секвенатор- модел 3130xl;
- Апарати за PCR амплификация: градиентни PCR апарат- Модел: Bioer Gene Pro (Harlow scientific) и апарат Veriti Thermal Cycler (ABI);
- Вана за хоризонтална електрофореза (Science-Plus-UK);
- Микровълнова фурна за разтапяне на агарозата (Daewoo KOR 6C27);
- Токоизправител (Science-Plus-UK);
- Фотодокументационна система и UV-трансилюминатор с дължина на вълната 312 nm (MiniBisPro-Bio Imaging Systems);
- Спектрофотометри ND 1000 и 2000 (NanoDrop);
- Хладилна центрофуга 5810R (Eppendorf)
- Сух стерилизатор MMM (Exocell);
- Стартови гребени за гелове за електрофореза с размер на зъбците 5x1мм;
- Едноканални пипети с обем: 0.5–10 µl, 2–20 µl, 20–200 µl и 100-1000µl (Eppendorf);
- Микрочипов скенер G2565CA (Agilent Technology)
- Хибридизационна камера с въртящ ротор (Agilent Technology)
- Магнитна бъркалка (x1 or x3) (Thermo Scientific)
- Магнитна бъркалка с възможност за нагряване
- Центрофуга MicroCL-21 (Thermo Fisher Scientific);
- Апарат за qPCR Rotorgene Q система, версия 2.0 (Qiagen)
- Ледогенератор модел B20A (Fiochetti)
- Вана за водна баня (Memmert)

4. Резултати и обсъждане

Част от резултатите от молекулярно–генетичните и геномни изследвания са представени в три публикации (Peycheva et al., 2016, Ivanova et al., 2018, Peycheva et al., 2018).

4.1. Мутационен анализ на *SCN1A* гена

В настоящото проучване, за изследване на *SCN1A* гена чрез директно секвениране по Сангер бяха включени общо 133 пациенти, от които: 72 пациенти с фокални фебрилни пристъпи с или без еволюция в генерализирана епилепсия с фебрилни гърчове + синдром (GEFS+ синдром), 10 пациенти със съмнение за синдром на Dravet (DS), 41 пациенти с неизяснена (идиопатична) генерализирана епилепсия и 10 пациенти с характеристики на миоклонично - астатична епилепсия (MAE). При 82 пациенти съществува фамилна история за епилепсия, а 51 пациенти представляват изолирани спорадични случаи. При пациентите със съмнение за DS, при които не открихме патогенен точков вариант (n= 5; 50%), както и при част от пациентите с ИГЕ/ГГЕ (n= 15) проведохме MLPA анализ за търсене на екзонни делеции или дупликации в *SCN1A* гена.

- Чрез PCR амплифицирахме и секвенирахме по метода на Сангер всички 26 екзона, както и всички екзон–интронни граници на *SCN1A* гена (OMIM: 182389, транскрипт: ENST00000375405).
- При част от пациентите с DS и част от случаите с ГГЕ проведохме MLPA анализ за търсене на екзонни делеции в *SCN1A* гена.

4.1.1. Клиничен материал

Водеща клинична находка в изследваната група пациенти е фебрилно - провокираната епилепсия, характерна за епилепсии от GEFS+ спектъра. Началото на пристъпите е между 6-месечна и 2-годишна възраст, като по - рядко се наблюдава начало в по - късен етап от развитието. При фамилните случаи болшинството от засегнати родственици съобщават за единични FS по време на боледуване от инфекциозно заболяване в детството. За разлика от тях, в повечето случаи индексните пациенти получават разнообразни като характеристика пристъпи - афебрилни ГТКП, атонични, миоклонични и абсансни. При пациентите със съмнение за DS се наблюдава по - ранно начало на пристъпите (между 2- и 12-месечна възраст), като в повечето случаи не съществува фамилна история на заболяването. При тази група след началото на

пристъпите се наблюдава постепен регрес в невропсихичното, говорното и двигателното развитие, който се проявява след 2-годишна възраст.

При пациентите в подгрупа ГГЕ се наблюдават разнообразни типове пристъпи, с неясни провокационни фактори, което затруднява лекуващия лекар да постави насочваща диагноза. При пациентите от подгрупа МАЕ (или синдром на Doose) се наблюдава начало на пристъпите на 6-месечна до 2-годишна възраст. Характерни пристъпи са комбинация от миоклонични, атонични и атипични абсанси.

4.1.2 Секвениране по Сангер на *SCN1A* гена

Чрез директно секвениране по Сангер на ген *SCN1A* открихме 18 варианта в 22 пациенти или 15,5% от изследваната група (Таблици 4 и 5). Молекулни варианти от потенциален интерес бяха намерени при 12 пациенти от общо- изследваната група пациенти (9%). От тях с клинично значение, позволяващи да се постави генетична диагноза са осем варианта с патогенен ефект при 9.8% от пациентите с епилепсия от GEFS+ спектъра (GEFS+ и DS пациенти n=82). Варианти с вероятно патогенен ефект бяха намерени при четири пациенти от групата с епилепсии от GEFS+ спектъра (4.9%). Допълнително, шест от вариантите с вероятно непатогенен ефект, открити при 10 пациенти от изследваната група (7,5%). От тях шест пациенти са с насочваща диагноза от GEFS+ спектъра, а трима са с неизяснена ГГЕ/ИГЕ (Таблица 21).

Три от откритите варианти прецизират генетичната диагноза от GEFS+ синдром на DS. Заедно с тях, общо беше поставена генетична диагноза DS на 69.2% от пациентите от подгрупа DS (n=13). Това има изключително важно значение за избора на правилната антиконвулсантна терапия. При пациентите от подгрупи ИГЕ/ГГЕ и МАЕ чрез директно секвениране не установихме клинично-значими варианти в *SCN1A* гена.

Десет от откритите варианти представляват несинонимни замени (missense), два варианта водят до преждевременно формиране на стоп - кодон и прекъсване рамката на четене (nonsense), четири варианти засягат канонични сплайс-места (splice-site) и два варианта са съответно едно- и олигонуклеотидни делеции, водещи до изместване рамката на четене (frameshift deletions). Четири от вариантите са възникнали *de novo*, един вариант е унаследен от болен родител, два варианта се срещат при здрави родственици, а при осем пациенти не разполагахме с материал от родителите за извършване на сегрегационен анализ (Таблици 4 и 5).

Таблица 4. Намерени патогенни варианти чрез директно секвениране на ген *SCN1A*

Патогенни варианти, докладвани в литературните източници и бази данни						
Проб анд	**Фено тип**	**Тип вариант**	**HGVS номенклату ра**	**HGVS протеинова номенклатура**	**екзон/интро н**	**унаследяване**
548	DS	missence	c.4135G>A	p.Val1379Met	21	de novo
378	GEFS+	nonsense	c.4532C>A	p.Ser1505Ter	24	N/A
450	DS	splice- site	c.3879-1G>T	-	IVS 19	не се намира в майка; баща не е изследван
449	DS	missence	c.4787G>T	p.Arg1596Leu	25	de novo
446	GEFS+	missence	c.2804G>C	p.Arg935Pro	15	унаследена от болна майка; намерена при болна сестра
Нови варианти, с очакван патогенен ефект, недокладвани в литературните източници и бази данни						
393	GEFS+	nonsence	c.4744G>T	p.Glu1576Ter	25	N/A
398	GEFS+	frameshift	c.2136delC	p.Ser707AlafsTer3	12	N/A
540	DS	frameshift	c.3837_3843 delAATTGTT	p.Iso1280MetfsTer7	19	de novo

N/A- не е проведен сегрегационен анализ, поради липса на материал от родителите
Червено отбелязаните диагнози от GEFS+ след извършването на секвенционния анализ биват прецизирани на DS.

4.1.2.1. Патогенни варианти в *SCN1A* гена

От откритите общо осем патогенни варианти в *SCN1A* гена три са несинонимни АК замени, две мутации водят до образуване на стоп-кодон, две са делеции с изместване на рамката на четене и един вариант засяга канонично сплайс - акцпеторно място. Пет от вариантите са докладвани в литературните източници и бази - данни, а три са нови, неописани досега в литературата. Потенциалната патогенност на вариантите с промяна на смисъла и вероятния им ефект върху функциите на белтъка бяха проверени с помощта на предикционни програми PROVEAN/SIFT, Polyphen2 и Mutation Taster (Таблица 6).

Таблица 5. Намерени варианти с вероятно патогенен и вероятно непатогенен ефект чрез директно секвениране на ген *SCN1A*

Варианти с вероятно патогенен ефект						
Пробанд	**Фенотип**	**Тип вариант**	**HGVS кДНК номенклатура**	**HGVS протеинова номенклатура**	**екзон/интрон**	**унаследяване**
499	DS	Splice- site	c.4252-4A>G	-	IVS 21	N/A
522	GEFS+	missence	c.4980G>T	p.Met1654Ile	26	N/A
527	DS	missence	c.3929T>C*	p.Leu1310Pro	20	de novo
573	GEFS+	Splice-site	c.2383-1G>A*	-	IVS 13	de novo
Варианти с вероятно непатогенен ефект						
477	FS+	Splice- site	c.603-91G>A**	-	IVS 4	брат хомозиготен носител; майка и баща- хетерозиготи
516	GEFS+	missence	c.806G>C	p.Arg27Thr	1	N/A
550	ИГЕ					N/A
553	GEFS+					N/A
420	FS+	missence	c.1625G>A	p.Arg542Gln	10	Унаследен от болен баща
512	ИГЕ					липсва при засегнати родственици
482	GEFS+	missence	c.3488C>G	p. Thr1174Ser	17	N/A
544	GEFS+					липсва при засегнати майка и сестра
555	ИГЕ	missence	c.1811G>A	p.Arg604His	11	унаследена от здрав баща; липсва при засегната сестра и здрава майка
513	GEFS+	missence	c.5749C>G	p.Arg1928Gly	26	липсва при клинично здрава майка

*нова, непубликувана в литературните данни мутация; N/A- не е проведен сегрегационен анализ, поради липса на материал от родителите. ** нуклеотидната замяна представлява рисков фактор за развитието на FS+ и има отношение към отговора от лечението с някои антиепилептични медикаменти.

Таблица 6. Оценка на патогенността на установените „missense" варианти с патогенен и вероятно патогенен ефект в *SCN1A* гена с помощта на предиктивни програми Polyphen2, Provean и Mutation Taster.

Вариант	**Оценка на патогенността**		
	Polyphen	**Provean**	**Mutation Taster**
c.4135G>A; p.Val1379Met	possibly damaging	deleterious	disease causing
c.4787G>T; p.Arg1596Leu	probably damaging	deleterious	disease causing
c.2804G>C; p.Arg935Pro	probably damaging	deleterious	disease causing
c.4980G>T; p.Met1654Ile	probably damaging	deleterious	disease causing
c.3929T>C; p.Leu1310Pro	probably damaging	deleterious	disease causing

4.1.2.1.1. Патогенни варианти, докладвани в литературните източници и бази-данни

- **Вариант c.4135G>A p.Val1379Met, rs121918986 при пациент EP548**

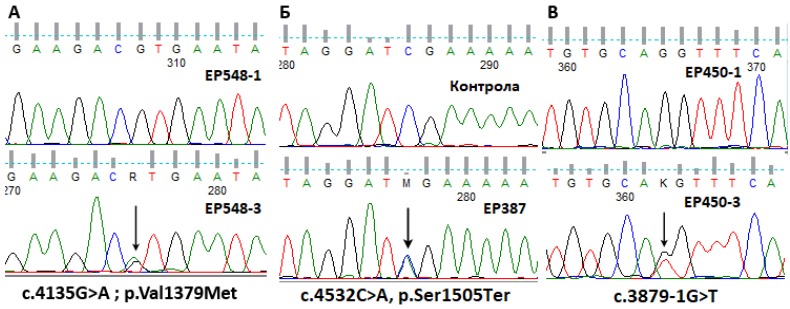
Вариантът rs121918986 засяга екзон 21 от *SCN1A* гена е причинен от транзиция на гуанин в аденин в позиция 4153 от кодиращата последователност (GTG→ATG), което води до синтез на АК метионин вместо валин в кодон 1379 (p.Val1379Met) (Фигура 2А). Вариантът беше намерен в хетерозиготно състояние при пациент EP548, момиче на две години със суспектна диагноза DS. Вариантът не беше открит у родителите при проведения сегрегационен анализ.

- **Вариант c.4532C>A, p.Ser1505Ter, rs139300715 при пациент EP378**

Вариантът rs139300715 е локализиран в екзон 24 от *SCN1A* гена и представлява трансверсия на цитозин в аденин в позиция 4532 от кодиращата последователност, което прекъсва рамката на четене и води поява на стоп кодон (TCG→TAG) и преждевременно прекъсване на синтезата на белтък в АК място 1505 (Фигура 2Б). Вариантът беше намерен в хетерозиготно състояние при пациент EP378, момче на три години със суспектна диагноза GEFS+ синдром- с изява на фокални FS+, които постепенно еволюират в ГТКП.

- **Вариант c.3879-1G>T, CS096242 при пациент EP450**

Вариантът c.3879-1G>T засяга гуанин в консервативното сплайс - акцепторно място AG на интрон 19 (Фигура 2В). Намерен е в хетерозиготно състояние при пациент EP450, момиче на четири години с диагноза DS и начало на изява на непровокирани миоклонични пристъпи и ГТКП на 1-годишна възраст. При детето се наблюдават и други клинични характеристики – дифузно намален мускулен тонус, ниско разположени ушни миди и хипертелоризъм. С оглед на допълнителната симптоматика, наподобяваща синдромно състояние, ние проведохме и микрочипов анализ, чрез който не открихме значими структурни хромозомни изменения.



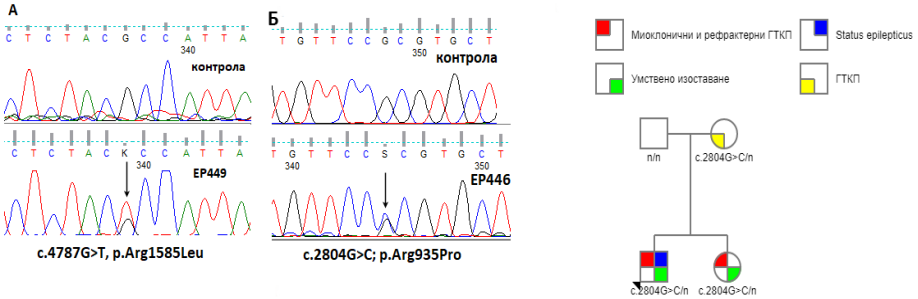
Фигура 2. Секвенционни профили на пациенти с открити патогенни варианти: **А.** EP548-3, носещ missense вариант p.Val1379Met; **Б.** EP387-3, носещ патогенен nonsense вариант p.Ser1505Ter; **В.** EP450-3, носещ сплайс-място вариант c.3879-1G>T.

- **Вариант c.4787G>T, p.Arg1596Leu, CM096160 при пациент EP449**

Вариантът CM096160 е резултат от трансверсия на гуанин в тимин в позиция 4787 (CGC→CTC) от кодиращата част на *SCN1A* гена, което води до замяна на еволюционно-консервативната аминокиселина аргинин с левцин в кодон 1596 (Фигура 3А). Мутацията е de novo възникнала и беше открита в хетерозиготно състояние при момиче на четири години (EP449) с диагноза DS и без фамилна обремененост. Наблюдаваните пристъпите са рефрактерни, с фокално начало на 3-месечна възраст и вторична генерализация.

- **Вариант c.2804G>C, p.Arg935Pro при пациент EP446**

Молекулният вариант е от типа промяна на смисъла и е локализиран в екзон 15 от *SCN1A* гена. Дължи се на трансверсия на гуанин в цитозин в позиция 2804 (CGC→CCC) от кодиращата част на гена, в резултат на което се синтезира АК пролин вместо аргинин в кодон 935 (p.Arg935Pro). Вариантът е намерен при пациент EP446, момче на четири години с диагноза GEFS+. Сегрегационният анализ показа, че мутацията е унаследена от болната майка с история за пристъпи в детството и присъства при засегнатата сестра, също с миоклонични пристъпи, в последствие с вторична генерализация и умерен ИД (Фигура 3Б). Вариантът не се откри при клинично - здравия баща.



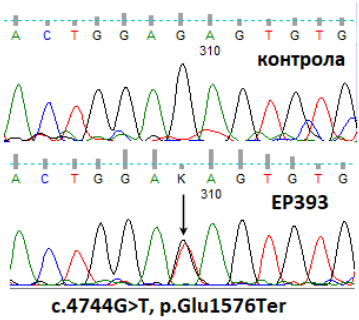
Фигура 3. Секвенционни профили на пациенти с открити патогенни варианти: А. EP449, носещ патогенен missense вариант p.Arg1585Leu; Б. EP446, носещ патогенен missense вариант, който сегрегира с фенотипа в семейството – унаследен е от болна майка и присъства при засегната сестра.

4.1.2.1.2. Патогенни варианти, несъобщени в литературните източници

В настоящото проучване чрез директно секвениране на *SCN1A* гена открихме общо три нови варианти, недокладвани в литературните източници и бази-данни, но с очакван патогенен ефект върху функциите на белтъка (Таблица 4). Два варианта представляват делеции с изместване на рамката на четене (frameshift: c.2136delC, c.3837_3843delAATTGTT), а един вариант води до поява на стоп-кодон и последващо прекъсване на рамката начетене (nonsense: p.Glu1576Ter).

- **Вариант c.4744G>T, p.Glu1576Ter при пациент EP393**

Вариантът c.4744G>T засяга екзон 25 от *SCN1A* гена и представлява трансверсия на гуанин в тимин в позиция 4744 от кодиращата последователност, което променя кодон 1576 за АК глутамин в стоп-кодон (GAG→TAG) и води до прекъсване на синтезата на интактен белтък (Фигура 4). Мутацията беше намерена при пациент EP393, момче на четири години и диагноза GEFS+ синдром и без отговор към настоящото лечение.



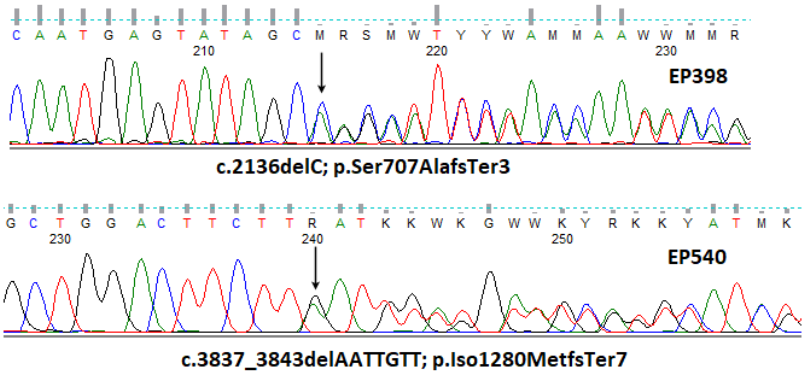
Фигура 4. Електрофореграми на индексния пациент EP393, носещ непубликуван nonsense вариант p.Glu1576Ter в *SCN1A* гена и здрава контрола.

- **Вариант 2136delC, p.Ser707AlafsTer3 при пациент EP398**

Установената мутация се намира в екзон 12 от *SCN1A* гена и се дължи на делеция на цитозин в позиция 2136 (GCC/G-), кодон 707 (p.Ser707Alafs). Това води до изместване на рамката на четене, поява на стоп - кодон три нуклеотида в посока 3‘ - в място 710 и синтеза на скъсен белтъчен продукт (Фигура 5). Мутацията установихме при пациент EP398, момиче на девет години и рефрактерни ГТКП без фебрилна провокация, с проява на хиперактивно поведение и фамилна обремененост. Не разполагахме с материал от родителите за провеждане на сегрегационен анализ.

- **Вариант c.3837_3843delAATTGTT, p.Iso1280MetfsTer7 при пациент EP540**

Вторият вариант с изместване на рамката на четене се намира в екзон 19 и представлява делеция на 7 нуклеотида от позиция 3837 до позиция 3843 от *SCN1A* гена (AATTGTT/-), като вместо изолевцин се синтезира метионин в кодон 1280 (p.Iso1280Metfs) (Фигура 5). Вследствие на това, седем нуклеотида в посока 3‘-, в място 1287 се появава стоп - кодон и се синтезира скъсен белтъчен продукт без домени DIII, DIV, разположената между тях инактивационна бримка, както и С-терминалния домен. Вариантът беше открит при пациент EP540, момиче на една година с диагноза DS. Вариантът не беше открит у родителите.



Фигура 5. Електрофореграми на пациенти EP398 и EP540, с намерени нови frameshift делеции p.Ser707AlafsTer3 и p.Iso1280MetfsTer7 съответно.

4.1.2.2. Варианти с вероятно патогенен ефект в *SCN1A* гена

Чрез директно секвениране на *SCN1A* гена открихме четири варианта с вероятно патогенен ефект. Два от вариантите представляват мутации от типа промяна на смисъла (p.Met1654Ile, p.Leu1310Pro), а два засягат сплайс – акцепторните места в различни райони от зреещата иРНК (c.4252-4A>G, c.2383-1G>A) (Таблица 5). Един missense вариант (p.Leu1310Pro) и един сплайс – акцепторен вариант (c.2383-1G>A) са нови, неописани досега в обществено достъпните бази - данни и литературни източници.

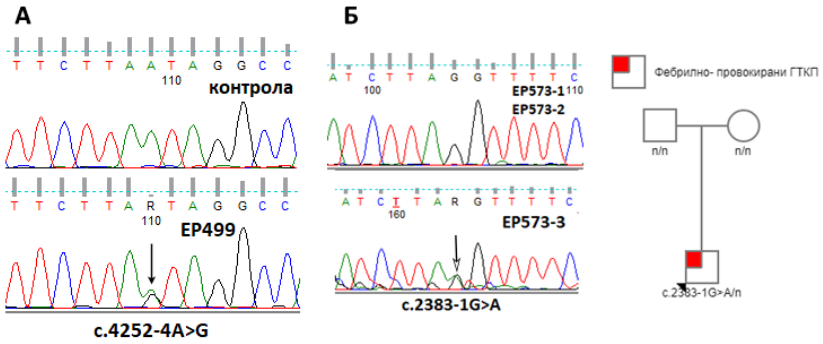
- **Вариант c.4252-4A>G, rs796053007 при пациент EP499**

Вариантът c.4252-4A>G е от тип сплайс-място мутация и представлява транзиция на консервативен нуклеотид аденин в гуанин в сплайс - акцепторното място на интрон 21 (Фигура 6А). Вариантът беше открит при пациент EP499, момиче на шест години с диагноза GEFS+, без фамилна обремененост и без отговор от настоящото лечение с антиконвулсанти.

- **Вариант c.2383-1G>A при пациент EP573**

Вариантът c.2383-1G>A е нов, неописан до този момент в литературата и засяга каноничното сплайс - акцепторно място AG на интрон 13 от *SCN1A* гена (Фигура 6Б). Той беше намерен при пациент EP573, момче на две години с диагноза GEFS+ синдром, без фамилна обремененост и без отговор към

настоящото лечение с антиконвулсанти. Вариантът не беше открит при клинично-здравите родители (Фигура 6).



Фигура 6. Секвенционни профили на пациенти с открити вероятно патогенни варианти: **А.** EP499, носещ сплайс-място вариант c.4252-4A>G; **Б.** EP573, носещ нов сплайс-акцепторен вариант c.2383-1G>A и който не се открива при родителите, или е възникнал de novo.

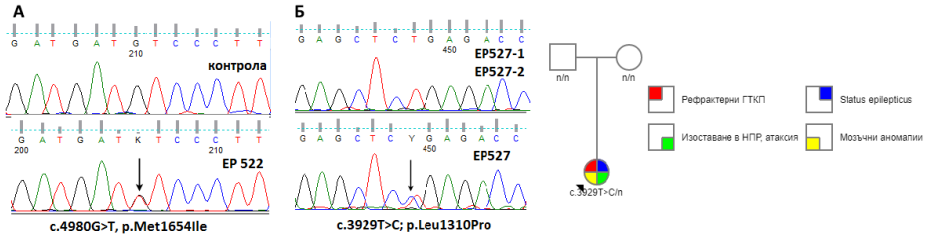
- **Вариант c.3929T>C, p.Leu1310Pro при пациент EP527**

Вариантът е резултат от транзиция на тимин в цитозин в 3929 позиция от кодиращата последователност (Фигура 7Б) и като резултат се синтезира пролин вместо левцин в кодон 1310 (CTG/CCG). Той е установен при пациент EP527, момче на две години с типична клинична изява на DS. Старта на фебрилно – провокираните рефрактерни ГТКП е на 9-месечна възраст, като скоро след това започва да се наблюдава забавяне в развитието, моторни проблеми и атаксия. Соматичният статус включва микрополиадения и дисморфичен фациес - изпъкнали фронтални тубери, високо чело, лява очна цепка по - голяма от дясната, глава с квадратна конфигурация, ниско разположени ушни миди. Проведеният сегрегационен анализ показа, че вариантът е възникнал de novo.

- **Вариант c.4980G>T, p.Met1654Ile, rs796053031 при пациент EP527**

Вариантът c.4980G>T е от типа промяна на смисъла и е резултат е от трансверсия на гуанин в тимин в позиция 4980 от кодиращата последователност (Фигура 7А) и като резултат се синтезира АК изолевцин вместо метионин в кодон 1654. Открит е при пациент EP527, момиче на три години с диагноза GEFS+ синдром с нестабилна походка, данни за фамилна обременост и добър

отговор към настоящото антиконвулсантно лечение. Не разполагахме с материал от родителите за провеждане на сегрегационен анализ. Вариантът rs796053031 не е описан досега в литературата, но е публикуван в базата да ClinVar, където е определен като вероятно патогенен. Предикционните програми също го оценяват като вероятно патогенен (Таблица 6).

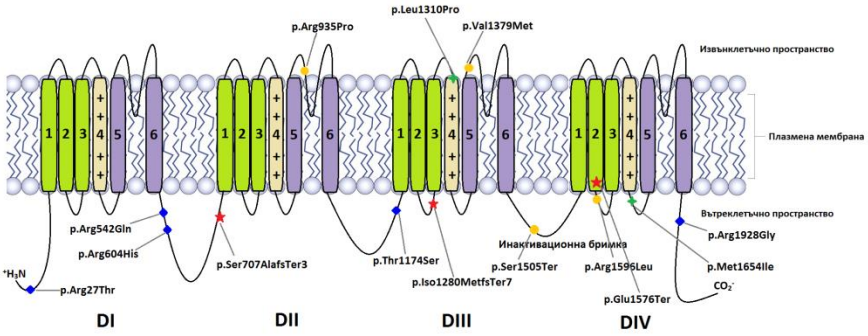


Фигура 7. Секвенционни профили на пациенти с открити вероятно патогенни варианти: **А.** EP522, носещ нов missense вариант p.Met1654Ile; **Б.** EP527, носещ missense вариант p.Leu1310Pro и който не се открива при родителите, или е възникнал de novo.

Патогенните варианти включват пет известни мутации и три нови, непубликувани досега в литературата, намерени при пациенти с епилепсия от GEFS+ спектъра. Според типа си, патогенните варианти представляват три известни missense мутации, засягащи извънклетъчните линкери между сегменти S5 и S6 на домен DIII (p.Val1379Met) и DII (p.Arg935Pro) и вътреклетъчния свързващ участък между сегменти S2 и S3 на домен DII (p.Arg1596Leu) (Фигура 8, жълто отбелязани мутации). Две мутации са с прекъсване на рамката на четене (nonsense), като едната е известна (pSer1505Ter), а другата е нова, недокладвана досега в литературата (p.Glu1576Ter) (Фигура 8). Две мутации водят до изместване на рамката на четене (frameshift), като и двете са нови, неописани в литературните източници (p.Ser707AlafsTer3, p.Iso1280MetfsTer7) и са разположени в интрацелуларни свързващи участъци от структурата на Nav1.1 белтъка (Фигура 8, червено отбелязани мутации). Една мутация представлява патогенен известен вариант, засягащ сплайс - акцепторното място на интрон 19 и е намерена при пациент с диагноза DS (c.3879-1G>T). Патогенните варианти бяха открити при четири пациенти със суспектна диагноза DS и четири пациенти с по - леките форми на епилепсия от GEFS+ спектъра.

Вероятно патогенните варианти са четири, като два от тях са новооткрити в настоящото проучване. Единият от тях е missense вариант, разположен в непосредствена близост до частта от протеина, навлизащ в клетъчната мембрана и изграждаща волтажния сензор S4 на домен DIII

(p.Leu1310Pro) и бе открит при пациент с DS. Другият нов вариант засяга сплайс –акцепторното място на екзон 14, и бе намерен при пациент с GEFS+ синдром (c.2383-1G>A) (Фигура 53). Два известни варианта с вероятно патогенен ефект са един missense вариант (p.Met1654Ile), разположен в линкерния регион на S4-S5 от домен DIV и намерен при пациент с GEFS+ синдром, и сплайс–акцепторен вариант (c.4254-4A>G), открит при пациент с диагноза DS.



Фигура 8. Схематична структура на Nav1.1. протеина, изграден от 4 хомоложни домена (DI- DIV), всеки от които с шест трансмембранни сегмента (S1–S6). Сегменти S5 и S6 (лилаво) изграждат пората на канала, а сегмент S4 (жълто) представлява волтажния сензор, изграден от положително заредени АК. Сегменти от S1, S2 и S3 (зелено) имат структурна роля. Вътреклетъчната бримка между S6 от DIII и S1 от DIV изгражда инактивационния изход (гейт), необходим за бързата инактивация на канала. Схематично са показани позициите на намерените варианти (без сплайс - вариантите): в жълто - четири известни патогенни варианти, в червено – три нови, недокладвани патогенни варианти; в зелено – два варианта с вероятно патогенен ефект; в синьо – пет варианта с вероятно непатогеген ефект.

В настоящото проучване при всички пациенти с прекъсващи рамката на четене мутации (EP378, EP393, EP398, EP540) се наблюдава липса на адекватен отговор към антиконвулсантната терапия и изява на допълнителни психомоторни нарушения. Тези наблюдения относно патогенността на прекъсващите рамката на четене мутации (nonsense, frameshift делеции, някои splice - мутации) потвърждават наблюденията на други автори, че пълната липса на копие от *SCN1A* гена и загубата на функция от Nav1.1. протеина, съответно недостатъчната доза от него, са достатъчно условие за появата на по - тежък епилептичен фенотип (Claes et al., 2009, Zuberi et al., 2011, Meng et al., 2015). При такива пациенти се наблюдава по – ранно начало на пристъпите и по - тежка изява на клиниката (Zuberi et al., 2011). Не така стои въпросът с missense мутациите, където абератното копие от белтъка се запазва и би могло да функционира, макар и неправилно. В тези случаи се наблюдават по - леките

форми на епилепсия от GEFS+ спектъра (Sugawara et al., 2002, Claes et al., 2009). Но в тежестта на изява на заболяването от голямо значение са не само типа мутация, а и позицията й на ниво белтък, както и природата на заменената АК. Патогенни промени в полярността на АК се наблюдават във волтажния сензорен сегмент S4 от Nav1.1. протеина (Kanai et al., 2009, Zuberi et al., 2011). В нашето проучване една АК замяна е разположена в началото на алфа – спиралния участък, изграждащ S4 сензорния сегмент от DIII – p.Leu1310Pro (Фигура 8). Дивият тип и мутантната АК са с еднакъв заряд, но се различават значително в структурно отношение и в този смисъл замяната на левцина с пролин води до загуба на една водородна връзка, което би нарушило структурата на алфа - спиралния участък в клетъчната мембрана (Фигура 58). Като резултат се наблюдава тежък фенотип при пациент EP527, включващ рефрактерни ГТКП и моторни нарушения. Допълнително, в настоящото проучване, в резултат от две missense мутации (p.Arg1596Leu и p.Arg935Pro) се променя полярността на заменената АК в два свързващи участъка от Nav1.1. протеина – S2-S3 от DIV и S5-S6 от DII съответно (Фигура 8). Мутацията p.Arg1596Leu е с *de novo* възникване (Резултати, Фигура 18Б), а p.Arg935Pro сегрегира с болестния фенотип в семейството (Резултати, Фигура 19Б). И при двамата пациенти EP449 и EP446 съответно се наблюдава изява на рефрактерни пристъпи, като при EP446 те еволюират в постепен регрес в НПР и впоследствие – тежък ИД. Това би могло да се дължи на нарушени функции на канала в резултат от различната физико-химична природа на аберантните АК.

Освен това, при всички случаи на DS, с изключение на пациент EP450, където не разполагахме с материал от бащата за провеждане на сегрегационен анализ, откритата мутация е възникнала *de novo*. Това потвърждава наблюденията, че тежките форми на GEFS+ синдрома се дължат на *de novo SCN1A* възникнали мутации (Marini et al., 2011, Meng et al., 2015).

Наблюдаваната честота на откриваемост на патогенни точкови варианти от 9,8% е съизмерима с процента на *SCN1A* точкови мутации по литературни данни (10%), открити при пациенти с епилепсия от GEFS+ спектъра (Marini et al., 2011; McTague et al., 2016). В частност, в резултат от нашето проучване открихме патогенен *SCN1A* точков вариант при шест пациенти с насочваща диагноза DS. Допълнително, при трима пациенти с неуточнена диагноза епилепсия от GEFS+ спектъра открихме две патогенни nonsense мутации (p.Ser1505Ter, p.Glu1576Ter) и една еднонуклеотидна делеция с изместване на рамката на четене и поява на стоп - кодон (p.Ser707AlafsTer3) – EP378, EP393, EP398. По този начин успяхме да прецизираме генетичната диагноза DS при тези пациенти и общия диагностичен добив при DS пациентите, намерен в настоящото проучване е 69.2%. Този

процент на откриваемост е съизмерим с диагностичния добив на патогенни точкови *SCN1A* мутации със загуба на функция при случаи на DS (~ 70-80%), съобщен в литературата (Marini et al., 2011).

4.1.2.3. Варианти с вероятно непатогенен ефект, открити в *SCN1A* гена

В резултат от настоящото проучване бяха открити общо шест варианти вероятно непатогенен ефект в 10 пациенти от изследваната група (7,5%). Три от тях са рекурентни, наблюдаващи се при повече от един пациент, а три варианта са открити при единични пациенти. Пет от вариантите представляват несинонимни замени с промяна на смисъла, а един засяга канонично място, участващо в зреенето на прематричната РНК (Таблица 5). Ефектът от всички missense варианти беше проверен чрез предикционни програми PROVEAN/SIFT, Polyphen2 и Mutation Taster, които дадоха противоречиви оценки за патогенността им (Таблица 7).

Таблица 7. Оценка на патогенността на установените „missense" варианти с вероятно непатогенен ефект в *SCN1A* гена с помощта на предиктивни програми Polyphen2, Provean и Mutation Taster.

Вариант	Оценка на патогенността		
	Polyphen2	**Provean**	**Mutation Taster**
c.806G>C, p.Arg27Thr	benign	deleterious	polymorphism
c.1625G>A, p.Arg542Gln	benign	deleterious	disease causing
c.3488C>G, p. Thr1174Ser	benign	neutral	polymorphism
c.1811G>A; p.Arg604His	benign	deleterious	disease causing
c.5749C>G; p.Arg1928Gly	benign	neutral	disease causing

При четири семейства с открити missense варианти не успяхме да проведем сегрегационен анализ, поради липса на материал от засегнатите родственици. При останалите семейства вариантите не сегрегират с болестния фенотип в семейството. Например, липсват при засегнати родственици (p.Arg542Gln, p.Thr1174Ser) или са унаследени от здрав родственик (p.Arg604His), а единствения сплайс-място вариант (c.603-91G>A) присъства при здрава майка и засегнат баща в хетерозиготно състояние, и в хомозиготно състояние при здрав брат (Таблица 4).

Вариантите бяха класифицирани по този начин, тъй като не покриват изцяло критериите за патогенност на ACMG за класифицирането им като вероятно патогенни (Richards et al., 2015), защото не сегрегират в семейството (Таблица 5), предикционните програми дават противоречиви оценки относно тяхната патогенност (Таблица 7) и се откриват с висока честота при здрави

индивиди в популационните бази–данни. За част от вариантите съществуват мащабни публикувани проучвания, които ги определят като по – скоро неутрални към белтъчната структура и функция.

В допълнение, никъде не е извършен функционален анализ за оценка на техния ефект върху функциите на белтъка, освен при вариант p.Thr1174Ser (Cestele et al., 2013). По отношение на p.Thr1174Ser, Lal и съавтори го класифицират като рисков фактор за развитие на епилепсия (Lal et al., 2016), но предикционните програми го определят като бенигнен полиморфизъм и в нашето проучване той е унаследен от здрав родственик в едно семейство. Освен това, нито един от дотук описаните варианти не е локализиран в трансмембранен район от протеина, където мутации са асоциирани със значително по - тежки дисфункции на канала, а всички те се откриват в ниско - консервативни райони от белтъка (Catterall et al., 2010).

Молекулният хетерозиготен вариант c.603-91G>A представлява полиморфизъм, фигуриращ с висока честота в 1000G базата – данни. Беше открит при пациент EP477 с диагноза FS+ и фамилна обремененост - баща със изява на FS+ и текущо антиконвулсантно лечение. Вариантът не сегрегира с болестния фенотип в семейството: присъства при клинично – здравата майка и в хомозиготно състояние при здравия брат.

Той е разположен във високо консервативно сплайс - донорно място, необходимо за алтернативния сплайсинг на *SCN1A* транскрипта, експресиран предимно във фетуса (Фигура 61, екзон 5N) (Tate et al., 2005). Мутантният алел A нарушава консенсусното място, необходимо за сплайсинга на феталния екзон 5N (Фигура 61), редуцирайки по този начин неговата експресия в сравнение с експресията на екзон 5A, характерен за възрастни индивиди. Установено е, че при индивиди, носещи GG генотип, неонаталната форма на транскрипта се среща в до 50% от общото количество транскрипти в клетката, докато при индивиди с генотип AA нивата на 5N са почти неоткриваеми (Heizen et al., 2007). От функционална гледна точка, екзоните 5N и 5A показват различни фармакологични свойства и при пациенти с епилепсия, носещи вариант c.603-91G>A е необходима по – висока доза от антиконвулсантите фенитоин и карбамазепин (Tate et al., 2005; Tate et al., 2006). Първоначално вариантът е асоцииран с повишен риск от развитие на FS+ по кодоминатнен модел, като носителството на един A алел води до по - нисък риск от развитието на FS+, в сравнение наличието на 2 мутантни A алела (Schlachter et al., 2009). Други автори, изследвайки австралийска кохорта пациенти и контроли, не потвърждават наблюденията на Schlachter и съавтори, намирайки варианта в значителен брой здрави контролни индивиди без епилепсия (Petrovski et al.,

2009). Базирайки се на тези противоречиви данни, както и вземайки предвид, че вариантът с.603-91G>A се среща в хомозиготно състояние при здравия брат и хетерозиготно при клинично - здравата майка, ние го класифицирахме като такъв с по - скоро непатогенен ефект. Все пак, от клинична гледна точка той има отношение към заболяването на семейство 477, с оглед на асоциацията му с лекарствения отговор към два вида антиконвусланти.

4.1.2.2. MLPA анализ на *SCN1A* гена

При пациентите със съмнение за DS, при които не открихме патогенен точков вариант (n= 5; 50%), както и при част от пациентите с ИГЕ/ГГЕ (n= 10) проведохме MLPA анализ за търсене на екзонни делеции или дупликации в *SCN1A* гена. Проведеният MLPA анализ не доведе до откриване на патогенни копийни варианти, засягащи *SCN1A* гена в изследваната група пациенти.

По литературни данни, между 2-27% от DS случаите се дължат на делеции и амплификации на *SCN1A* гена (Suls et al., 2010; Marini et al., 2011), като в случаите на по - големи засегнати райони от хромозомите, включващи допълнителни гени освен *SCN1A*, се наблюдават и допълнителни синдромни черти, като ИД, аутизъм и дисморфизми (Okumura et al., 2015). По – леките форми епилепсия от GEFS+ спектъра са резултат предимно от *SCN1A* точкови missense мутации, където абератното копие се запазва, макар и с променена функция (Kanai et al., 2009, Zuberi et al., 2011). В нашето проучване ние включихме само пет пациента със съмнение за DS, а останалите пациенти бяха с по – леки форми на ГГЕ или съмнение за GEFS+ синдром. Неоткриването на патогенни CNVs в нашето проучване отчасти се дължи на малката извадка, която тествахме (n=15), в частност броя пациенти с DS (n= 5), а от друга страна включването на случаи с ИГЕ/ГГЕ (n=10), където процента на откриваемост на *SCN1A* CNVs е много нисък.

4.2. Мутационен анализ на *SLC2A1* гена

- В рамките на настоящото проучване беше проведен секвенционен анализ на всичките 10 екзона, както и екзон - интронните граници от *SLC2A1* гена (OMIM: 138140, транскрипт: ENST00000426263.8).
- При пациентите с неоткрити точкови варианти чрез директното секвениране беше проведен MLPA анализ за търсене на едно- и няколко-екзонни промени в броя копия, засягащи част от *SLC2A1* гена или целия ген.

4.2.1. Клиничен материал

В настоящото проучване, за изследване на *SLC2A1* гена чрез директно секвениране по Сангер бяха включени 13 пациента със съмнение за GLUT1 дефицит, 10 пациента с ИГЕ/ГГЕ в комбинация с интелектуален дефицит или изоставане в НПР, 10 пациента с МАЕ и седем пациента с детска абсансна епилепсия (САЕ) (n=41). Подгрупа САЕ се характеризират с наличие на генерализирани абсанси със старт в детска възраст (около четири години) без данни за допълнителни невропсихиатрични проблеми. При подгрупа ИГЕ/ГГЕ, се включват пациенти с изява на различни типове непровокирани пристъпи, в това число и абсанси, както и изоставане в НПР и/или когнитивно-поведенчески проблеми без ясна етиология. При подгрупата със съмнение за GLUT1 дефицит се наблюдават най - характерните за синдрома черти, но не и пълния спектър от типична GLUT1-DS симптоматика – основно генерализирани абсанси, ГТКП, миоклонични пристъпи, микроцефалия, ИД, а понякога и моторни проблеми.

4.2.2. Секвениране по Сангер на *SLC2A1* гена

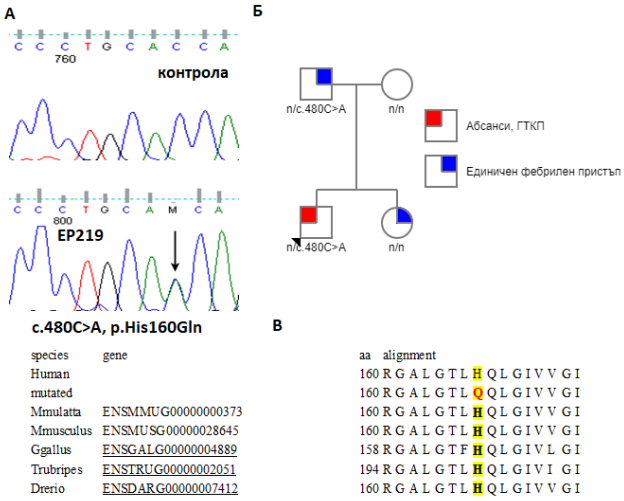
В резултат от анализа чрез директно секвениране по Sanger на *SLC2A1* гена установихме два нови, неописани досега точкови варианта при двама пациенти от изследваната кохорта (4.8%). Единият вариант представлява трансверсия от типа промяна на смисъла (missense, p.His160Gln) а другия води до прекъсване на рамката на четене (nonsense, p.Glu360Ter).

Вариант c.480C>A, p.His160Gln при пациент EP219

Мутацията c.480C>A засяга екзон 4 от *SLC2A1* гена и е резултат от трансверсия на цитозин в аденин в 480 позиция от кодиращата последователност (Фигура 9А), с което се синтезира АК глутамин вместо хистидин в кодон 160 (CAC→CAA). Вариантът е открит при пациент EP219, момче на 13 години с електро-клинични данни за CAE/JME. Съществуват данни за епилепсия в семейството - баща с един FS+ в детството и сестра с единичен FS+ през първата година от живота. Проведеният сегрегационен анализ показа, че p.His160Gln е унаследен от бащата, но не присъства в засегнатата сестра (Фигура 9Б). Вариантът засяга еволюционно-консервативна АК и е непубликуван до този момент в литературните източници бази-данни (Фигура 9В).

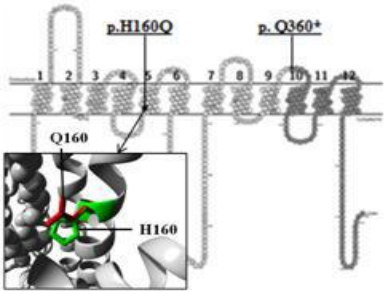
Вариантът p.His160Gln се намира в TM5 (пети трансмембранен домен), един от амфипатичните домени, участващи във формирането на пората, през която преминава глюкозата в клетката (Varlamis et al., 2013; Deng et al., 2014)

(Фигура 10). Засегнатата АК хистидин изглежда, че е от важно значение за функцията на канала, тъй като замяната й с цистеин води до умерена редукция на активността на транспортиране на глюкоза през GLUT1 канала (Varlamis et al., 2013). Пространствената структура на мутантния и нативния GLUT1 протеин показва, че засегнатата АК His160 е част от хидрофобната α – спирална част на канала, като заменената АК глутамин е леко изместена в сравнение с дивият тип His160 АК остатък (Фигура 10).



Фигура 9. Молекулен вариант c.480C>A, p.His160Gln в екзон 4 на ген *SLC2A1*: **А.** Секвенционен профил при индексния пациент, сравнен със здрава контрола. **Б.** Родословно дърво на семейство 219, с означен носителски статус при изследваните членове. Със стрелка е показан индексния пациент EP219 в семейството. **В.** Еволюционна консервативност на заменената АК, сравнена при човек при няколко други вида.

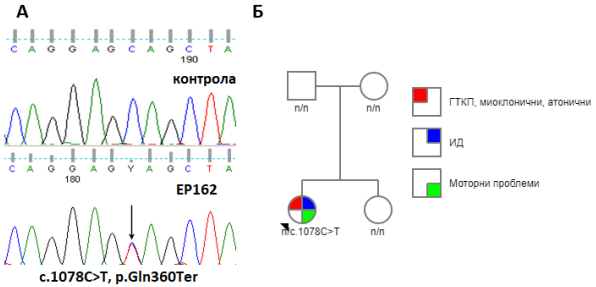
Проведеният от нас 3D- анализ показа, че мутантната АК глутамин не заема коректна позиция в структурата на алфа- спиралата, за да осигури правилна структура на глюкозната пора. Глутаминът има по - малък в пространствено отношение радикал, сравнен с дивия тип хистидин и няма заряд (Фигура 11). В този смисъл е възможно да се възпрепятства формирането на Н-връзка и загуба на свързване с лиганда.



Фигура 10. Топология на белтъка GLUT1 с разположение на намерените мутации при пациенти EP162 И EP219. Потъмнената част от GLUT1 белтъка е тази, която не се синтезира в резултат от p.Glu360Ter мутацията. 3D-изображение на пространственото разположение на дивия тип АК - хистидин и мутантната АК глутамин в позиция 160 от структурата на TM5 домена. Генерирано посредством HOPE проект чрез използване на PDB файл 4PYP (http://www.cmbi.ru.nl/hope).

- **Вариант c.1078C>T, p.Gln360Ter при пациент EP162**

Вариантът засяга екзон 9 от *SLC2A1* гена и е резултат от транзиция на цитозин в тимин в позиция 1078 от кодиращата последователност (Фигура 11А). В резултат се променя кодон 360 за АК глутамин в стоп-кодон (CAG/TAG) и като резултат се прекъсва рамката на четене, небходима за синтезата на интактен белтък. Беше намерен при пациент EP162, 12-годишно момиче с изява на разнообразни пристъпи (ГТКП, миоклонични и атонични пристъпи) и изоставане в НПР. В допълнение се наблюдават понижен мускулен тонус, тремор и лека атаксия. Детето е имало затруднения в училище, лек ИД и депресивни състояния. Не се наблюдава съществен отговор към антиконвулсантната терапия до момента. Анализът на концентрацията на глюкоза в кръвта, сравнена с тази в цереброспинална течност (ЦСТ) показва ниско съотношение ЦСТ/кръвна глюкоза= 0.38 mmol/l. Проведеният сегрегационен анализ показа, че вариантът липсва при здравите родители (Фигура 11Б).



Фигура 11. Молекулен вариант c.1078C>T, p.Gln360Ter в екзон 9 на ген *SLC2A1.* А. Секвенционен профил пациент EP162, сравнен със здрава контрола. **Б.** Родословно дърво на семейство 162, с означен носителски статус при изследваните членове. Със стрелка е показан индексния пациент EP162 в семейството.

Молекулният вариант е нов, неописан досега в литературата. До този момент са докладвани 15 мутации от същия тип, водещи до образуването на предварителен стоп-кодон в кодиращата последователност на *SLC2A1*. Клиничната картина при всяка една от тях е свързана с тежки форми на синдром на GLUT1 дефицит. Молекулният дефект p.Glu360Ter с голяма вероятност елиминира последните три трансмембранни домена, както и цитоплазмения домен от АК секвенция на GLUT1 белтъка (Фигура 11). Това би могло да доведе до преждевременна деградация на белтъка и намаляване на концентрацията му с 50%, което по АД механизъм води до недостатъчен продукт за изпълняване на нормална функция и следователно патологичен ефект.

В настоящото проучване открихме генетичната причина за заболяването при двама пациенти с абсансни епилепсии (4.8%) – един пациент с CAE и един пациент с GLUT1-DS. По литературни данни при 1 - 12% от пациентите с различни форми на абсансни епилепсии се откриват мутации в *SLC2A1* гена (Suls et al., 2009, Muhle et al., 2013; Arsov et al., 2012b; Lebon et al., 2015). Тази честота на откриваемост варира в значителна степен, тъй като се наблюдава голяма хетерогенност на изява на заболяването не само при различните абсансни епилепсии, а дори само в рамките на GLUT1 - DS.

Поставянето на генетична диагноза има голямо клинично значение при пациентите с GLUT1-DS и други абсансни епилепсии, където мутации в *SLC2A1* гена са причина за изявата на епилепсията, тъй като по този начин се дава възможност за индивидуализиран подход при лечението им. Голямата част от описаните до този момент клинични случаи с мутации в този ген са неподатливи на медикаментозно лечение, но показват значително подобрение при прилагане на кетогенна диета. Алтернативното лечение чрез кетогенна диета не само позволява избягването на потенциално опасни антиепилептични лекарства, но и представлява средство на избор при случаите на рефрактерна епилепсия.

4.2.3. MLPA анализ на *SLC2A1* гена

За търсене на екзонни делеции и дупликации в *SLC2A1* гена включихме всички 13 пациенти от подгрупа GLUT1-DS (наличие на абсансни пристъпи с ИД), при които не бяха открити патогенни точкови варианти. MLPA анализът при тях не успя да идентифицира патогенни копийни варианти, засягащи част или целия *SLC2A1* ген. Това вероятно се дължи отчасти на малката извадка (n=13), а от друга страна на хетерогенността на изява на заболяването, което често наподобява множество синдромни състояния, включващи най – честите симптоми на GLUT1-DS. Освен това, спектъра на интрагенни делеции или

делеции на целия *SLC2A1* ген е значително по – малък (11-14%), сравнен с процента на точкови мутации като причина за изява на този синдром (70-80%) (Leen et al., 2010, Yang et al., 2011, Arsov et al., 2012). За детекцията на патогенни копийни варианти чрез MLPA е небходимо разширяване на извадката с по - прецизно клинично-охарактеризирани пациенти.

4.3. Мутационен анализ на *KCNQ2* гена

- Като първа стъпка в настоящото проучване, бяха амплифицирани и секвенирани по метода на Сангер всички 17 екзона и екзон-интронни граници от *KCNQ2* гена (OMIM: 602235) (транскрипт ENST00000359125.6).
- Пациентите, при които не бяха установени точкови мутации и/или малки инсерции/делеции при секвенирането на ген *KCNQ2*, бяха включени в изследване за търсене на по - големи делеции/инсерции, обхващащи цели екзони на *KCNQ2* или целия ген, чрез метода MLPA.

4.3.1. Клиничен материал

В молекулярно-генетичното изследване чрез директно секвениране на ген *KCNQ2* бяха включени 15 пациенти от неродствени фамилии, с данни за непровокирани епилептични пристъпи и електро-клиничен синдром през първата година от живота. Клиничното изследване показа, че осем от тях представляват фамилни случаи на класически бенигнени фамилни неонатални конвулсии (BFNC), а при пет пациенти със същата диагноза заболяването протича като изолиран клиничен случай в семейството. Наблюдаваните епилептични пристъпи са тонични, или тонично-клонични, като при всички пациенти се появяват в рамките на първите четири месеца от живота, придружени от периорална цианоза. Двама от пациентите от изследваната група са със съмнение за неонатална епилептична енцефалопатия, при които след старта на пристъпите основно с тонично-клоничен характер, се наблюдава постепен регрес в НПР, като при единия пациент има данни за фамилност, а при другия няма.

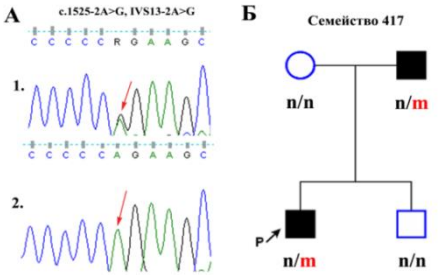
4.3.2. Секвениране по Сангер на *KCNQ2* гена

В резултат от секвенирането на *KCNQ2* гена при 15 пациенти със съмнение за BFNC открихме два точкови варианта при двама пациенти от изследваната група (13.3%). Единият е нов, непубликуван досега сплайс -

акцепторен вариант (c.1525-2A>G), а другият представлява известна мутация с промяна на смисъла (c.998G>A, p.Arg333Gln). И двата варианта се откриват при фамилни случаи на бенигнени неонатални конвулсии, като и двата са унаследени от баща с история за пристъпи в неонаталния период.

- **Вариант c.1525-2A>G, IVS13-2A>G в семейство 417**

В настоящото проучване беше открит нов хетерозиготен молекулен вариант c.1525-2A>G, IVS13-2A>G, засягащ сплайс-акцепторното място на интрон 13 в *KCNQ2* гена и намерен при момче на една година с BFNC (Фигура 12А). Проведеният сегрегационен анализ при семейство 417 показа, че сплайс - вариантът е унаследен от бащата, с данни на BFNC в неонаталния период, постепенно изчезнали в по - късните етапи от живота. Вариантът липсва при клинично здравите майка и по - малък брат (Фигура 12Б). Назначеното лечение с фенобарбитал при детето дава добър отговор.



Фигура 12. А. Електрофоретичен профил на мутацията **c.1525-2A>G, IVS13-2A>G** при 1. Пациент 417 и 2. здрава контрола. **Б.** Сегрегационен анализ на семейство 417; Със стрелка е показан индексния пациент EP417; **n**- нормален алел; **m**- мутантен алел.

Новият сплайс-място вариант c.1525-2A>G канонична сплайс - последователност AG в 3‘-края на интрон 13. Анализът на секвенцията в обсег от 250 бдв около мутиралия нуклеотид с помощта на предикционния софтуер NetGene2 показа, че съществува 95% вероятност за използване на първия алтернативен AG нуклеотид, разположен навътре в екзон 14 (Фигура 13).

NetGene2:

Acceptor splice sites, direct strand

pos 5'->3'	phase	strand	confidence	5' intron exon 3'
66	0	+	0.00	TGCCCTGCAG^GACCCCGGGA
130	1	+	0.95	CCCCCGGAAG^CAAGCCTCCC
134	2	+	0.43	CGGAAGCAAG^CCTCCCCGGA
145	1	+	0.34	CTCCCCGGAG^AGGACATTGT
147	0	+	0.34	CCCCGGAGAG^GACATTGTGG
165	0	+	0.07	GGATGACAAG^AGCTGCCCCT
167	2	+	0.07	ATGACAAGAG^CTGCCCCTGC

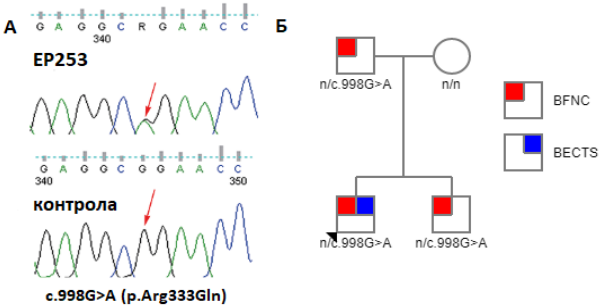
Фигура 13. Анализ на вероятните канонични сплайс-места в близост до интрон-екзонната граница интрон 13/екзон 14 с помощта на предиктивния софтуер NetGene2

Това би довело до делеция на една АК (c.1526_1528delAAG; p.Glu508del) в С- терминалния домен на Kv7.2 белтъка. Този домен се състои от два спираловидни мотива, които, заедно със съответстващите си мотиви от Kv7.3 белтъка в рамките на хетеротетрамерната структура на канала, взаимодействат с модулатори на активността му, какъвто е калмодулина - CaM (Wen et al., 2002). Друго вероятно последствие от сплайс–мутацията c.1525-2A>G е използването на сплайс - акцепторното място на някой от съседните интрони, което би довело до пропускане на един или няколко екзона (exon skipping), последващо активиране на процеса на нонсенс - медиираното разрушаване на матричната РНК и в крайна сметка непродуктивна транслация на интактен белтък. И в двата случая е необходимо да се докаже наличието на аберантен сплайс-продукт на ниво РНК за потвърждаване на патологичния ефект на мутацията c.1525-2A>G. Това изисква експресия на аберантния Kv7.2 протеин в клетъчни системи. Такъв анализ се извършва в специализирани лаборатории, изисква повече време и представлява обект на самостоятелно проучване, поради което би могъл да бъде предмет на бъдещ проект.

- **Вариант c.998G>A (p.Arg333Gln) в семейство EP253**

Вариантът е от типа промяна на смисъла, засяга екзон 7 от *KCNQ2* гена, резултат от транзиция на гуанин в аденин в позиция 998 от кодиращата последователност (Фигура 14A), което води до синтеза на АК глутамин вместо аргинин в кодон 333 (CGG→CAG). Открит е при момче на седем години с диагноза BFNIC, изява на тонично-клонични пристъпи от 4-месечна възраст с цианоза. Съществуват и два пристъпа с Роландова характеристика и поява в по - късна възраст. Има данни за фамилна обремененост в семейството: баща с неонатални конвулсии в детството, постепенно отшумели в по - късните етапи от живота и по - малък брат с диагноза BFNC. Проведеният сегрегационен анализ

показа наличие на варианта при тях и отсъствието му при здравата майка (Фигура 14Б).



Фигура 14. Молекулен вариант c.998G>A, p.Arg333Gln в екзон 7 на ген *KCNQ2.* **А.** Секвенционни профили при индексния пациент и здрава контрола. **Б.** Родословно дърво на семейство 253, с означен носителски статус при изследваните членове. Със стрелка е показан индексния пациент EP253 в семейството.

Молекулният вариант p.Arg333Gln е известен и неговип ефект върху функциите на белтъка е изследван експериментално чрез експресия на хетеротетрамерния комплекс Kv7.2/Kv7.3 в овоцити от *Xenopus laevis*. Изследването е показало, че p.Arg333Gln води до относително слаба редукция в калиевия ток (<50%) в сравнение с дивия тип K+ канал (Singh et al., 2003). Дивият тип АК аргинин 333 се намира в единия от двата консервативни мотива, участващи във взаимодействието с CaM (АК 321–358). Заменената АК глутамин се различава по размер и заряд от дивият тип АК - аргинин. Глутаминът е по - малка и неполярна АК, за разлика от аргинин 333, която е по - голяма и положително заредена. В този смисъл, заряда на АК се губи поради невъзможност за свързване с CaM, което води до намалена активност на калиевия канал (Yus-Najera et al., 2002).

В нашият случай, засегнатият пробанд впоследствие развива бенигнена детска епилепсия с центро темпорални пики (BECTS) на 3-годишна възраст. Досега съществуват само три случая на пациенти с BFNC, които развиват впоследствие BECTS (Maihara et al., 1999; Coppola et al., 2003; Ishii et al., 2012). Двама сиблинги с изява на BFNC, еволюираща в BECTS носят „nonsense“ мутация (c.967C>T, p.Gln323Ter), локализирана в същия CaM- свързващ мотив, както мутацията в нашия случай (Maihara et al., 1999). Еднобазова делеция с изместване на рамката на четене (c.2043delT) в *KCNQ2* гена е описана във

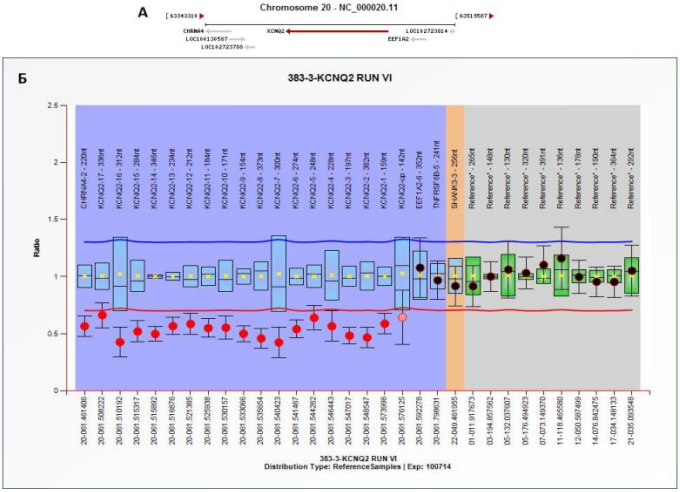
фамилен случай на BFNC от италиански произход, като пробанда впоследствие развива BECTS на 3-годишна възраст по време на сън (Coppola et al., 2003). Третият описан в литературата подобен случай е на момиче от японски произход с *de novo* хетерозиготна делеция (c.910-2delTTC или TTT, Phe304del), засягаща шестия трансмембранен домен на Kv7.2 протеина (Ishii et al., 2012).

В нашето изследване, мутацията p.Arg333Gln бе намерена при фамилен случай на BFNC. Мутацията сегрегира с болестния фенотип в семейството (Фигура 13Б). Индексният пациент в семейството обаче, в последствие развива BECTS. Наблюдаваната клинична хетерогенност при пациент EP253 (по - късно начало на пристъпите и диагноза BFNIS), сравнена със старта на пристъпите при засегнатите родственици, както и докладваните в литературата случаи, би могла да се дължи на допълнителни генетични фактори при индексния пациент, като наличието на модифициращ молекулен дефект в друг ген.

4.3.3. MLPA анализ на *KCNQ2* гена

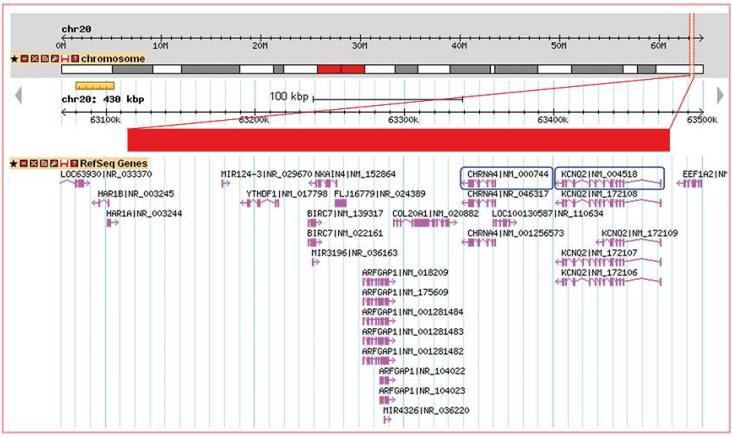
В резултат от MLPA анализа на *KCNQ2* гена открихме хетерозиготна цялостно - генна делеция на *KCNQ2* гена при пациент EP383: спорадичен случай с изява на BFNC (Фигура 15). Делецията е възникнала *de novo*, тъй като родителите на пациента притежават по две копия на *KCNQ2* гена. Фрагментният MLPA анализ показа, че делецията вероятно започва от *KCNQ2* гена, тъй като сондата, която хибридизира в ген *EEF1A2*, разположен в 5'-посока спрямо *KCNQ2* и в близост до него, е в две копия. Тя обаче се простира извън *KCNQ2* гена, тъй като се установява по едно копие, както на сондите за 17-те екзона на *KCNQ2* гена, така и на сондата, която хибридизира в ген *CHRNA4*, разположен в 3'-посока спрямо *KCNQ2* (Фигура 15А,Б).

За установяване на нейните граници проведохме микрочипов анализ (aCGH), който показа, че делецията е с размер 411 Кб и включва 8 OMIM гена (610557, 610556, 616529, 605737, 612873, 608377, 118504, 602235), от които два са свързани с епилептичен фенотип: *KCNQ2* и *CHRNA4* (Фигура 16).



Фигура 15. А. Схематично разположение на гените в хромозомен район 20q13.3. **Б.** Резултат от MLPA анализ в ген *KCNQ2* при пациент EP383 с делеция в хромозомен район 20q13.3.

Генът *CHRNA4* кодира субединицата на алфа - невроналния ацетилхолинов рецептор (OMIM: 118504). Досега са известни само missense и инсерционни мутации, засягащи този ген и асоциирани с автозомно доминантна епилепсия на фронталния лоб (ADNFLE). Досега няма пряко доказателство за делеции в *CHRNA4* гена, свързани с епилептичен фенотип. От друга страна, редица прекъсващи рамката на четене мутации в ген *KCNQ2* водят до типичната клинична изява на BFNC. Подобни на откритата при нас делеции с различни размери, обхващащи гените *KCNQ2* и *CHRNA4,* са съобщени в няколко други изследвания и показват, че в случаите, когато делецията в 20q13.3 е ограничена само до двата гена *KCNQ2* и *CHRNA4*, се наблюдава изява на класически BFNC (Zara et al., 2013; Okumura et al., 2015). Клиничните характеристики на нашия пациент наподобяват типични BFNC, което предполага, че болестния фенотип не се дължи на хаплоинсуфициенция на *CHRNA4*. В този смисъл, размерът и локализацията на делецията в 20q13.33, засягаща *KCNQ2* при нашия пациент, както и клиничните му характеристики са в съответствие на хипотезата, че делеции на двата гена *KCNQ2* и *CHRNA4* не водят до допълнителни разстройства в невропсихическото развитие (Okumura et al., 2015; Allen et al., 2014).



Фигура 16. Генно съдържание на делетиралия регион в 20q13.33 при пациент 383. Червеният правоъгълник показва обхвата на делецията. Оградените гени са с потенциална роля в епилептичния фенотип на пациент 383. Взета и модифицирана от DGV (https://www.dgv.tcag.ca)

Настоящото проучване доведе до установяване на молекулни дефекти в три от 13 случая на BFNC (16,6%). Този диагностичен добив е по - малък, отколкото съобщения по литературни данни (Singh et al., 1998; Zara et al., 2013). Това може да се дължи на малката извадка от класически BFNC случаи (n=13), които подбрахме за изследване. При недиагностицираните пациенти е възможно да са засегнати други гени, асоциирани с изява BFNC фенотип. Например, *SCN2A* и *KCNQ3* гените се явяват рядка причина за развитие на BFNC (Fister et al., 2012; Zara et al., 2013). Все пак, използването на два различни подхода - директно секвениране и MLPA анализ, при едно и също заболяване показва, че двата метода могат да покрият целия спектър на мутации в *KCNQ2* гена, отговорни за изявата на тези електро-клинични състояния.

4.4. Микрочипов анализ на пациентите със синдромни състояния

4.4.1. Клиничен материал

При пациентите с тежки синдромни състояния, където освен епилепсията се наблюдават и допълнителни вродени аномалии и ИД бе проведен микрочипов анализ чрез метода на сравнителната геномна хибридизация - aCGH (array Comparative Genomic Hybridization) за търсене на големи геномни промени в броя копия (Copy Number Variations - CNVs), които представляват загуба (делеции) или придобиване (дупликации) на генетичен

материал от хромозомите. Те могат да засегнат както един, така и множество гени, отговорни за нормалното ембрионално развитие и/или гени, играещи роля в генерирането, предаването на нервния импулс и комуникацията между отделните неврони. Пациентите, при които се наблюдава придобит регрес в НПР след началото на пристъпите бяха изследвани за *SCN1A* точкови мутации и вътрегенни делеции, за да се изключи вероятността за DS. Пациентите с изява на абсансни пристъпи, както и проблеми с моториката и наличие на различен по тежест ИД бяха скринирани за точкови мутации и/или вътрегенни промени в броя копия в *SLC2A1* гена чрез директно секвениране и/или MLPA, за да се изключи възможността за GLUT1-DS или друг електро-клиничен синдром, асоцииран с мутации в този ген. Друга част от пациентите бяха насочени директно за извършване на микрочипов анализ, поради наличието на по - тежък синдромен фенотип (Таблица 8).

Таблица 8. Брой подбрани пациенти и извършени анализи при тях

Клиничен фенотип	**Тип анализ**	**Брой пациенти**
Рефрактерни фебрилно - провокирани ГТКП, изоставане в НПР	Директно секвениране на *SCN1A*	29
	MLPA анализ на *SCN1A*	20
	Микрочипова СГХ*	**29**
Абсанси,двигателни нарушения, ИД, когнитивно-поведенчески нарушения	Директно секвениране на *SLC2A1*	25
	MLPA анализ на *SLC2A1*	14
	Микрочипова СГХ	**25**
Допълнителни общи и лицеви дисморфизми, мозъчни аномалии	Микрочипова СГХ	**39**
Общ брой пациенти, подбрани за изследване чрез aCGH		**93**

*** СГХ – Сравнителна Геномна Хибридизация**

В микрочиповия анализ бяха включени 93 пациенти (50 момчета и 43 момичета) на възраст между една и 22 години. Петдесет и четири от пациентите бяха събрани в рамките на настоящото проучване, а 39 бяха селектирани от ДНК банката на ЦММ, събрани в предишни години. Те бяха подбрани на базата на два основни критерия: наличието на епилептични пристъпи и интелектуален

дефицит с или без наличие на вродени аномалии и поведенчески проблеми. При 47 пациенти (51%) има данни за фамилна обремененост в семейството за епилепсия и/или ИД, а 46 пациенти (49%) представляват спорадични случаи. Почти всички имат разнообразни по тип епилептични пристъпи (97%) и различна степен на ИД (99%), поведенчески проблеми от аутистичния спектър (43%), общи и лицеви дисморфизми (53%), забавена реч или пълната й липса (46%), микроцефалия (15%), двигателни нарушения (38%) и структурно-мозъчни аномалии (31%). В изследваната група най - разпространения тип пристъпи е ГТКП (66%), следвани от миоклоничните (20%) и абсансите (18%) (Фигура 38А). Оценката на IQ показва лека форма на ИД при 32% от пациентите, умерен ИД при 22%, тежък ИД при 14%, неопределен по тежест ИД при 21% от пациентите и 11% малки деца на възраст под 2 години с изоставане в НПР.

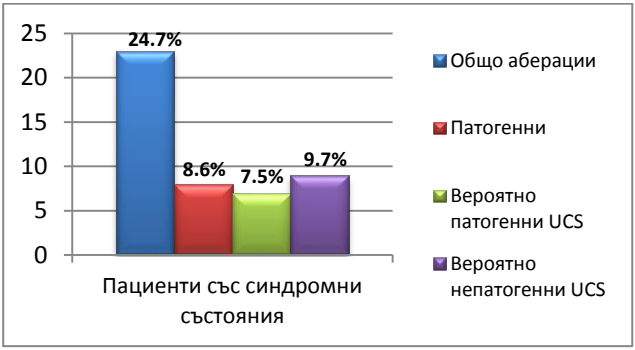
4.4.2. Микрочипова сравнителна геномна хибридизация (aCGH)

В резултат от микрочиповия анализ чрез метода на aCGH открихме патогенни вариации и такива с неясно клинично значение в 23 от общо 93 пациенти от изследваната група (24.7%) (Фигура 17). От тях общо 15 патогенни или вероятно патогенни копийни варианти бяха открити в 14 пациенти (15.1%). Тъй като някои от идентифицираните патогенните промени в броя копия (CNVs) са описани в предишни проучвания при случаи с различна степен на забавяне в развитието, в настоящия дисертационен труд се описват случаите на сигурно патогенни аберации (8/15 аберации), обсъжда се потенциалната патогенност на вероятно CNVs (7/15 аберации) и се прави анализ на връзката генотип - фенотип. Някои от намерените CNVs биха могли да повлияват фенотипа според хипотезата на двойния удар, предложена първоначално от Girirajan и съавтори (Girirajan et al., 2010). Осем CNVs са асоциирани с известен микроделеционен или дупликационен синдром, позволяващи да се постави генетичната диагноза при 8.6% от пациентите в настоящото проучване (Фигура 17). Вероятно патогенни CNVs, неасоциирани с известен синдром, но от потенциален интерес за бъдещи проучвания бяха намерени при седем пациенти от изследваната група (7.5%) (Таблица 9, Фигура 17). Сигурно патогенните аберации бяха открити при шест момичета и две момчета, докато вероятно патогенните CNVs бяха открити при пет момчета и две момичета (EP405 и EP424). Пациент EP424 носи две делеции – една, засягаща район, свързан с микроделеционен синдром и друга вероятно патогенна хетерозиготна делеция (Таблица 25). Част от пациентите бяха скринирани предварително за наличие на патогенни варианти в *SCN1A* гена (n=7; пациенти EP424, EP385, EP539, EP498, EP327, EP381, EP419), в

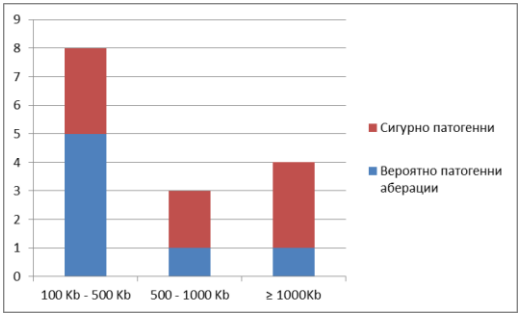
SLC2A1 гена (n=2; пациенти EP166, EP223), а пет пациенти бяха директно изследвани чрез микрочипов анализ, поради наличието на комплексно синдромно състояние, включващо допълнителни вродени аномалии (n=5; пациенти EP270, EP437, EP324, EP405, EP222). Всички вероятно патогенни CNVs не бяха открити в базата–данни DGV (http://dgv.tcag.ca), съдържаща CNVs, открити в здрави контролни индивиди от общата популация.

В резултат от проведения микрочипов анализ бяха открити общо 15 аберации, осем от които са патогенни, а седем са с неясна клинична значимост и вероятно патогенен ефект. Аберациите с патогенен и вероятно патогенен ефект засягат 9 хромозоми (хромозоми 1, 2, 6, 7 9, 10, 15, 16, 17). При хромозома 1 се засяга късото рамо при двама пациенти в различни хромозомни райони (1p36.33 и 1p34.2). При хромозоми 2 и 15 се засяга дългото рамо общо при пет пациенти (двама пациенти с аберация в райони 2q24.3q31.1 и 2q24.1q24.3; три пациенти с аберация в райони 15q13.3, 15q13.1 и 15q22.31). При хромозоми 6 и 7 се засягат съответно късо и дълго рамо при два пациента за всяка хромозома (двама пациенти с аберация в райони 6p25.1 и 6q26; двама пациенти с аберация в райони 7p22.3 и 7q31.1). Останалите засегнати райони се установяват при единични пациенти от изследваната група (Таблица 9).

Дванадесет от установените аберации са интерстициални, а три засягат терминални сегменти от хромозомите. Четири CNVs засягат част или цялостно единичен ген, а 11 аберации засягат два или повече гени. По отношение на размера на засегнатия фрагмент: с размер между 100 и 500 Kb са осем аберации, три от които патогенни. С размер от 500 до 1000 Kb са общо три аберации, две от които са патогенни. С размер над 1000 Kb за четири CNVs, три от които са патогенни (Фигура 18).



Фигура 17. Честота на откриваемост на CNVs от провеждането на микрочипов анализ при 93 пациенти със синдромни състояния, включващи епилепсия, ИД и вродени аномалии.



Фигура 18. Разпределение на откритите аберации чрез aCGH според размера и класификацията.

Впоследствие, намерените аберации, представляващи клиничен интерес (патогенни и вероятно патогенни CNVs) бяха потвърдени чрез количествен PCR в реално време. За целта бяха използвани ДНК от здрави контролни индивиди, при които е прието, че са с нормален брой копия в изследваните райони. Техните профили бяха сравнени с профилите на интересуващите ни тестови фрагменти от изследваните пациенти.

Таблица 9. Патогенни и вероятно патогенни геномни пренареждания при 14 пациенти, открити чрез aCGH

Пробанд	aCGH резултат (ISCN (2013) Simons et al., 2013) (GRCh37/hg19)	Размер (Мб)	Унаследяване	RefSeq гени	OMIM гени	Оценка на патогенноттта
166	17q12(34,360,846-36,216,399)x3	0.856	N/A.* засегната сестра носител	33	*ACACA, CCL3L3, HNF1B, PIGW*	патогенна
424	1p36.33(1,157,375-1,706,192)x0	0.549	N/A	35	*B3GALT6, DVL1, ATAD3A, TMEM240*	патогенна
	16p13.3(571,779-798,340)x1	0.227	N/A	28	*TUB1, CCDC78*	вероятно патогенна
539	2q24.3q31.1(164,807,751-170,315,525)x1	5.51	de novo	30	*GALNT3, TTC21B, SCN1A, SCN9A, ABCB11, LRP2,*	патогенна

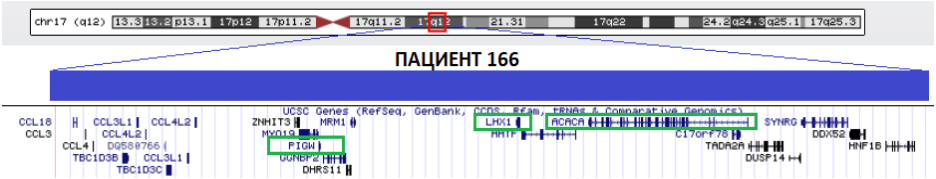
					SCN2A	
437	2q24.1q24.3(159,156,845-167,711,717)x1	8.555	N/A	55	*ITGB6, IFIH1, SCN2A, GALNT3, TTC21B, SCN1A, SCN9A*	патогенна
270	1p34.2(43,251,879-43,416,139)x1	0.165	de novo	6	*ERMAP, SLC2A1*	патогенна
324	6q26(162,707,603-163,050,403)x3	0.343	de novo	1	*PARK2*	патогенна
385	7p22.3(83,325-1,008,710)x1	0.925	N/A	12	*FAM20C HEATR2*	патогенна
498	7q31.1(111,194,597-111,333,959)x1	0.139	N/A	*IMMP2L*	-	патогенна
405	15q13.3(32,016,364-32,514,980)x3	0.499	N/A; засегнат брат носител	2	*CHRNA7 OTUD7A*	вероятно патогенна
223	9q33.1(119,303,085-119,990,036)x3	0.687	N/A	5	*TRIM32, ASTN2*	вероятно патогенна
327	6p25.1(5,259,570-5,359,994)x0	0.100	унаследена от майка	2	*LYRM4; FARS2*	вероятно патогенна
222	10q21.3(68,181,834-68,292,471)x1	0.111	N/A	1	*CTNNA3*	вероятно патогенна
381	15q13.1(29,096,386-29,498,094)x3	0.402	унаследена от майка; баба хетерозиготен носител	1	*APBA2*	вероятно патогенна
409	15q22.31(64,242,830-65,570,262)x1	1.32	N/A	5	*PPIB, ACP33, MTFMT, KBTBD13, CILP, CSNK1G1*	вероятно патогенна

*не е проведен сегрегационен анализ при родителите, поради липса на материал от тях

4.4.2.1. Патогенни хромозомни микроаберации

- **Дупликация arr[hg19]17q12(34,360,846-36,216,399)x3 при пациент EP166**

Момиче на 10 години с изява на епилептични пристъпи, лек ИД, задръжка в развитието на речта и поведенчески проблеми. В резултат от aCGH анализа открихме 1.856 Mб дупликация в 17q12 региона (Фигура 19). Детето е с лека степен на ИД и абсансни ГТКП, умерени по тежест паметови затруднения, личностови нарушения, неустойчиво внимание с недостатъчна концентрация и превключваемост, наблюдват се стереотипии. Потвърдителният qPCR показа, че дупликацията присъства и при засегнатата сестра, също с абсансна епилепсия. Съществува фамилност за заболяването в семейството - освен двете сестри с епилепсия, тяхното братче има ИД, но той, както и родителите, не предоставиха материал за провеждане на сегрегационен анализ.



Фигура 19. Схематично изображение на регион 17q12 при пациенти EP166. Синият правоъгълник обозначава дуплицирания участък при пациент 166. Със зелено са оградени гените, имащи потенциална роля в формиране на болестния фенотип при пациент EP166. Адаптирана от UCSC Genome Browser (https://genome.ucsc.edu).

Дуплицираният район в регион 17q12 засяга 33 UCSC гена, 22 от които са OMIM гени. Дупликации в този регион са асоциирани с 17q12 микродупликационен синдром (OMIM: 614527) (Фигура 19). Големината на засегнатия участък при този синдром варира от 1 Mb до 2.5 Mb. Най - типичните клинични черти, характерни за него са ИД, поведенчески проблеми, както и забавяне в развитието на речта и моториката. Всички те присъстват при пациент EP166. Част от гените, засегнати от дупликацията могат да имат потенциална роля в невропсихиатричния фенотип, наблюдаващ се в нашия случай. Генът *LHX1* (OMIM: 601999) кодира хомеодомейн транскрипционен фактор, участващ в развитието на нервната система, чрез контролиране първоначалната траектория на моторните аксони в развиващите се крайници при бозайниците. До този момент в литературните данни съществува един докладван случай на частична

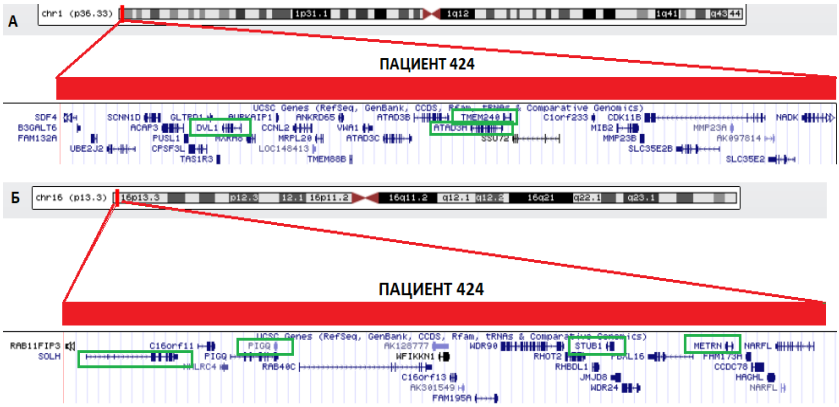
дупликация на *LHX1* гена, намерена в пациент с ИД, фокална кортикална дисплазия и фокална епилепсия (Mefford et al., 2010). Друг ген с важно значение е *PIGW*- рецесивни мутации в този ген са наблюдавани в случай на синдром на West и синдром на хиперфосфатазия с интелектуален дефицит 5 (Chiyonobu et al., 2014). Допълнителен ген, засегнат от дупликацията с висока експресия в мозъчна тъкан е *ACACA* - кодира ацетил КоА-карбоксилаза, катализираща лимитиращия етап от биосинтезата на дълговерижните мастни киселини. Съществува хипотеза, че дупликации на *ACACA* биха могли да доведат до епилептогенна активност чрез свръх - оползотворяване на наличния ацетил - КоА и последващо нарушение на нормалния енергиен метаболизъм в мозъка (Hardies et al., 2013).

Всички описани гени може да допринасят за наблюдавания поведенчески и неврологичен фенотип наблюдавани при пациент EP166.

- **Патогенна и вероятно патогенна делеции arr[hg19]1p36.33(1,157,375-1,706,192)x0 и arr[hg19] 16p13.3(571,779-798,340)x1 при пациент EP424**

Момиче на шест години с диагноза криптогенна парциална епилепсия, леко нарушение в НПР, локомоторна статична атаксия, лека спастичност в стъпалата и поведенчески проблеми. Секвенирането на *SCN1A* гена не доведе до откриване на патогенен вариант. Проведеният aCGH анализ показа наличие на 549 Кб хомозиготна делеция в 1p36.33 района (Фигура 20А). В допълнение, при EP424 установихме 227 Кб хетерозиготна делеция в 16p13.3 района с вероятно патогенен ефект: (Фигура 20Б). Делецията в хромозомен район 1p36 е хомозиготна и засяга засяга 35 UCSC гена, 24 от които са OMIM, а четири са свързани със заболяване (Таблица 9).

Литературните данни показват, че регион 1p36.33, засегнат от делецията е свързан с 1p36 делеционния синдром- синдром с най-висока честота на изява в световен мащаб (1/5000 живородени деца). Заболяването включва ИД, липса или нарушение в експресивната реч, поведенчески проблеми, хипотония, епилептични пристъпи и структурни аномалии на мозъка. Характерно за 1p36 синдрома, а и за микроделеционните и микродупликационни синдроми по принцип, е изключителната вариабилност на фенотипа в зависимост от големината на засегнатия участък, гените, включени в него и влиянието на модифициращи фактори в рамките на конкретния индивид.



Фигура 20. Схематично изображение на региони 1p36 и 16p13.3 при ЕР424; червените правоъгълници обозначават делетиралия участък съответно в **А.** Район 1p36 **Б.** Район 16p13.3. Със **зелено** са оградени гените, имащи потенциална асоциация с клиничния фенотип на пациент 424. Адаптирана от UCSC Genome Browser (https://genome.ucsc.edu).

В нашият случай делецията засяга три гена с потенцилана роля в болестния фенотип на ЕР424 (Фигура 20А). Генът *TMEM240* (OMIM: 607454) кодира високо консервативен трансмембранен белтък, експресиращ се предимно в мозъка, чиято функция все още не е изяснена. Мутации в него са асоциирани със спиноцеребрална атаксия 21 в комбинация с ИД и когнитивни проблеми (Delplanque et al., 2014). В този смисъл, недостатъчна доза от продукта на *TMEM240* би могла да обясни статичната атаксия и ИД, хиперактивното поведение и не добре развитата реч, наблюдаващи се при нашия пациент. Доминантни и рецесивни мутации в друг ген - *ATAD3A* (OMIM: 612316) наскоро бяха асоциирани със синдром на Harel – Yoon, характеризиращ се основно с неврологична симптоматика: атаксия, изоставане в НПР, спастичност на крайниците, абсансни пристъпи и аксонална невропатия (Harel et al., 2016). Генът *DVL1* кодира вътреклетъчен скелетен протеин, високо експресиращ се в мозъка и необходим за разклонението на дендритите на невроните по време на ембрионалното развитие. Мутации в този ген са идентифицирани при пациенти със синдром на Robinow (OMIM: 616331) - рядко АД заболяване с характерни дисморфични стигми и микроцефалия. Вземайки предвид генното съдържание на засегнатия участък, неговата пряка асоциация с известен микроделеционен синдром, както и хомозиготното състояние на делецията, ние заключихме, че това е генетичната причина за заболяването при ЕР424. Отсъствието на пълния

спектър от симптоми, характерни за този синдром вероятно се дължи на по - малкия размер на делецията, съответно нейното специфично генно съдържание.

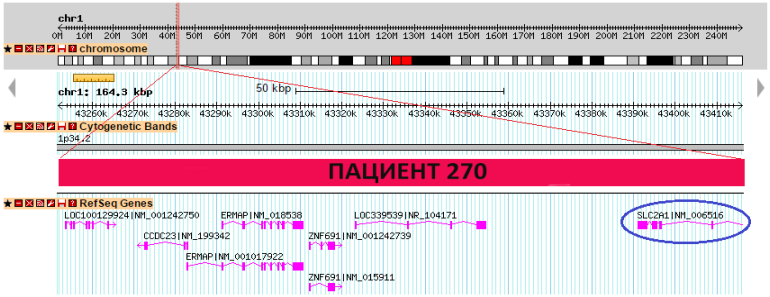
В допълнение, при EP424 беше открита и хетерозиготна микроделеция в регион 16p13.3 с размер 0.227 Mb, която класифицирахме като вариант с вероятно патогенен ефект (Фигура 20Б). Част от гените, съдържащи се в района, са високо експресирани в мозъка и играят важна роля в него: *METRN* (OMIM: 610998)*, STUB1* (OMIM: 607207)*, SOLH* (OMIM: 603267), *PIGQ* (OMIM: 605754). Всички те са асоциирани с АР психомоторни заболявания. Въпреки хетерозиготното състояние на делецията и нейния по - малък размер, отколкото този, необходим за изява на синдромно състояние, е възможно тя да допринася за наблюдаваните клинични характеристики при EP424. Според хипотезата за двойния удар втората аберация служи като отключващ фактор за изява на вариант, класифициран като рисков фактор за развитие на дадено заболяване. В допълнение, ефектите от двете делеции биха могли да са адитивни и да доведат до изява на отделен фенотип, понякога с по - висока степен на тежест от този, който биха имали, ако съществуваха поотделно (Girirajan et al., 2010).

- **Хетерозиготна делеция arr[hg19]1p34.2(43,251,879-43,416,139)x1 при пациент EP270**

При момче на 13-годишна възраст с диагноза метаболитна енцефалопатия, епилепсия и нарушен глюкозен толеранс микрочиповия анализ откри делеция в район 1p34.2 с размер 165 Кб, засягаща почти целия *SLC2A1* ген (Фигура 21). Пациентът допълнително показва вродена катаракта и микрофталмия, нарушена походка, атаксия, конвергентен страбизъм, гинекомастия и асиметричен гръден кош. Поради допълнителните синдромни характеристики, наблюдаващи се при EP270, ние предположихме, че става въпрос за микроделационен/дупликационен синдром и проведохме директно микрочипова aCGH.

Делецията, намерена чрез микрочипов анализ, обхваща почти целия *SLC2A1* ген (освен екзон 1), кодиращ GLUT1 - основния транспортер на глюкоза през кръвно - мозъчната бариера (Фигура 21). Глюкозата е основния източник на енергия на нервните клетки и прекъсване на глюкозния транспорт в резултат на мутации в *SLC2A1* води до синдром на дефицит в глюкозния транспортер – GLUT1-DS Досега са докладвани над 100 мутации в *SLC2A1* като причина за синдрома, като спектъра им е разнообразен - големи делеции, засягащи част от гена или целия ген, точкови мутации с промяна на смисъла, с прекъсване на

рамката на четене, “frameshift” и сплайс - място мутации. Характерно за лечението на синдрома е, че епилептичните пристъпи се повлияват добре от кетогенна диета с изключването на въглехидратни източници, тъй като кетонните тела са алтернативен източник на енергия за мозъка. Наличието на почти цялостна делеция на едното копие на *SLC2A1* гена ни дава основание да поставим генетичната диагноза GLUT1-DS. Това е от огромно значение в конкретния случай, тъй като чрез кетогенната диета може да се постигне пълно изчезване на пристъпите при пациент EP270.



Фигура 21. Схематично изображение на регион 1p34.2, засягащ почти всички екзони на *SLC2A1* гена; червеният правоъгълник обозначава делетиралия участък при пациент EP270. Адаптирана от Database of Genomic Variants (DGV).

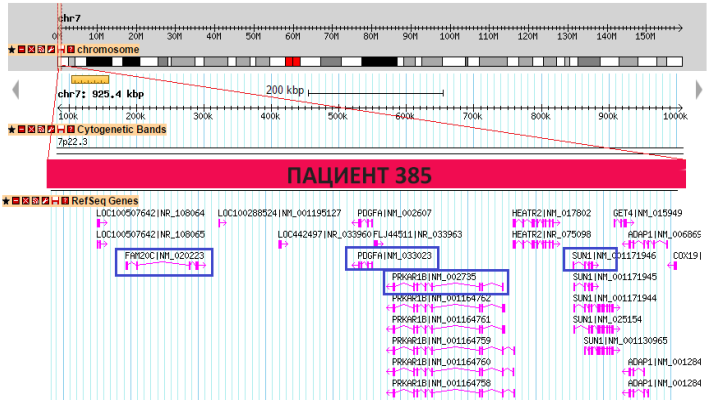
- **Хетерозиготна делеция arr[hg19] 7p22.3(83,325-1,008,710)x1 при пациент EP385**

Чрез метода на aCGH открихме хетерозиготна делеция в терминалната част на 7p22.3 района (Фигура 22) с размер 925 Кб при 5-годишно момиче с ГТКП, изоставане в НПР, липса на самостоятелна походка и говор, намален мускулен тонус, както и поведенчески проблеми. КТ данните показват умерена корова атрофия, фронто-темпоро-париетално, дясно и фронтално кортикална дисплазия, изменения, наподобяващи мезиална склероза, разширени задни рога на страничните вентрикули, както и слабо увеличен обем на дясна cella media.

Делецията засяга девет протеин - кодиращи гени, осем от които са OMIM гени (611061, 173430, 176911, 614864, 607723, 612056, 608114, 610429). Недостатъчната доза от продукта на част от тях може да е причина за

симптоматиката, наблюдавана при EP385 (Фигура 22, оградени гени). Например, хетерозиготна мутация в *PRKAR1B* е асоциирана със сравнително ново АД невродегенеративно заболяване с късно начало, дължащо се на акумулирането на интермедиерни филаменти в клетката (Wong et al., 2014). Друг ген, засегнат от делецията, *PDGFA* (OMIM: 173430) не е асоцииран със заболяване все още, но показва висока екпресия в мозък и е необходим за правилното формиране на олигодендроцитите и миелинизацията на малкия и гръбначния мозък (Frost et al., 2009). Допълнително, друг засегнат ген, *SUN1* (OMIM: 607723) е също високо експресиран в мозък. Продуктът на този ген е част от LINC-цитоскелетния комплекс, който има специфична роля в радиалната невронална миграция в мозъчната кора, както и в миграцията на глиалните клетки по време на формирането на нервната система. В този смисъл, недостатъчна доза от продуктите на тези гени би могла да е причина за част от неврологичните характеристики при нашия пациент.

Съществуват литературни данни за делеции в 7p22.3 района, асоциирани с генетично - хетерогенния синдром Cornelia de Lange (CdLS). Той представлява АД мултисистемно заболяване, характеризиращо се с изоставане в НПР, епилептични пристъпи, поведенчески проблеми, специфичен лицев дисморфизъм, скелетни и мозъчни аномалии, ИД, задръжка в развитието на речта и други. Клиничните характеристики на нашия пациент (Резултати, пациент EP385) покриват минималните диагностични критерии, небходими за поставянето на диагнозата CdLS (Kline et al., 2007). Те включват изоставане в развитието, задръжка в развитието на речта, вродени мозъчни аномалии, специфични поведенчески нарушения (ADHD, агресия, самонаранявания и други), специфичен лицев дисморфизъм. Всички те присътстват в анамнезата на пациент EP385. В крайна сметка, асоциацията на 7p22.3 региона с CdLS синдрома, както и наблюдаваните специфични клинични черти при пациент EP385 ни даде основание да поставим генетична диагноза синдром на Cornelia de Lange.



Фигура 22. Схематично изображение на регион 7p22.3; червеният правоъгълник обозначава делетиралия участък при пациент EP385. Със синьо са оградени гените, имащи потенциална асоциация с клиничния фенотип на пациент EP385. Адаптирана от Database of Genomic Variants (DGV).

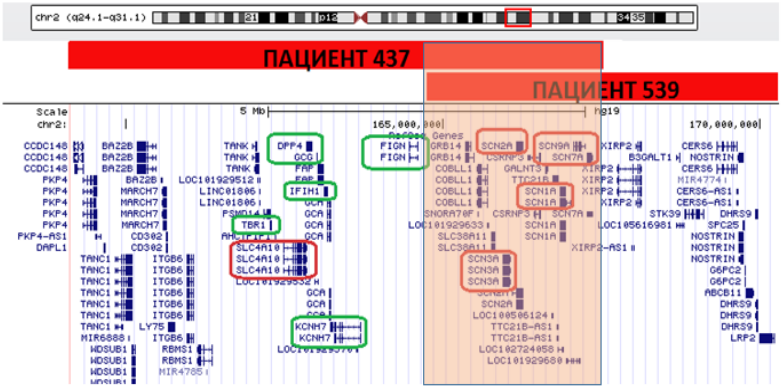
- **Хетерозиготни делеции arr[hg19]2q24.1q24.3(159,156,845-167,711,717)x1 при пациент EP437 и arr[hg19]2q24.3q31.1(164,807,751-170,315,525)x1 при EP539**

При пациенти EP437 и EP539 чрез aCGH бяха открити делеции, засягащи райони 2q24.1q24.3 и 2q24.3q31.1, разположени върху дългото рамо на хромозома 2 с размери 8.55 Мб и 5.51 Мб съответно (Фигура 23).

Пациент EP437 е момиче на една година с тежък неврологичен фенотип и установен още в първите дни малформативен синдром - хейлогнатопалатосхизис, хипертелоризъм, малки очни цепки, ниско разположени и лошо моделирани ушни миди, двустранни колобоми на ириса и ретината, микроцефалия. Проведеното през шести месец КТ изследване разкрива асиметрия на вентрикулите с по - широк ляв страничен вентрикул, разширени субарахноидни пространства. Пациентката има изоставане в НПР, рефрактерни ГТКП, амблиопия, мускулна хипотония, лош контрол на главата, невъзможен самостоятелен седеж, без рефлекс на ходене.

Пациент EP539 е момиче на две години с медикаментозно-резистентна епилепсия, съмнение за епилептична енцефалопатия и леко изоставане в НПР. Проведеният ЯМР разкрива изтъняване на корпус калозум във всичките си отдели, разширени субарахноидни пространства, данни за незавършена

миелинизация, както и атрофични промени на двете мозъчни хемисфери. Към днешна дата при детето не се наблюдава прогрес в развитието: не седи, няма опора, обръща се до странично положение, наблюдават се клонуси в краката, не гука, не следи, не фиксира с поглед.



Фигура 23. Схематично изображение на регион 2q24.1q24.3 и 2q24.3q31.1 при пациенти ЕР437 и ЕР539 съответно. Червените правоъгълници обозначават делетираните участъци при ЕР437 и ЕР539. Със **червено** са оградени сигурно патогенните гени, а в **зелено** тези, имащи потенциална роля в формиране на комплексния болестен фенотип при пациент ЕР437. Адаптирана от UCSC Genome Browser (https://genome.ucsc.edu).

Двете делеции засягат различни хромозомни райони (q24.1q24.3 при ЕР437 и q24.3q31.1 при ЕР539), но съществува критичен район на припокриване между тях, съдържащ SCN- генния клъстер (Фигура 23). Гените *SCN1A* (OMIM: 182389), *SCN2A* (OMIM: 182390), *SCN3A* (OMIM: 182391) и *SCN9A* (OMIM: 603415) кодират различни субединици на потенциал - зависими Na+ канали, разположени в мембраната на невроните и отговорни за генерирането и разпространението на нервния импулс. Хетерозиготни мутации в тези гени са причина за изява на различни форми на епилепсия и епилептични синдроми.

По литературни данни се касае за 2q24 микроделеционен синдром (епилептична енцефалопатия) с различно изразена клинична симптоматика - епилептични пристъпи, микроцефалия, дисморфични белези, цепки на небцето, очни аномалии (колобома на ириса, катаракта и микрофталмия), изоставане в растежа, ИД, сърдечни дефекти, аномалии на крайниците, аутистични прояви и други (Traylor et al., 2012; Belengeanu et al., 2014). Характерно за 2q24 синдрома, а и за микроделеционните и микродупликационни синдроми по принцип, е

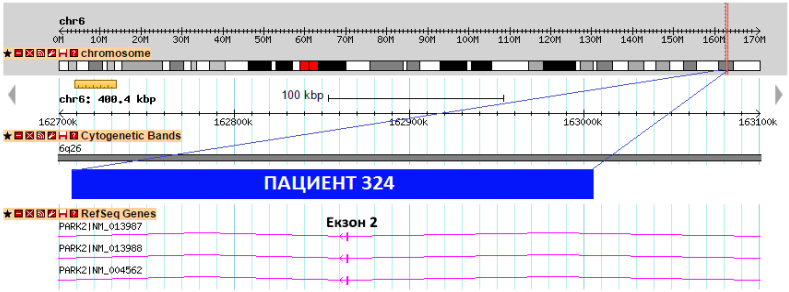
изключителната вариабилност на фенотипа в зависимост от големината на засегнатия участък и гените, включени в него. В този смисъл, въпреки факта, че се засяга един и същи регион от дългото рамо на хромозома 2 в двата случая, се наблюдава известна разлика в тежестта на фенотипа. Пациент EP539, заедно със структурните измененения в мозъка и изоставането в НПР, не показва клиника на малформативен синдром, за разлика от пациент EP437. Това би могло да се дължи както на по - малкия размер на делецията, така и на съдържанието на специфични гени в засегнатия регион. Делецията при EP437 е по - голяма и освен SCN- клъстера от гени, недостатъчната доза от чийто продукти е отговорна за изявата на рефрактерната епилепсия, са засегнати допълнително и няколко гена с потенциална роля в болестния фенотип, които биха могли да са причина за изявата на допълнителните синдромни характеристики, наблюдавани при EP437 (Фигура 23): *TBR1* (OMIM: 604616), *SLC4A10* (OMIM: 605556), *KCNH7* (OMIM: 608169), *DPP4* (OMIM: 102720), *GCG* (OMIM: 138030), *IFIH1* (OMIM: 606951), *FIGN* (OMIM: 605295).

С оглед на генното съдържание, големината на намерените делеции в 2q24 региона и асоциацията им с добре познат микроделеционен синдром може да се твърди, че те са генетичната причина за заболяването при пациенти EP437 и EP539.

- **Интрагенна дупликация arr[hg19] 6q26(162,707,603-163,050,403)x3 при пациент EP324**

При пациент EP324, 17-годишно момче с данни за фамилна обремененост за епилепсия открихме 343 Кб интрагенна дупликация в 6q26 региона, засягащ екзон 2 от *PARK2* гена (Фигура 24). Пациентът показва рефрактерни ГТКП, абсанси, миоклонични, миоклонично-астатични. Има тежък ИД, пълна липса на говор, аутистични черти, както и моторни стереотипии, слаб мускулен тонус, има краниофациален дисморфизъм и предна капилярна ангиоматоза. Генът *PARK2* кодира Паркин Е3 убиквитин лигаза, високо експресирана при редица невронални процеси в различни области на мозъка. Досега са известни четири *PARK2* дупликации, докладвани в литературата. Всички те са намерени при пациенти с взаимно припокриващ се фенотип, засягащ развитието на нервната система (Scheuerle et al., 2011; Mariani et al., 2013; Palumbo et al., 2016; Yin et al., 2016). Клиничните характеристики при пациент EP324, които се припокриват с тези, докладвани по литературни данни са забавено общо развитие (5/5), дисморфични стигми (4/5), забавено психомоторно развитие/ умствено изоставане (5/5), хипотония (4/5), задръжка в развитието на речта (4/5), аутистични черти (3/5), стереотипии (2/5), и

епилепсия (2/5). Три от докладваните дупликации са унаследени от здрава майка, което предполага непълна пенетрантност на заболяването (Scheuerle et al., 2011; Mariani et al., 2013; Palumbo et al., 2016). В един пациент с аутизъм дупликацията се унаследява от болен баща (Yin et al., 2016), докато в нашия случай тя липсва при родителите.

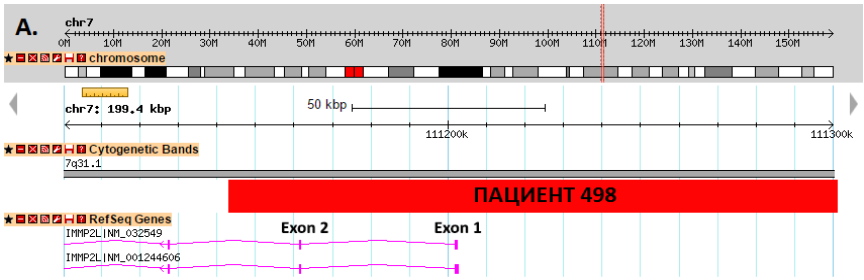


Фигура 24. Схематично изображение на регион 6q26, включващ част от *PARK2* гена; синият правоъгълник обозначава дуплицирания участък, засягащ екзон 2 при пациент EP324. Адаптирана от Database of Genomic Variants (DGV).

Пациенти с подобен размер дупликации са докладвани в DECIPHER базата - данни (https://decipher.sanger.ac.uk/; пациенти: 279606, 264250, 279450, 279451, 292668). Всички те имат аутизъм, ИД, стереотипно поведение и нарушен говор. Така, нашите данни подкрепят предложената хипотеза за откриване на нов микроделеционен/дупликационен синдром, дължащ се основно на промени в броя копия (CNVs), засягащи *PARK2* гена (Scheuerle et al., 2011; Mariani et al., 2013).

- **Хомозиготна делеция arr[hg19] 7q31.1(111,194,597-111,333,959)x0 при пациент EP498**

При момиче на четири години беше открита 139 Кб хомозиготна делеция в район 7q31.1, засягаща първите два екзона на *IMMP2L* гена (Фигура 25). Пациент EP498 е с рефрактерни ГТКП, лека фронтална корова атрофия, микроцефалия, лицеви дисморфизми, стереотипии и поведенчески проблеми (агресия и автоагресия, ADHD), задръжка в развитието на речта и намален мускулен тонус, атаксия. Липсва фамилна обремененост.



Фигура 25. Схематично изображение на регион 7q31.1, включващ част от *IMMP2L* гена; червеният правоъгълник обозначава делетиралия участък, засягащ първите 2 екзона при пациент EP498. Адаптирана от от Database of Genomic Variants (DGV).

Генът *IMMP2L* (OMIM: 605977) кодира една от субединиците на мембранна пептидаза, част от голям протеинов комплекс, с роля в процесирането на незрели аминокиселинни секвенции на ядрено - кодирани белтъци, насочени за импорт в митохондрия. Интрагенни делеции с размер между 150 Кб и 370 Кб, засягащи същите екзони, както в нашия случай, са намерени при пациенти с комплексни неврологични характеристики, включващи освен епилепсия, задръжка в развитието на речта и моторни проблеми, както и ADHD (Elia et al., 2010; Gimelli et al., 2014). В допълнение, проведени са експерименти с *IMMP2L*$^{-/-}$ миши модели, показващи редуциран потенциал за процесиране на белтъчни субстрати в мозъчна тъкан при липсваща функция на пептидазата (Lu et al., 2008). Това би могло да доведе до повишена продукция на супероксидни радикали като резултат от хиперполяризацията на вътрешната митохондриална мембрана и последващо отделяне на про-апоптични белтъци с последваща клетъчна смърт и развитие на атаксия и хипоплазия на церебелума (Lu et al., 2008; Ma et al., 2011). Скорошно проучване показа, че изключването на *IMMP2L* гена води до нарушена експресия на няколко други гена, участващи в развитието на ЦНС и това може да е причина за наблюдавания фенотип при пациенти, при които няма работещи копия от митохондриалната пептидаза в резултат от мутации в *IMMP2L* гена (Gokoolparsadh et al., 2017).

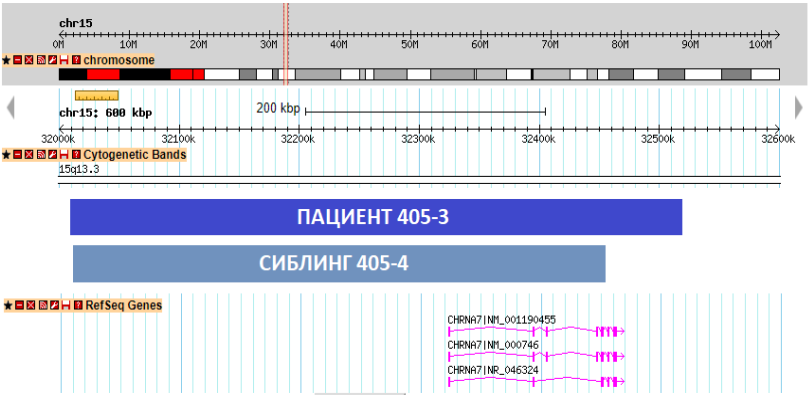
С оглед на литературните данни и факта, че делецията на *IMMP2L* гена е в хомозиготно състояние, би могло да се твърди че тя е генетичната причина поне за част от симптоматиката при пациент EP498.

4.4.2.2. Аберации с неясно клинично значение и вероятно патогенен ефект

- **Дупликация arr[hg19] 15q13.3(32,016,364-32,514,980)x3 при пациент EP405**

Момиче на 12 години с изява на епилептичен синдром и изоставане в НПР. Микрочиповият анализ идентифицира 499 Кб дупликация в 15q13.3 района, засягаща целия *CHRNA7* ген (OMIM: 118511) (Фигура 26, EP405-3). Пациент EP405 е с изоставане в НПР, рефрактерни ГТКП, не ходи, не е имала говор. Допълнително се наблюдават високо небце, изразена хипермобилност на ставите, генерализирана мускулна хипотония, поради която е невъзможен самостоятелен стоеж. Дупликацията беше открита и при по - големия брат на 17 години, показващ сходни клинични характеристики: изоставане в НПР, епилептичен синдром, липса на реч, без развита походка, високо небце, изразена хипермобилност на ставите, генерализирана хипотония, ротиран гръден кош, долихоцефалия. За разлика от EP405, при него дупликацията е с по - малък размер (423 Кб) и засяга първите четири екзона от *CHNRA7* гена (Фигура 26, EP405-4).

Генът *CHRNA7* кодира алфа субединицата на никотинов холинергичен рецептор, екпресиращ се предимно в GABA - инхибиторните интерневрони, в хипокампуса и стриатума. Проксималният регион 15q11-14 се характеризира с наличието на множество нискокопийни повторени последователности (LCR- Low Copy Repeats) с висок процент на хомология, които оформят няколко точки на счупване (BP) и правят региона изключително нестабилен (Szafranski et al., 2009). Дупликации с размер между 350 и 680 Kb, разположени между същите точки на счупване BP4 и BP5, са намерени както в здрави контролни индивиди и асимптоматични родители, така и при множество пациенти с разнообразен невропсихиатричен фенотип - ИД, общо забавяне в развитието, както и мускулна хипотония, поведенчески проблеми и аутистични стигми, при които дупликацията е класифицирана като вариант с неясна клинична значимост (Киров, 2013, Kirov et al., 2013; Helbig et al., 2009; Szafranski et al., 2009). Съществува случай и на трипликация, засягаща *CHRNA7* с подобен размер като този в нашия случай, сегрегираща в три поколения с невросихиатрични проблеми и поведенчески нарушения (Soler-Alfonso et al., 2014). Всички тези данни показват, че е възможно висока доза от продукта на *CHRNA7* гена да нарушава нормалното функциониране на синаптичната комуникация между невроните. Допълнително, съществува предположение за ролята на *CHRNA7* дупликации в изявата на дефекти в развитието на устните и небцето (високо небце, цепки на устната) (Xie, 2015). При пациент EP405 и нейния брат също се наблюдава високо небце.



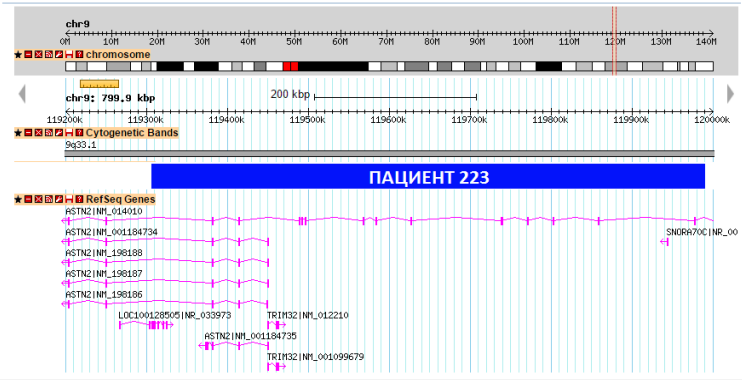
Фигура 26. Схематично изображение на регион 15q13.3, включващ ген *CHRNA7*. Сините правоъгълници обозначават дуплицираните участъци при пациент EP405-3 (тъмно синьо) и нейния брат – EP405-4 (светло синьо). Адаптирана от Database of Genomic Variants (DGV).

При пациенти с дупликация на *CHRNA7* обаче, епилепсията не е често срещана клинична характеристика, въпреки, че съществуват съобщени случаи на ГГЕ с дупликации, засягащи този ген (Киров, 2013; Kirov et al., 2013). В базата - данни DECIPHER има множество докладвани случаи на подобен размер и локализация дупликации, за които има противоречива информация – класифицирани като по - скоро непатогенни, с неясна клинична значимост или вероятно патогенни.

Възможно е дупликацията да е отговорна за изявата на ИД, високото небце, мускулната хипотония при EP405 и нейния брат, но не може да обясни епилептичния синдром, наблюдаван и при двамата сиблинги. Поради противоречивите данни в световната литература и бази - данни относно патогенността на откритата дупликация, както и според препоръките на ACMG (Kearney et al., 2011), тя беше класифицирана като вероятно патогенен вариант с неясна клинична значимост.

- **Дупликация arr[hg19] 9q33.1(119,303,085-119,990,036)x3 при пациент EP223**

При пациент EP223 микрочиповият анализ детектира 0.687 Мб дупликация в 9q33.1 региона. Дупликацията засяга целия *TRIM32* ген и част от екзоните на *ASTN2* гена (Фигура 27).



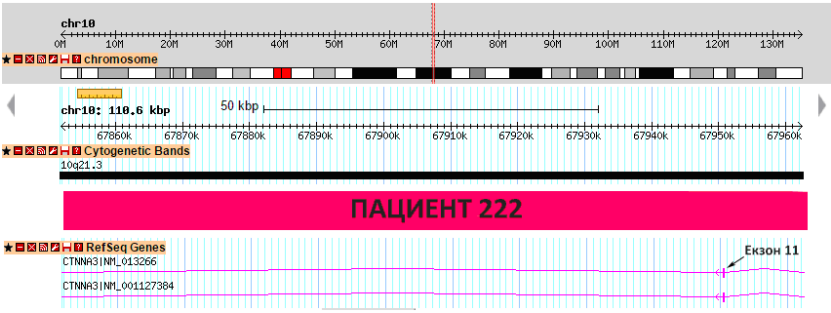
Фигура 27. Схематично изображение на регион 9q33.1, включващ част от *ASTN2* и *TRIM32* гените; синият правоъгълник обозначава дуплицираля участък, засягащ част от *ASTN2* гена и целия *TRIM32* ген при пациент EP223. Адаптирана от Database of Genomic Variants (DGV).

Пациент EP223 е момче на 14 години с диагноза ИГЕ/ГГЕ и епилептични синдроми, с фамилна анамнеза за епилепсия при баща и баба по бащина линия. Поради липса на материал от родствениците не проведохме сеграционен анализ. Пациентът има изява на ГТКП и вероятно абсансни пристъпи, лек ИД, данни за наднормено тегло, по - големи ниско разположени ушни миди, хиперпигментация вляво на гърба и мекотъканна формация на бедрото вдясно. Секвенционният анализ на *SLC2A1* гена не показа наличие на патогенни точкови варианти. Генът *TRIM32* кодира убиквитин лигаза, част от по - голяма убиквитин - лигазна система, отговорна за деградацията на редица белтъци. Хомозиготни мутации в този ген са асоциирани с АР заболявания като мускулна дистрофия на пояса и крайниците (OMIM: 254110) и синдром на Bardet - Biedel (OMIM: 615988). Генът *ASTN2* кодира белтък астротактин, играещ ключова роля в развитието на мозъка при бозайниците чрез формиране на връзки между невроните и астроглиалните клетки в малкия мозък, кортекса и хипокампуса, медиирайки невроналната миграция в тези области. Генът *TRIM32* е разположен в противоположна ориентация в рамките на интрон на по - големия *ASTN2* ген (Фигура 76) и вариации в броя копия, засягащи двата гена са определени като рискови фактори за развитие на невро-когнитивни разстройства, каквито са ADHD, аутизъм, ИД, епилепсия, шизофрения и други (Lionel et al., 2013, Wang et al., 2010). Въпреки припокриването на част от фенотипа със синдрома на Bardet - Beidel, в литературата няма описани случаи на дупликации, засягащи *TRIM32*, които водят до развитието на синдрома. Затова, по - скоро дозова

чувствителност на *ASTN2* гена е отговорна за лекия ИД и епилепсията, наблюдаващи се в нашия случай. За да се обясни целия спектър от клинични симптоми, е необходимо да се проведе друг широкообхватен метод, какъвто е екзомното секвениране, с цел да се потърсят сигурно патогенни точкови варианти в гени, имащи отношение към наблюдавания фенотип при пациент EP223.

- **Хетерозиготна делеция arr[hg19]10q21.3 (68,181,834- 68,292,471)x1 при пациент EP222**

При момче на 12 години с диагноза редки ГТКП и умерен към тежък ИД беше открита хетерозиготна делеция, засягаща екзон 11 от *CTNNA3* гена, разположен в хромозомен район 10q21.3 (Фигура 28). Пациент EP222 към момента има диагностицирана умерена степен на ИД. Говор липсва, наблюдава се анартрия. Показва и агресивно поведение, стереотипни движения, има страхови изживявания. Съществува фамилна история за епилепсия: майка и по - малък брат с единичен FS на около 1-годишна възраст. Не разполагахме с материал от родителите за проследяване на носителския статус.



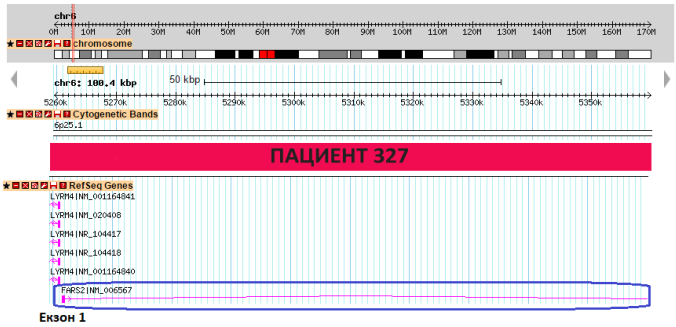
Фигура 28. Схематично изображение на регион 10q21.3, включващ част от *CTNNA3* гена; червеният правоъгълник обозначава делетиралия участък, засягащ екзон 11 при пациент EP222. Адаптирана от Database of Genomic Variants (DGV).

Генът *CTNNA3* кодира алфа катенин (кадхерин - свързващ белтък), който представлява клетъчно - адхезионна молекула, играеща роля основно в междуклетъчните контакти на мускулните клетки. *CTNNA3* е вероятен кандидат ген за епилептична енцефалопатия от типа на Landau Kleffner синдром (Lesca et al., 2012; Allen et al., 2015). В друго изследване се открива хетерозиготна

делеция, засягаща екзон 11 на *CTNNA3* при случай на разстройство, свързано с аутистичния спектър, ненамерена досега в над 6000 здрави контроли. Авторите установяват, че катенина има 95% идентичност между човек и мишка, и че *CTNNA3* гена показва най - висока експресия в хипокампуса и кората на мозъка (Bacchelli et al., 2014). Делецията, намерена при нашия пациент също засяга екзон 11 от *CTNNA3* гена. Това ни дава основание да смятаме, че тази аберация има отношение към аутистичния фенотип, който пациент ЕР222 проявява.

- **Хетерозиготна делеция arr[hg19] 6p25.1(5,259,570-5,359,994)x1 при пациент ЕР327**

Чрез микрочипов анализ беше открита 100 Кб делеция в район 6p25.1, засягаща *FARS2* гена (Фигура 29), унаследен от здравата майка. Пациент ЕР327 е 9-годишно момче с диагноза миоклонично-астатични пристъпи и ГТКП с терапевтична резистентност. Интелектуалното функциониране е в границите на тежкото изоставане (IQ<30), той е необучаем. В неврологично отношение е с невъзможна самостоятелна, атактична походка, прави впечатление за апраксия. Наблюдават се и микроцефална конфигурация на главата, както и хипертрихоза. КТ данните показват леко разширени субарахноидни пространства.



Фигура 29. Схематично изображение на регион 6p25.1, включващ част от *FARS2* гена; червеният правоъгълник обозначава делетиралия участък, засягащ екзон 1 при пациент ЕР222. Адаптирана от Database of Genomic Variants (DGV).

Генът *FARS2* кодира ензима митохондриална фенилаланин - тРНК синтетаза клас II, катализираща свързването на активираната аминокиселина към специфичната за фенилаланин транспортна РНК по време на транслацията. Хомозиготни и двойно хетерозиготни мутации в този ген са причина за изява на

синдроми на Alpers и комбиниран дефицит на окислителното фосфорилиране - 14 (COXPD14) (OMIM: 614946). Подобен размер (88 Кб) делеция, засягаща част от *FARS2* гена е намерена при пациент с тежка епилептична енцефалопатия с последващ регрес в интелектуалното развитие и атрофия на кората на малкия мозък (Almalki et al., 2014). Описаните клинични характеристики се припокриват с тези, наблюдавани при пациент EP327, но съществено се различават от по - комплексните синдроми, свързани с по- големи делеции в 6p25.1 (> 500 Kb). Възможно е, заради по - малкия размер на делецията в нашия случай и този, докладван от Almalki и съавтори, да се оформя отличителен болестен фенотип, включващ епилептични пристъпи като водещ симптом, в комбинация с ИД. Освен този случай, съществуват още три докладвани пациента с делеции с подобен размер и ЯМР аномалии, епилепсия и изоставане в развитието, всички унаследени от майка (Vernon et al., 2015; Raviglione et al., 2016). Всички докладвани делеции обаче се откриват в комбинация с допълнителна точкова мутация в *FARS2* гена.

Поради липсата на литературни данни за болестния ефект на хетерозиготни мутации в *CTNNA3* и *FARS2* гените, описаните едно-екзонни делеции не са достатъчни, за да се обясни клиничния фенотип на пациенти EP222 и EP327. От друга страна, сравнителния анализ на случаите, описани в литературата и нашите пациенти показа, че всички имат сходни клинични характеристики. За да се провери дали EP222 и EP327 са двойно-хетерозиготни носители на дефекти в двата гена, беше проведен секвенционен анализ на кодиращите последователности на *FARS2* и *CTNNA3* гените, но не бяха открити патогенни точкови варианти в нито един от тях. Все пак, с оглед на припокриващия се фенотип на нашите пациенти с тези, описани в литературата, е възможно те да имат допълнителна мутация в друг ген, свързан с нормалното невропсихично развитие. За да се провери тази вероятност, е необходимо да се приложи по - широкообхватен метод, каквито са таргетното или цялостното новогенерационно секвениране на голям брой гени, което би могло да се осъществи в рамките на бъдещ проект.

- **Хетерозиготна делеция arr[hg19] 15q22.31(64,242,830-65,570,262)x1 при пациент EP409**

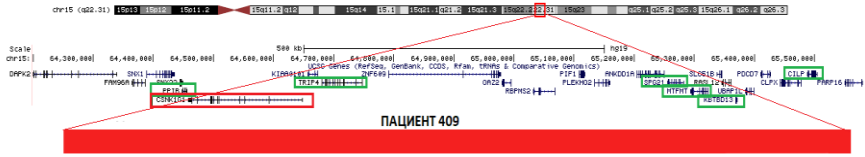
Момче на 16 години, с изява на комплексни парциални пристъпи и от 3-годишна възраст без отговор към лечението с различни антиконвулсанти. Има умерен ИД, ADHD, прояви на агресия, конвергентен страбизъм в ляво,

невротични тикове. КТ данните показват калцификати в лява малкомозъчна хемисфера. Пациентът беше изследван за мутации в *SCN1A*, в който не се откриха патогенни варианти. Микрочиповият анализ разкри хетерозиготна делеция с неясен клиничен ефект с размер 1.32 Mbp, засягаща 15q22.31 региона (Фигура 30). Делецията не сегрегира с болестния фенотип в семейството - не беше открита при майката, също с история за епилепсия. Майката е имала ГТКП в детството, но не показва допълнителни невропсихологични нарушения, в сравнение с EP409. Това би могло да се дължи на допълнителен генетичен вариант, недетектируем с микрочиповата технология, който да допринася за епилептичния фенотип в семейството. В този смисъл, наблюдаваната делеция би могла да влияе върху фенотипа на принципа на двойния удар, като го влошава и води до развитието на ИД допълнителните синдромни черти, които EP409 показва.

Делеция с такъв размер и локализация не се открива при здрави контролни индивиди в DGV базата – данни. Тя засяга 16 OMIM гена (616567, 601272, 123841, 606274, 610696, 604501, 617474, 604152, 610953, 608181, 6111766, 612085, 613727, 608138, 6156611, 603489), шест от които са асоциирани с болестен фенотип. Два гена са свързани с АР (*ACP33*, OMIM: 608181; *TRIP4*, OMIM: 604501) и един ген с АД (*KBTBD13*, OMIM: 613727) мускулни заболявания. Два други гена, засегнати от аберацията са асоциирани с абнормен скелетен фенотип, също неприсъстващ при нашия пациент: *PPIB* (OMIM: 123841) и *CILP1* (OMIM: 603489). При пациент EP409 не се наблюдават нарушения в нормалната функция на мускулите, както и скелетни нарушения, тези гени по - скоро нямат съществена роля във формиране на фенотипа при EP409.

От друга страна, недостатъчната доза от продукта на друг ген, *CSNK1G1* (OMIM: 606274), засегнат от делецията вероятно играе роля във формирането на клиничните характеристики при нашия пациент (Фигура 30, червено ограден ген). Несинонимна *CSNK1G1* мутация е намерена при случай с епилепсия, микроцефалия и забавяне в развитието (Martin J et al., 2014). Генът *CSNK1G1* кодира казеин – киназа 1 (CK1) и някои от изоформите му са високо експресирани в няколко мозъчни района при мишки, включително и стриатума - район, свързан с движението и мотивационно - базираното поведение. В мозъка CK1 играе роля в поддържането на правилната глутаматаергична синаптична трансмисия чрез отрицателна регулация на NMDA (N- метил- D - аспартат) рецепторите. Така, при отсъствие на едно копие от *CSNK1G1* гена е възможно да се повиши NMDA медиираната глутаматергична нервна възбудимост и като резултат - нарушения в поведението и мисловната дейност,

характеристики, наблюдавани при ЕР409. В допълнение, продължително активирано състояние на NMDA рецепторите води до глутаматна токсичност за клетката, което е възможно да причини клетъчна смърт в резултат от повишени нива на Ca^{2+} в нея (Hardingham и Bading, 2003). С оглед на наличието на калцификати в лява малкомозъчна хемисфера, наблюдавани чрез ЯМР при пациент ЕР409, очевидно се касае за разстройство в калциевия метаболизъм. Въпреки това, точния патомеханизъм все още не е известен и публикуването на допълнителни мутации в *CSNK1G1* при пациенти с подобен фенотип, както и проучвания върху моделни организми ще спомогнат за определяне ролята на този ген в патогенезата на заболяването.

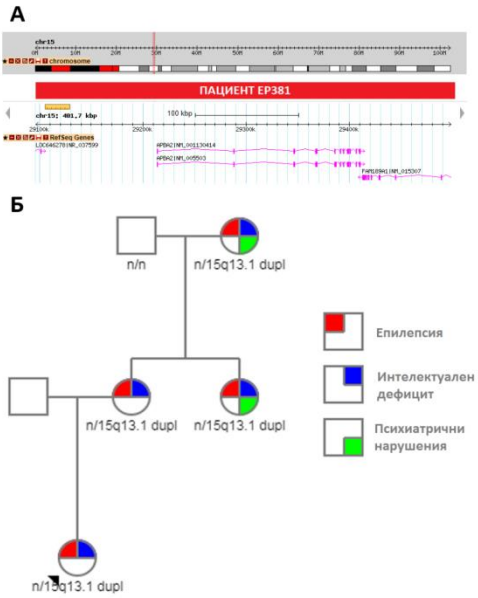


Фигура 30. Схематично изображение на регион 15q22.31 при пациент ЕР409. Червеният правоъгълник обозначава делетиралия участък при пациент ЕР409. Със червено е ограден гена с най - голяма вероятност за участие във формиране на фенотипа, а в зелено тези, асоциирани със заболявания от различен тип, но несъвпадащи с клиничните симптоми при ЕР409. Адаптирана от UCSC Genome Browser (https://genome.ucsc.edu)

- **Дупликация arr[hg19] 15q13.1(29,096,386-29,498,094)x3 при пациент ЕР381**

Момче на 7-годишна възраст от турски произход и диагноза ИГЕ/ГГЕ. На три години има изява на два последователни ГТКП по време на сън. Детето е с изоставане в НПР от раждането и в момента има тежък ИД, както и липсва говор. Соматичният статус включва микроцефалия, къс филтрум, а в неврологично отношение: понижен мускулен тонус. Съществува фамилна обремененост по майчина линия с АД унаследяване: освен епилепсията, майката има лек ИД; сестра на майката и баба по майчина линия с епилепсия в юношеска възраст и различен по тежест ИД с вероятни психични отклонения. Секвенционният анализ на *SCN1A* гена не доведе до идентифицирането на патогенен вариант. Затова проведохме микрочипов анализ, чрез който открихме 402 Кб дупликация 15q13.1 региона, засягащ изцяло ген *APBA2* (Фигура 31А).

Дупликацията сегрегира с болестния фенотип в семейството - открива се при болна майка, нейната сестра, както и при баба по майчина линия. Всички засегнати членове на семейството имат различен по тежест ИД, история за пристъпи и психиатрични нарушения. Дупликацията не беше намерена при клинично здравия дядо по майчина линия (Фигура 31Б).



Фигура 31. А. Схематично изображение на регион 15q13.1, включващ *APBA2* гена; червеният правоъгълник обозначава делетиралия участък при пациент ЕР222. Адаптирана от Database of Genomic Variants (DGV). **Б.** Родословно дърво на семейство 381, с означен носителски статус при изследваните членове. Със стрелка е показан индексния пациент ЕР381-3 в семейството.

Генът *APBA2* е разположен между горещи точки на счупване BP3 и BP4 в 15q13.1 региона, характеризиращи се с висока степен на нестабилност, в които се случват много делеционни и дупликационни събития, асоциирани с разстройства от аутистичния спектър и ИД (Sutcliffe et al., 2003). В допълнение, цялостно генни дупликации на *APBA2* са асоциирани с шизофрения с ранно начало (Kirov et al., 2007) и аутизъм (Babatz et al., 2009; Avdjieva-Tzavella et al., 2012). Досега няма описан случай на епилепсия в литературата, носещ дупликация на *APBA2* гена. Продуктът на *APBA2* - Mint-2 протеина представлява амилоид бета прекурсор свързващ протеин- неврон- специфичен адапторен

белтък. Mint-2 директно се свързва с неурексините и синтаксин 1 и така участва във функционалността на един по - голям мултипротеинов SNARE комплекс, отговорен за нормалното свързване и фузия на синаптичните везикули с клетъчната мембрана по време на невротрансмисията (Dulubova et al., 2007).

Базирайки се на функцията на Mint-2, *APBA2* се явява кандидат ген за аутизъм. В допълнение, експерименти с миши модели показват, че по - голямата част от *APBA2*$^{-/-}$ нокаут мишките умират, а тези, които оцеляват показват неконтролируемо отделяне на невротрансмитерни молекули в пресинаптичното пространство, както и понижена синаптична сила (Ho et al., 2006). Следователно, повишена експресия на *APBA2* гена би могла да е отговорна за поне част от клиничните характеристики (ИД и психиатрични нарушения), наблюдавани при пациент EP381, както и при неговите родственици.

Настоящият дисертационен труд представлява първата оценка чрез микрочипов анализ на кохорта от пациенти с епилепсия и допълнителни невропсихиатрични проблеми в рамките на нашата страна. Преди това, две работни групи провеждат подобно проучване при група пациенти с болести от аутистичния спектър, вродени аномалии и забавяне в развитието, но без данни за епилептични пристъпи (Avdjieva-Tzavella et al., 2012, Mihaylova et al., 2017). Досега са открити микроделеции при два изолирани случая на български пациенти с ИГЕ/ГГЕ, засягащи отделни части от *SCN1A* гена, идентифицирани чрез други методи (Suls et al., 2010, Kirov et al., 2013).

Сравнителната оценка на диагностичния добив от хромозомен микрочипов анализ при пациенти с невропсихични проблеми и вродени аномалии между проучванията на различни изследователски групи показа, че има съществени различия в процента на откриваемост на патогенни аберации, независимо от използваната микрочипова платформа и броя изследвани пациенти. Възможно е тези несъответствия да са резултат от множество фактори, като различни критерии на селекция, различна класификация на намерените CNVs, включването на контролни групи, както и предварителното изключване на големи геномни пренареждания или точкови мутации чрез използването на други методи.

В нашето проучване ние подбрахме пациентите си на базата на два основни критерия: непровокирани епилептични пристъпи и ИД. Част от тях показват допълнителни поведенчески и моторни нарушения, както и общи и лицеви дисморфизми. Някои от пациентите бяха предварително скринирани за наличие на точкови мутации или малки инсерции/делеции в *SCN1A*, с оглед на

наподобяващия клиничен фенотип на ГГЕ от спектъра на GEFS+ синдрома. При друга част от пациентите проведохме секвениране и MLPA анализи на *SLC2A1* гена с цел да се изключи хетерогенната епилептична енцефалопатия GLUT1-DS (Таблица 8). Наблюдаваният диагностичен добив (8.6%) от микрочиповия анализ е в съответствие с този, докладван по литературни данни в кохорти пациенти с епилепсия, изоставане в развитието/ИД (Kashevarova et al., 2013, Hrabik et al., 2015), пациенти със симптоматична епилепсия и мозъчни аномалии (Howell et al., 2013, Wincent et al., 2015), както и кохорти с генетична генерализирана епилепсия (ГГЕ), епилептични енцефалопатии в комбинация с ИД (Mefford et al., 2010, Mefford et al., 2011, Allen et al., 2015). Подобно на нашата група, тези пациенти са подбрани без предварително проведен кариотипен анализ за изключването на големи геномни пренареждания и използването на строги критерии за селекция. Въпреки това, някои изследователски групи използват по - строги критерии, които са дефинирани от конкретната лаборатория (Iourov et al., 2012, Uwineza et al., 2014), а други (D'Arrigo et al., 2015, Sharma et al., 2016) използват de Vries стойността за определяне на селекционни параметри (De Vries et al., 2001). Очевидното при резултатите от тези проучвания е, че диагностичните добиви са съвместими едни с други, когато са приложени еднакви или сходни подходи за подбиране на пациентите. При всички тях диагностичния добив е значително по - висок, сравнен с този в настоящото проучване (между 12% и 28%).

В допълнение, други работни групи използват филтър на преселекция на пациентите си чрез предварителното им скриниране за големи и добре охарактеризирани геномни пренареждания, използвайки методи като кариотипен анализ или MLPA (Quintela et al., 2017, Sansovi et al., 2017). При всички тях отново се наблюдават сходни диагностични добиви, по - високи от наблюдавания при нашата кохорта (между 11% и 15.6%). В нашият случай бяха изключени пациентите, които имат точкови мутации в двата гореспоменати гени, но не беше проведен кариотипен анализ. Въпреки това се оказва, че диагностичният добив на настоящо - изследваната група е почти еднакъв с този, наблюдаван при пациенти с ГГЕ, епилепсия с ИД (Mefford et al., 2010, Mefford et al., 2011 - 8.9% и 7.9% съответно) или изолиран ИД (Sagoo et al., 2009 – 10% с доверителен интервал 8 - 12%). Сравнителният анализ между отделните проучвания води до заключението, че основния фактор, повлияващ наблюдаваната честота на откриваемост на патогенни варианти в текущото проучване са сравнително свободните критерии на селекция, които приложихме, както и критериите за класификация на намерените варианти. Тук ние съобщаваме само патогенните и вероятно патогенните варианти,

определени като такива съгласно препоръките на ACMG за класификация на варианти в броя копия (CNVs) (Kearney et al., 2011).

Следователно, за сравнителни изследвания, както и за целите на клиничната практика е важно да се създадат универсални критерии за селекция на групи пациенти със сходен клиничен фенотип, както и критерии за класификация и интерпретация на клинично – значими CNVs.

4.5. Изграждане на диагностичен алгоритъм при пациенти с различни форми на епилепсия, или неизяснена диагноза, включваща епилепсия в комбинация с интелектуален дефицит и други вродени аномалии

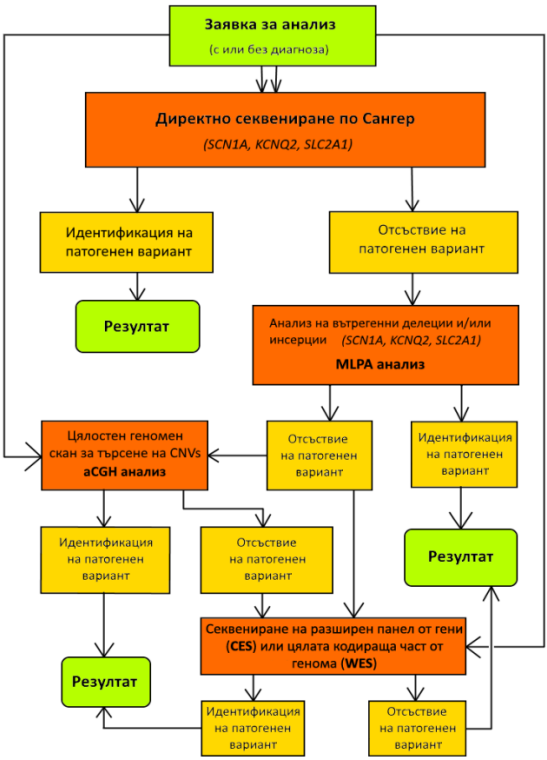
В резултат от настоящият дисертационен труд успяхме да изградим диагностичен системен ход, при който, в зависимост от насочващата диагноза, съществуват няколко подхода (Фигура 32).

Първи подход е секвенирането на цялата кодираща част чрез метода на Сангер на съответния, асоцииран с конкретен електро-клиничен синдром ген, каквито в този случай са *SCN1A*, *SLC2A1* и *KCNQ2*. Генът *SCN1A* е мутирал с висока честота при пациенти със съмнение за епилепсия от спектъра на GEFS+ и неговата по – тежка форма на EE – синдром на Dravet (*SCN1A* ген). При наличие на абсансни пристъпи в ранна детска възраст с или без допълнителни невропсихологични проблеми и вродени аномалии като микроцефалия, различна степен на ИД, моторни нарушения и/или абнормни биохимични показатели (лактат и/или CSF концентрация на глюкоза), при съмнение за генерализирани абсансни епилепсии с вариабилна възраст на начало или GLUT1-DS се започва със секвениране по Сангер на кодиращата част на *SLC2A1* гена. При наличие на непровокирани тонични и тонично – клонични епилептични пристъпи през първите месеци от живота на новороденото с фамилна история за епилепсия и съмнение за бенигнена неонатална епилепсия се извършва секвенционен анализ на *KCNQ2* гена.

В случай на отсъствие на патогенен вариант, но със съмнение за същата диагноза би могло да се премине към таргетен анализ за промени в броя копия, CNVs (делеции или дупликации), засягащи един или няколко екзона на същия ген (Фигура 32). Методи за таргетна идентификация на CNVs са количествения PCR в реално време (qPCR), long range PCR или MLPA анализ.

В случай на отсъствие на патогенен вариант и с този подход, особено в случаите, когато освен епилепсия се наблюдават и допълнителни невропсихични проблеми, като ИД, аутистични стигми и поведенчески нарушения се прилагат по - широкообхватни методи, каквито са микрочиповия

анализ и таргетното екзомно секвениране на разширен панел от гени (Фигура 32).



Фигура 32. Системен ход за диагностика на различни на различни синдроми, включващи епилептични пристъпи в комбинация или без ИД и вродени аномалии.

Микрочиповите технологии са способни да детектират CNVs с изключително малък размер в цялата кодираща част на генома и в този смисъл са подходящи за търсене на копийни варианти, засягащи нови гени с потенциална роля в болестния фенотип. Във всички случаи, микрочиповия метод на сравнителна геномна хибридизация (aCGH) се определя като лесно приложим, бърз и точен за търсене на промени в броя копия на геномно ниво,

което го прави подходящ за рутинна работа в диагностичен аспект. В някои случаи, при неясна диагноза и наличие на тежък синдромен фенотип, включващ и вродени дефекти в различни органи и системи, би могло да се извърши директно микрочипов анализ като първи подход на изследване (Фигура 32). В нашето проучване ние приложихме директно микрочиповия метод при 39 пациента с ГГЕ, ИД, аутистични стигми, допълнителни дисморфизми и вродени аномалии (Таблица 8).

При неоткриване на патогенен вариант чрез гореспоменатите подходи, както и когато не съществува суспектна диагноза, би могло да се пристъпи към прилагане на секвенционните стратегии от ново поколение, каквито са анализът на разширен панел от гени, свързани с голям брой епилептични състояния (Clinical Exome Sequencing - CES) или екзомно секвениране (Whole Exome Sequencing - WES) на цялата кодираща част от генома (Фигура 32). Вторият подход дава възможност за откритие на нови гени с потенциална роля в болестния фенотип. В тези случаи обаче, са необходими допълнителни експериментални изследвания с цел доказване връзката генотип – фенотип, което не винаги е възможно в рамките на една лаборатория. Секвенирането от ново поколение чрез двата подхода при недиагностицираните пациенти със синдромно състояние в текущото изследване, както и при някои пациенти с рефрактерен електро-клиничен синдром ще бъдат обект на бъдещ научен проект.

5. Обобщение

Проведените молекулярно-генетични и геномни изследвания доведоха до изясняване на диагнозата при общо 21 пациента (10.1%) от селектираната група с разнообразни насочващи диагнози (n=208).

В резултат от секвенирането на цялата кодираща част на ген *SCN1A* ние открихме осем сигурно патогенни и четири вероятно патогенни варианта, засягащи 9% от общо-изледваната група пациенти (n=133). Пет варианта са от типа missense, три са сплайс-място мутации, два са nonsense и два варианта представляват frameshift делеции. Пет от откритите варианти са нови, непубликувани до този момент в литературата. От откритите мутации с клинично значение, позволяващи да се постави генетична диагноза са осем варианта с патогенен ефект при 9.8% от пациентите с епилепсия от GEFS+ спектъра (GEFS+ и DS пациенти n=82). Тази честота на откриваемост на патогенни точкови варианти е съизмерима с процента на *SCN1A* точкови мутации по литературни данни (~10%), открити при пациенти с епилепсия от GEFS+ спектъра (Marini et al., 2011, McTague et al., 2016). Варианти с вероятно патогенен ефект бяха намерени при четири пациенти от групата с епилепсии от GEFS+ спектъра (4.9%). Три от намерените точкови мутации, водещи до прекъсване на рамката на четене, водят до уточняване на диагнозата от DS при трима пациенти с насочваща диагноза GEFS+ синдром. Те, заедно с останалите генетично-верифицирани пациенти от подгрупа DS, съставляват от 69.2% от пациентите с поставена генетична диагноза DS чрез откритието на патогенен точков вариант в *SCN1A* гена в настоящото проучване (n=13). Това потвърждава наблюденията, че такъв тип мутации водят до изява на по- тежък епилептичен фенотип, отколкото missense мутациите. Освен това, процентът на откриваемост на *SCN1A* мутации при DS пациентите също е съизмерим с този, докладван по литературни данни при случаи на DS (~ 70-80%) (Marini et al., 2011).

В резултат от директното секвениране на *SLC2A1* гена, в настоящото проучване ние поставихме генетична диагноза на двама пациенти (4.8%) от изследваната група – един пациент с детска абсансна епилепсия и един пациент с тежък GLUT1-DS. И двата варианта са нови, непубликувани досега в литературните източници и бази-данни. Тази честота на откриваемост на точкови варианти е съизмерима с наблюденията на други автори (1-12%), вземайки предвид високата хетерогенност на изява GLUT1-DS синдрома (Suls et al.,2007; Arsov et al.,2012; Lebon et al., 2015). В допълнение, чрез микрочипов анализ открихме делеция на почти целия *SLC2A1* ген при дете с тежко синдромно състояние. Така, в резултат от прилагането на двата подхода

открихме два различни типа патогенни варианти, засягащи *SLC2A1* гена, като по този начин поставихме генетична диагноза синдром на GLUT1 дефицит.

В резултат от секвенирането на *KCNQ2* гена ние открихме два точкови варианта – един известен missense вариант и една сплайс-място мутация, и двата унаследени от болен баща. В допълнение, чрез MLPA анализ идентифицирахме цялостно-генна делеция на едното копие на *KCNQ2* гена, водеща в изява на класически BFNC. По този начин потвърдихме предполагаемата диагноза при трима пациенти със съмнение за BFNC (15.4%). Прилагайки двата подхода за анализ- MLPA и директно секвениране, ние идентифицирахме генетичната причина за изявата на BFNC фенотип при 23.1% от изследваната група пациенти. Честотата на откриваемост е по- малка от тази по литературни данни (~80-90%) (Singh et al., 1998; Zara et al., 2013) и вероятно се дължи на малкия брой случаи (n=13) с класически BFNC фенотип, които изследвахме.

В резултат от провеждането на MLPA анализ при на *SCN1A* и *SLC2A1* гените не успяхме да открием едно- или няколко екзонни делеции, засягащи тези гени при 15 пациента с ИГЕ или DS, негативни за точкови мутации в *SCN1A* гена и 13 със съмнение за GLUT1-DS и негативни за точкови мутации в *SLC2A1* гена. Този факт вероятно отчасти се дължи на малките извадки от пациенти (n=15, 13), а от друга страна потвърждава наблюденията, че големите екзонни делеции са рядка причина за изява на ИГЕ/ГГЕ, DS и GLUT1-DS, в сравнение с точковите мутации в *SCN1A* и *SLC2A1* (Leen et al., 2010; Marini et al., 2011; Yang et al., 2011; Arsov et al., 2012). Допълнително, поради хетерогенността на изява на GLUT1-DS се затруднява правилното клинично охарактеризиране и насочване за генетичен анализ, какъвто в настоящото проучване е случая с EP270 и намерената хетерозиготна делеция в *SLC2A1* чрез микрочипов анализ.

В резултат от прилагането на микрочиповия метод на сравнителна геномна хибридизация (aCGH) при 93 пациенти с неизяснено забавяне в развитието или интелектуален дефицит, епилептични пристъпи с или без допълнителни вродени аномалии открихме общо 23 аберации, 15 от които са от потенциален клиничен интерес (15.1%). Осем копийни варианти са генетичната причина за заболяването при 8.6% от селектираната група пациенти. Седем CNVs имат потенциална роля в оформянето на болестния фенотип при 7.5% от изследваната група пациенти. От тях два са нови варианти, засягащи различни райони от дългото рамо на хромозома 15 и неописани досега в литературните източници. Честотата на откриваемост и в тази група е съизмерима с намерената при кохорти с генетични генерализирани епилепсии, епилептични

енцефалопатии в комбинация с ИД и симптоматични епилепсии със структурно-мозъчни аномалии (Mefford et al., 2010; Allen et al., 2015; Wincent et al., 2015).

Така, в резултат от настоящия дисертационен труд, успяхме да изградим универсално-приложим диагностичен системен ход, включващ различни подходи, в зависимост от наличието или липсата на насочваща диагноза във всеки индивидуален случай на електро-клинично или по-комплексно сидромно състояние.

Изясняването на генетичните причини за генетичните генерализирани епилепсии и тежките разстройства в развитието на нервната система с неясна етиология ще доведе до по-точно генетично консултиране на семействата в бъдеще, както и повишаване на възможностите за ранна диагностика. В научен аспект, откритите и потвърдени микроаберации обогатяват световните бази-данни с геномни промени, характерни за българската популация и допринасят за по- ясното разбиране на молекулните патомеханизми, стоящи в основата на тези хетерогенни електро-клинични синдроми и комплексни болестни състояния.

6. Изводи

1. Секвенирането по Сангер е предпочитан първи метод за молекулярна диагностика при пациенти с различен тип електро-клинични синдроми, позволяващ в настоящото изследване изясняване значителен процент от случаите с епилепсия от GEFS+ спектъра, абсансни епилепсии и синдром на GLUT1 дефицит, както и случаи на бенигнени фамилни неонатални конвулсии.

2. Уточняването на генетичната диагноза синдром на Драве при 69.2% от изследваните случаи има важно значение за избора на правилна антиконвулсантна терапия.

3. Чрез MLPA анализ не бяха установени големи екзонни делеции в *SCN1A* и *SLC2A1* гените при пациенти с ИГЕ, синдром на Драве и абсансни епилепсии, което потвърждава данните от предишни проучвания, че такъв тип мутации са рядка причина за изява на тези видове епилепсии.

4. Микрочиповият метод на сравнителна геномна хибридизация е подходящ първи геномен подход за търсене на микроструктурни промени в хромозомите като причина за изява на комплексни синдромни състояния, включващи епилептични пристъпи в комбинация с интелектуален дефицит, други невропсихически нарушения и вродени аномалии.

5. В зависимост от насочващата диагноза при различните форми на епилепсия с или без допълнителни невропсихични нарушения е необходим различен диагностичен алгоритъм, включващ разнообразни молекулярно-генетични и геномни подходи, като сравнителна геномна хибридизация и секвениране от ново поколение.

6. Поради генетичната хетерогенност на идиопатичните генерализирани епилепсии и синдромните състояния при недиагностицираните пациенти е необходимо секвениране от ново поколение с цел поставяне на генетична диагноза.

7. Приноси

7.1. Приноси с научно - фундаментален характер

1.Открити са осем нови, неописани в литературата точкови мутации, засягащи *SCN1A*, *SLC2A1* и *KCNQ2* гените, с което се обогатява спектъра на известни мутации в публичните бази данни.

2. Открити са две нови, непубликувани микроструктурни хромозомни аберации, засягащи дългото рамо на хромозома 15 и свързани с болестния фенотип при пациенти с епилепсия, интелектуален дефицит и вродени аномалии.

7.2. Приноси с научно - приложен характер

1. Поставена е генетична диагноза при 21 пациента (10.1%), което дава възможност за избор на най – подходяща антиконвулсантна терапия, превенция или своевременно лечение на усложненията, прогнозиране на хода на болестта и изясняване на риска от унаследяване при бъдещи бременности.

2. Въведена е за първи път в България микрочиповата технология на сравнителна геномна хибридизация за откриване на микроструктурни геномни промени при пациенти с епилепсия и интелектуален дефицит.

3. Обогатена е съществуващата ДНК банка в Центъра по Молекулна Медицина с нови случаи на епилепсия или по - сложни синдромни състояния, които могат да бъдат основа за бъдещи научни проекти.

4. Изработен е системен подход за диагностика на различни типове епилептични състояния с или без необяснимо забавяне в развитието, интелектуален дефицит и вродени аномалии.

8. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

8.1. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Peycheva V**, Ivanova N, Kamenarova K *et al.*, 2016. Impact of KCNQ2 mutations in Bulgarian patients with electroclinical syndromes with onset in the first year of life. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 31(1):138-42.
IF – 1.227

2. Ivanova N, **Peycheva V**, Kamenarova K. *et al.*, 2018. Three novel SLC2A1 mutations in Bulgarian patients with different forms of genetic generalized epilepsy reflecting the clinical and genetic diversity of GLUT1-deficiency syndrome. Seizure. 54:41-4.
IF – 2.839

3. **Peycheva V**, Kamenarova K, Ivanova N *et al.*, 2018. Chromosomal microarray analysis of Bulgarian patients with epilepsy and intellectual disability. Gene. 667:45-55.
IF – 2.498

ОБЩ ИМПАКТ ФАКТОР: 6.564

8.2. НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **V. Peycheva**, K. Kamenarova, N. Ivanova, P. Dimova, S. Zhelyazkova, D. Avdjieva, E. Slavkova, G. Maksimov, V. Stoyanova, I. Litvinenko, I. Tournev, V. Bozhinova2, V. Mitev, A. Jordanova, R. Kaneva. Recurrent CNVs in 15q11.2-q12 in Bulgarian patients with generalized epilepsy and intellectual disability. Poster presentation, The European Human Genetics Conference, May 31-June 3, 2014, 22, Milan, Italy.

2. **В. Пейчева**, Н. Иванова, К.Каменарова, И. Цекова, И. Александрова, В. Божинова, И. Литвиненко, Р. Георгиева, Д. Христова, М. Божидарова, В. Митев, Р. Кънева, А. Йорданова. Молекулни дефекти в ген KCNQ2 при пациенти с бенигнени неонатални форми на епилепсия и електро-клинични синдроми. Постерна презентация, Национална конференция по детска неврология, психиатрия и психология на развитието, 23-25 октомври 2014, Парк хотел „Москва", София

3. И. Александрова, В. Божинова, Н. Иванова, Е. Славкова, П. Димова, **В. Пейчева**, Р. Кънева, А. Йорданова. Мутация в KCNQ2 гена: рядка причина за Роландова епилепсия. Постерна презентация, Национална конференция по детска неврология, психиатрия и психология на развитието, 23-25 октомври 2014, Парк хотел „Москва", София.

4. **В. Пейчева**, К.Каменарова, Н. Иванова. Микрочипов анализ за откриване на геномни аберации при епилепсия и умствено изоставане. Устна презентация, Симпозиум „Акад. Чудомир Начев", 25 октомври 2014, Салон на БАН, София

5. **V.Peycheva**, N.Ivanova, S.Zhelyazkova, M. Bozhidarova, E.Slavkova,G.Sarailieva, G. Maksimov, D.Deneva, V.Dimova, I.Litvinenko, I.Tournev, V. Bozhinova, V.Mitev, A.Jordanova, R.Kaneva. Recurrent CNVs within 17q12 region found in Bulgarian patients with complex epileptic syndromes. Poster presentation, The European Human Genetics Conference, 6-9 June, 2015, 23, Glasgow, United Kingdom.

6. **V. Peycheva**, N. Ivanova, G. Maksimov, V. Bozhinova, V. Mitev, A. Jordanova, R. Kaneva. 7p22.3 microdeletion and 6q26 microduplication found in Bulgarian patients with generalized epilepsy, autistic features and intellectual disability. Poster presentation. 12th European Congress on Epileptology, September 11-15, 2016, Prague, Czech Republic.

7. **В.Пейчева**, Н.Иванова, В.Божинова, В.Митев, А.Йорданова, Р.Кънева. 7p22.3 микроделеция и 6q26 микродупликация в български пациенти с комплексни епилептични синдроми, Постерна презентация, Националната

конференция по Детска Неврология, Психиатрия и Психология на Развитието с Международно участие, 20-22 Октомври, 2016, „Парк Хотел Москва“, София.

8. **В.Пейчева**, Н.Иванова, К.Каменарова, И.Александрова, Д.Стаматов, С.Желязкова, Д. Денева, Е.Родопска, М.Панова, М.Божидарова, Д.Христова, И.Пачева, И.Литвиненко, И.Иванов, В.Божинова, Е. Симеонов, В.Митев, А.Йорданова, Р.Кънева. „Молекулярно генетични и геномни изследвания при пациенти с идиопатична генерализирана епилепсия и комплексни епилептични синдроми“, Устна презентация, Националната конференция по Детска Неврология, Психиатрия и Психология на Развитието с Международно участие, 20-22 Октомври, 2016, „Парк Хотел Москва“, София.

9. **В.Пейчева**, Н.Иванова, К.Каменарова, И.Александрова, Д.Стаматов, С.Желязкова, Д. Денева, Е.Родопска, М.Панова, М.Божидарова, Д.Христова, И.Пачева, И.Литвиненко, И.Иванов, В.Божинова, Е. Симеонов, И.Търнев, В.Митев, А.Йорданова, Р.Кънева. Молекулярно-генетични и геномни изследвания при пациенти с идиопатична генерализирана епилепсия и комплексни синдроми. Устна презентация, Симпозиум „Акад. Чудомир Начев”, 3 декември 2016, Салон на БАН, София.

10. **V.Peycheva**, K.Kamenarova, N.Ivanova, G.Saraylieva, I.Pacheva, P.Dimova, I.Ivanov, V.Bozhinova, V.Mitev, A.Jordanova, R.Kaneva. “Microdeletions and duplications as genetic cause of neurodevelopmental disorders in Bulgarian patients”. Poster presentation. The European Human Genetics Conference, May, 27–30, 2017; Copenhagen, Denmark.

11. **В.Пейчева**, Н.Иванова, К.Каменарова, И.Александрова, Д.Стаматов, С.Желязкова, Д. Денева, Е.Родопска, М.Панова, М.Божидарова, Д.Христова, И.Пачева, И.Литвиненко, И.Иванов, В.Божинова, И.Търнев, Е. Симеонов, В.Митев, А.Йорданова, И.Димова, Р.Кънева. „Възможности за молекулярно-генетична диагностика на епилепсията в България“, Устна презентация, Седма Национална Конференция по Спешна педиатрия, Училище по клинична генетика за педиатри и ОПЛ, октомври, 2017, Хисаря.

12. **В.Пейчева**, А. Кадъм, В. Гергелчева, Е. Симеонов, В.Митев, И. Димова, Р.Кънева „Хромозомен микрочипов анализ при пациенти с разстройства в развитието на нервната система“, Постерна презентация, Национална Научна Конференция по Детска Неврология, Психиатрия и Психология на Развитието с Международно Участие, 11-12 октомври 2018, Парк хотел „Москва”, София.

9. УЧАСТИЯ В ПРОЕКТИ

2014-2015 ДТК02/67, финансиран от ФНИ, МОН „Съвременни подходи за разкриване генетичните основи на епилепсията“, участник

2015-2016 357/2015, финансиран от СМН, МУ-София „Потвърждаване на потенциално патогенни хромозомни микроаберации при пациенти с епилепсия и умствено изоставане, открити чрез метода на сравнителната геномна хибридизация“, ръководител

2016-2017 444/2016, финансиран от СМН, МУ-София „Количествен PCR в реално време на хромозомни микроаберации, открити при пациенти с комплексни епилептични синдроми чрез микрочипова технология“, ръководител

10. Използвана литература:

Киров, А. „Молекулни характеристики на идиопатична генерализирана епилепсия и синдромни епилепсии с ранно начало в България" 2013, дисертационен труд

Миланов И, Божинова В, Търнев И. Национален консенсус за диагностика и лечение на епилепсията. Българска неврология. 2016;17(2).

Allen NM, Mannion M, Conroy J, Lynch SA, Shahwan A, Lynch B, King MD. The variable phenotypes of KCNQ-related epilepsy. Epilepsia. 2014 Sep;55(9):e99-105.

Allen NM, Conroy J, Shahwan A, Ennis S, Lynch B, Lynch SA, King MD. Chromosomal microarray in unexplained severe early onset epilepsy–A single centre cohort. european journal of paediatric neurology. 2015 Jul 1;19(4):390-4.

Almalki A, Alston CL, Parker A, Simonic I, Mehta SG, He L, Reza M, Oliveira JM, Lightowlers RN, McFarland R, Taylor RW. Mutation of the human mitochondrial phenylalanine-tRNA synthetase causes infantile-onset epilepsy and cytochrome c oxidase deficiency. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. 2014 Jan 1;1842(1):56-64.

Arsov T, Mullen SA, Damiano JA, Lawrence KM, Huh LL, Nolan M, Young H, Thouin A, Dahl HH, Berkovic SF, Crompton DE. Early onset absence epilepsy: 1 in 10 cases is caused by GLUT1 deficiency. Epilepsia. 2012 Dec 1;53(12).

Avdjieva-Tzavella D, Hadjidekova S, Rukova B, Nesheva D, Litvinenko I, Hristova-Naydenova D, Simeonov E, Tincheva R, Toncheva D. Detection of genomic imbalances by array-based comparative genomic hybridization in bulgarian patients with autism spectrum disorders. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2012 Jan 1;26(6):3389-93.

Babatz TD, Kumar RA, Sudi J, Dobyns WB, Christian SL. Copy number and sequence variants implicate APBA2 as an autism candidate gene. Autism Research. 2009 Dec;2(6):359-64.

Bacchelli E, Ceroni F, Pinto D, Lomartire S, Giannandrea M, D'Adamo P, Bonora E, Parchi P, Tancredi R, Battaglia A, Maestrini E. A CTNNA3 compound heterozygous deletion implicates a role for αT-catenin in susceptibility to autism spectrum disorder. Journal of neurodevelopmental disorders. 2014 Dec;6(1):17.

Belengeanu V, Gamage TH, Farcas S, Stoian M, Andreescu N, Belengeanu A, Frengen E, Misceo D. A de novo 2.3 Mb deletion in 2q24. 2q24. 3 in a 20-month-old developmentally delayed girl. Gene. 2014 Apr 10;539(1):168-72.

Catterall WA, Kalume F, Oakley JC. NaV1. 1 channels and epilepsy. The Journal of physiology. 2010 Jun 1;588(11):1849-59.

Cestèle S, Labate A, Rusconi R, Tarantino P, Mumoli L, Franceschetti S, Annesi G, Mantegazza M, Gambardella A. Divergent effects of the T 1174S SCN1A mutation associated with seizures and hemiplegic migraine. Epilepsia. 2013 May;54(5):927-35.

Chiyonobu T, Inoue N, Morimoto M, Kinoshita T, Murakami Y. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor deficiency caused by mutations in PIGW is associated with West syndrome and hyperphosphatasia with mental retardation syndrome. Journal of medical genetics. 2014 Mar 1;51(3):203-7.

Claes LR, Deprez L, Suls A, Baets J, Smets K, Van Dyck T, Deconinck T, Jordanova A, De Jonghe P. The SCN1A variant database: a novel research and diagnostic tool. Human mutation. 2009 Oct;30(10):E904-20.

Coppola G, Castaldo P, Del Giudice EM, Bellini G, Galasso F, Soldovieri MV, Anzalone L, Sferro C, Annunziato L, Pascotto A, Taglialatela M. A novel KCNQ2 K+ channel mutation in benign neonatal convulsions and centrotemporal spikes. Neurology. 2003 Jul 8;61(1):131-4.

D'Arrigo S, Gavazzi F, Alfei E, Zuffardi O, Montomoli C, Corso B, Buzzi E, Sciacca FL, Bulgheroni S, Riva D, Pantaleoni C. The diagnostic yield of array comparative genomic hybridization is high regardless of

severity of intellectual disability/developmental delay in children. Journal of child neurology. 2016 May;31(6):691-9.
Delplanque J, Devos D, Huin V, Genet A, Sand O, Moreau C, Goizet C, Charles P, Anheim M, Monin ML, Buee L. TMEM240 mutations cause spinocerebellar ataxia 21 with mental retardation and severe cognitive impairment. Brain. 2014 Jul 27;137(10):2657-63.
Deng D, Xu C, Sun P, Wu J, Yan C, Hu M, Yan N. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. Nature. 2014 Jun;510(7503):121.
De Vries BB, White SM, Knight SJ, Regan R, Homfray T, Young ID, Super M, McKeown C, Splitt M, Quarrell OW, Trainer AH. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. Journal of medical genetics. 2001 Mar 1;38(3):145-50.
Dulubova I, Khvotchev M, Liu S, Huryeva I, Südhof TC, Rizo J. Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007 Feb 20;104(8):2697-702.
Elia J, Gai X, Xie HM, Perin JC, Geiger E, Glessner JT, D'arcy M, Frackelton E, Kim C, Lantieri F, Muganga BM. Rare structural variants found in attention-deficit hyperactivity disorder are preferentially associated with neurodevelopmental genes. Molecular psychiatry. 2010 Jun;15(6):637.
Frost EE, Zhou Z, Krasnesky K, Armstrong RC. Initiation of oligodendrocyte progenitor cell migration by a PDGF-A activated extracellular regulated kinase (ERK) signaling pathway. Neurochemical research. 2009 Jan 1;34(1):169-81.
Gimelli S, Capra V, Di Rocco M, Leoni M, Mirabelli-Badenier M, Schiaffino MC, Fiorio P, Cuoco C, Gimelli G, Tassano E. Interstitial 7q31. 1 copy number variations disrupting IMMP2L gene are associated with a wide spectrum of neurodevelopmental disorders. Molecular cytogenetics. 2014 Dec;7(1):54.
Girirajan S, Rosenfeld JA, Cooper GM, Antonacci F, Siswara P, Itsara A, Vives L, Walsh T, McCarthy SE, Baker C, Mefford HC. A recurrent 16p12. 1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. Nature genetics. 2010 Mar;42(3):203.
Gokoolparsadh A, Fang Z, Braidy N, Lin P, Pardy CJ, Eapen V, Clarke R, Voineagu I. Transcriptional response to mitochondrial protease IMMP2L knockdown in human primary astrocytes. Biochemical and biophysical research communications. 2017 Jan 22;482(4):1252-8.
Hardies K, Weckhuysen S, Peeters E, Holmgren P, Van Esch H, De Jonghe P, Van Paesschen W, Suls A. Duplications of 17q12 can cause familial fever-related epilepsy syndromes. Neurology. 2013 Oct 15;81(16):1434-40.
Harel T, Yoon WH, Garone C, Gu S, Coban-Akdemir Z, Eldomery MK, Posey JE, Jhangiani SN, Rosenfeld JA, Cho MT, Fox S. Recurrent de novo and biallelic variation of ATAD3A, encoding a mitochondrial membrane protein, results in distinct neurological syndromes. The American Journal of Human Genetics. 2016 Oct 6;99(4):831-45.
Hardingham GE, Bading H. The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. Trends in neurosciences. 2003 Feb 1;26(2):81-9.
Heinzen EL, Yoon W, Tate SK, Sen A, Wood NW, Sisodiya SM, Goldstein DB. Nova2 interacts with a cis-acting polymorphism to influence the proportions of drug-responsive splice variants of SCN1A. The American Journal of Human Genetics. 2007 May 1;80(5):876-83.
Helbig I, Mefford HC, Sharp AJ, Guipponi M, Fichera M, Franke A, Muhle H, De Kovel C, Baker C, Von Spiczak S, Kron KL. 15q13. 3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy. Nature genetics. 2009 Feb;41(2):160.
Hrabik SA, Standridge SM, Greiner HM, Neilson DE, Pilipenko VV, Zimmerman SL, Connor JA, Spaeth CG. The clinical utility of a single-nucleotide polymorphism microarray in patients with epilepsy at a tertiary medical center. Journal of child neurology. 2015 Nov;30(13):1770-7.
Ho A, Morishita W, Atasoy D, Liu X, Tabuchi K, Hammer RE, Malenka RC, Südhof TC. Genetic analysis of Mint/X11 proteins: essential presynaptic functions of a neuronal adaptor protein family. Journal of Neuroscience. 2006 Dec 13;26(50):13089-101.

Howell KB, Kornberg AJ, Harvey AS, Ryan MM, Mackay MT, Freeman JL, Rodriguez Casero MV, Collins KJ, Hayman M, Mohamed A, Ware TL. High resolution chromosomal microarray in undiagnosed neurological disorders. Journal of paediatrics and child health. 2013 Sep;49(9):716-24.

Iourov IY, Vorsanova SG, Kurinnaia OS, Zelenova MA, Silvanovich AP, Yurov YB. Molecular karyotyping by array CGH in a Russian cohort of children with intellectual disability, autism, epilepsy and congenital anomalies. Molecular Cytogenetics. 2012 Dec;5(1):46.

Ishii A, Miyajima T, Kurahashi H, Wang JW, Yasumoto S, Kaneko S, Hirose S. KCNQ2 abnormality in BECTS: benign childhood epilepsy with centrotemporal spikes following benign neonatal seizures resulting from a mutation of KCNQ2. Epilepsy research. 2012 Nov 1;102(1-2):122-5.

Kanai K, Yoshida S, Hirose S, Oguni H, Kuwabara S, Sawai S, Hiraga A, Fukuma G, Iwasa H, Kojima T, Kaneko S. Physico-chemical property changes of amino acid residue accompanied with missense mutations in SCN1A affect the epilepsy phenotype severity. Journal of medical genetics. 2009 Jul 7.

Kashevarova AA, Nazarenko LP, Skryabin NA, Salyukova OA, Chechetkina NN, Tolmacheva EN, Sazhenova EA, Magini P, Graziano C, Romeo G, Kučinskas V. Array CGH analysis of a cohort of Russian patients with intellectual disability. Gene. 2014 Feb 15;536(1):145-50.

Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. Genetics in Medicine. 2011 Jul;13(7):680

Kirov G, Gumus D, Chen W, Norton N, Georgieva L, Sari M, O'Donovan MC, Erdogan F, Owen MJ, Ropers HH, Ullmann R. Comparative genome hybridization suggests a role for NRXN1 and APBA2 in schizophrenia. Human molecular genetics. 2007 Nov 6;17(3):458-65.

Kirov A, Dimova P, Todorova A, Mefford H, Todorov T, Saraylieva G, Bojinova V, Mitev V, Helbig I. 15q13. 3 microdeletions in a prospectively recruited cohort of patients with idiopathic generalized epilepsy in Bulgaria. Epilepsy research. 2013 May 1;104(3):241-5.

Kline AD, Krantz ID, Sommer A, Kliewer M, Jackson LG, FitzPatrick DR, Levin AV, Selicorni A. Cornelia de Lange syndrome: clinical review, diagnostic and scoring systems, and anticipatory guidance. American journal of medical genetics part A. 2007 Jun 15;143(12):1287-96.

Lal D, Reinthaler EM, Dejanovic B, May P, Thiele H, Lehesjoki AE, Schwarz G, Riesch E, Ikram MA, Van Duijn CM, Uitterlinden AG. Evaluation of presumably disease causing SCN1A variants in a cohort of common epilepsy syndromes. PloS one. 2016 Mar 18;11(3):e0150426.

Lebon S, Suarez P, Alija S, Korff CM, Fluss J, Mercati D, Datta AN, Poloni C, Marcoz JP, Campos-Xavier AB, Bonafé L. When should clinicians search for GLUT1 deficiency syndrome in childhood generalized epilepsies?. european journal of paediatric neurology. 2015 Mar 1;19(2):170-5.

Leen WG, Klepper J, Verbeek MM, Leferink M, Hofste T, van Engelen BG, Wevers RA, Arthur T, Bahi-Buisson N, Ballhausen D, Bekhof J. Glucose transporter-1 deficiency syndrome: the expanding clinical and genetic spectrum of a treatable disorder. Brain. 2010 Feb 2;133(3):655-70.

Lesca G, Rudolf G, Labalme A, Hirsch E, Arzimanoglou A, Genton P, Motte J, de Saint Martin A, Valenti MP, Boulay C, De Bellescize J. Epileptic encephalopathies of the Landau-Kleffner and continuous spike and waves during slow-wave sleep types: Genomic dissection makes the link with autism. Epilepsia. 2012 Sep;53(9):1526-38.

Lionel AC, Tammimies K, Vaags AK, Rosenfeld JA, Ahn JW, Merico D, Noor A, Runke CK, Pillalamarri VK, Carter MT, Gazzellone MJ. Disruption of the ASTN2/TRIM32 locus at 9q33. 1 is a risk factor in males for autism spectrum disorders, ADHD and other neurodevelopmental phenotypes. Human molecular genetics. 2013 Dec 30;23(10):2752-68.

Lo-Castro A, Curatolo P. Epilepsy associated with autism and attention deficit hyperactivity disorder: is there a genetic link?. Brain and Development. 2014 Mar 1;36(3):185-93.

Lu B, Poirier C, Gaspar T, Gratzke C, Harrison W, Busija D, Matzuk MM, Andersson KE, Overbeek PA, Bishop CE. A mutation in the inner mitochondrial membrane peptidase 2-like gene (Immp2l) affects

mitochondrial function and impairs fertility in mice. Biology of reproduction. 2008 Apr 1;78(4):601-10.

Ma Y, Mehta SL, Lu B, Li PA. Deficiency in the inner mitochondrial membrane peptidase 2-like (Immp21) gene increases ischemic brain damage and impairs mitochondrial function. Neurobiology of disease. 2011 Dec 31;44(3):270-6.

Maihara T, Tsuji M, Higuchi Y, Hattori H. Benign familial neonatal convulsions followed by benign epilepsy with centrotemporal spikes in two siblings. Epilepsia. 1999 Jan;40(1):110-3.

Mariani M, Crosti F, Redaelli S, Fossati C, Piras R, Biondi A, Dalprà L, Selicorni A. Partial duplication of the PARK 2 gene in a child with developmental delay and her normal mother: A second report. American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics. 2013 Jul;162(5):485-6.

Marini C, Scheffer IE, Nabbout R, Suls A, De Jonghe P, Zara F, Guerrini R. The genetics of Dravet syndrome. Epilepsia. 2011 Apr;52:24-9.

Martin J, Cooper M, Hamshere ML, Pocklington A, Scherer SW, Kent L, Gill M, Owen MJ, Williams N, O'Donovan MC, Thapar A. Biological overlap of attention-deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder: evidence from copy number variants. Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry. 2014 Jul 1;53(7):761-70.

McTague A, Howell KB, Cross JH, Kurian MA, Scheffer IE. The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. The Lancet Neurology. 2016 Mar 1;15(3):304-16.

Mefford, H. C., Muhle, H., Ostertag, P., von Spiczak, S., Buysse, K., Baker, C., ... & Eichler, E. E. Genome-wide copy number variation in epilepsy: novel susceptibility loci in idiopathic generalized and focal epilepsies. PLoS genetics 2010; 6(5), e1000962.

Mefford, H.C., Yendle, S.C., Hsu, C., Cook, J., Geraghty, E., McMahon, J.M., Eeg-Olofsson, O., Sadleir, L.G., Gill, D., Ben-Zeev, B. and Lerman-Sagie, T., 2011. Rare copy number variants are an important cause of epileptic encephalopathies. Annals of neurology, 70(6), pp.974-985.

Meng H, Xu HQ, Yu L, Lin GW, He N, Su T, Shi YW, Li B, Wang J, Liu XR, Tang B. The SCN1A mutation database: updating information and analysis of the relationships among genotype, functional alteration, and phenotype. Human mutation. 2015 Jun;36(6):573-80.

Mihaylova M, Staneva R, Toncheva D, Pancheva M, Hadjidekova S. Benign, pathogenic and copy number variations of unknown clinical significance in patients with congenital malformations and developmental delay. Balkan Journal of Medical Genetics. 2017 Jun 30;20(1):5-12.

Okumura A, Yamamoto T, Kurahashi H, Takasu M. Epilepsies in Children with 2q24. 3 Deletion/Duplication. Journal of Pediatric Epilepsy. 2015 Mar;4(01):008-16.

Palumbo O, Palumbo P, Leone MP, Stallone R, Palladino T, Vendemiale M, Palladino S, Papadia F, Carella M, Fischetto R. PARK2 Microduplication: Clinical and Molecular Characterization of a Further Case and Review of the Literature. Molecular syndromology. 2016;7(5):282-6.

Petrovski S, Scheffer IE, Sisodiya SM, O'Brien TJ, Berkovic SF, EPIGEN Consortium. Lack of replication of association between scn1a SNP and febrile seizures. Neurology. 2009 Dec 1;73(22):1928-30.

Quintela I, Eirís J, Gómez-Lado C, Pérez-Gay L, Dacruz D, Cruz R, Castro-Gago M, Míguez L, Carracedo Á, Barros F. Copy number variation analysis of patients with intellectual disability from North-West Spain. Gene. 2017 Aug 30;626:189-99.

Raviglione F, Conte G, Ghezzi D, Parazzini C, Righini A, Vergaro R, Legati A, Spaccini L, Gasperini S, Garavaglia B, Mastrangelo M. Clinical findings in a patient with FARS2 mutations and early-infantile-encephalopathy with epilepsy. American Journal of Medical Genetics Part A. 2016 Nov;170(11):3004-7.

Robertson J, Hatton C, Emerson E, Baines S. Prevalence of epilepsy among people with intellectual disabilities: a systematic review. Seizure. 2015 Jul 1;29:46-62.

Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, Shaw-Smith C, Higgins JP, Burton H. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. Genetics in Medicine. 2009 Mar;11(3):139.

Sansovi I, Ivankov AM, Bobinec A, Kero M, Barii I. Chromosomal microarray in clinical diagnosis: a study of 337 patients with congenital anomalies and developmental delays or intellectual disability. Croatian medical journal. 2017 Jul 7;58(3):231-8.

Sharma P, Gupta N, Chowdhury MR, Sapra S, Ghosh M, Gulati S, Kabra M. Application of chromosomal microarrays in the evaluation of intellectual disability/global developmental delay patients–A study from a tertiary care genetic centre in India. Gene. 2016 Sep 15;590(1):109-19.

Scheuerle A, Wilson K. PARK2 copy number aberrations in two children presenting with autism spectrum disorder: further support of an association and possible evidence for a new microdeletion/microduplication syndrome. American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics. 2011 Jun;156(4):413-20.

Schlachter K, Gruber-Sedlmayr U, Stogmann E, Lausecker M, Hotzy C, Balzar J, Schuh E, Baumgartner C, Mueller JC, Illig T, Wichmann HE. A splice site variant in the sodium channel gene SCN1A confers risk of febrile seizures. Neurology. 2009 Mar 17;72(11):974-8.

Singh NA, Westenskow P, Charlier C, Pappas C, Leslie J, Dillon J, Anderson VE, Sanguinetti MC, Leppert MF. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel genes in benign familial neonatal convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum. Brain. 2003 Dec 1;126(12):2726-37.

Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, Ronen GM, Bjerre I, Quattlebaum T, Murphy JV, McHarg ML. A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. Nature genetics. 1998 Jan;18(1):25.

Sugawara T, Mazaki–Miyazaki E, Fukushima K, Shimomura J, Fujiwara T, Hamano S, Inoue Y, Yamakawa K. Frequent mutations of SCN1A in severe myoclonic epilepsy in infancy. Neurology. 2002 Apr 9;58(7):1122-4.

Suls A, Velizarova R, Yordanova I, Deprez L, Van Dyck T, Wauters J, Guergueltcheva V, Claes LR, Kremensky I, Jordanova A, De Jonghe P. Four generations of epilepsy caused by an inherited microdeletion of the SCN1A gene. Neurology. 2010 Jul 6;75(1):72-6.

Sutcliffe JS, Han MK, Amin T, Kesterson RA, Nurmi EL. Partial duplication of the APBA2 gene in chromosome 15q13 corresponds to duplicon structures. BMC genomics. 2003 Dec;4(1):15.

Szafranski P, Schaaf CP, Person RE, Gibson IB, Xia Z, Mahadevan S, Wiszniewska J, Bacino CA, Lalani S, Potocki L, Kang SH. Structures and molecular mechanisms for common 15q13. 3 microduplications involving CHRNA7: benign or pathological?. Human mutation. 2010 Jul;31(7):840-50.

Tate SK, Depondt C, Sisodiya SM, Cavalleri GL, Schorge S, Soranzo N, Thom M, Sen A, Shorvon SD, Sander JW, Wood NW. Genetic predictors of the maximum doses patients receive during clinical use of the anti-epileptic drugs carbamazepine and phenytoin. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005 Apr 12;102(15):5507-12.

Tate SK, Singh R, Hung CC, Tai JJ, Depondt C, Cavalleri GL, Sisodiya SM, Goldstein DB, Liou HH. A common polymorphism in the SCN1A gene associates with phenytoin serum levels at maintenance dose. Pharmacogenetics and genomics. 2006 Oct 1;16(10):721-6.

Traylor RN, Dobyns WB, Rosenfeld JA, Wheeler P, Spence JE, Bandholz AM, Bawle EV, Carmany EP, Powell CM, Hudson B, Schultz RA. Investigation of TBR1 hemizygosity: four individuals with 2q24 microdeletions. Molecular syndromology. 2012;3(3):102-12.

Uwineza A, Caberg JH, Hitayezu J, Hellin AC, Jamar M, Dideberg V, Rusingiza EK, Bours V, Mutesa L. Array-CGH analysis in Rwandan patients presenting development delay/intellectual disability with multiple congenital anomalies. BMC medical genetics. 2014 Dec;15(1):79.

Varlamis S, Vavatsi N, Pavlou E, Kotsis V, Spilioti M, Kavga M, Varlamis G, Sotiriadou F, Agakidou E, Voutoufianakis S, Evangeliou AE. Evaluation of oral glucose tolerance test in children with epilepsy. Journal of child neurology. 2013 Nov;28(11):1437-42.

Vernon HJ, McClellan R, Batista DA, Naidu S. Mutations in FARS2 and non-fatal mitochondrial dysfunction in two siblings. American Journal of Medical Genetics Part A. 2015 May;167(5):1147-51.

Wang KS, Liu XF, Aragam N. A genome-wide meta-analysis identifies novel loci associated with schizophrenia and bipolar disorder. Schizophrenia research. 2010 Dec 1;124(1-3):192-9.

Wen H, Levitan IB. Calmodulin is an auxiliary subunit of KCNQ2/3 potassium channels. Journal of Neuroscience. 2002 Sep 15;22(18):7991-8001.

Wincent J, Kolbjer S, Martin D, Luthman A, Åmark P, Dahlin M, Anderlid BM. Copy number variations in children with brain malformations and refractory epilepsy. American Journal of Medical Genetics Part A. 2015 Mar;167(3):512-23.

Wong TH, Chiu WZ, Breedveld GJ, Li KW, Verkerk AJ, Hondius D, Hukema RK, Seelaar H, Frick P, Severijnen LA, Lammers GJ. PRKAR1B mutation associated with a new neurodegenerative disorder with unique pathology. Brain. 2014 Apr 9;137(5):1361-73.

Xie Y. Is Chromosome 15q13. 3 Duplication Involving CHRNA7 Associated With Oral Clefts?. Child neurology open. 2015 Dec 11;2(4):2329048X15618918.

Yang H, Wang D, Engelstad K, Bagay L, Wei Y, Rotstein M, Aggarwal V, Levy B, Ma L, Chung WK, De Vivo DC. Glut1 deficiency syndrome and erythrocyte glucose uptake assay. Annals of neurology. 2011 Dec 1;70(6):996-1005.

Yin CL, Chen HI, Li LH, Chien YL, Liao HM, Chou MC, Chou WJ, Tsai WC, Chiu YN, Wu YY, Lo CZ. Genome-wide analysis of copy number variations identifies PARK2 as a candidate gene for autism spectrum disorder. Molecular autism. 2016 Dec;7(1):23.

Yus-Nájera E, Santana-Castro I, Villarroel A. The identification and characterization of a noncontinuous calmodulin-binding site in noninactivating voltage-dependent KCNQ potassium channels. Journal of Biological Chemistry. 2002 Aug 9;277(32):28545-53.

Zara F, Specchio N, Striano P, Robbiano A, Gennaro E, Paravidino R, Vanni N,Beccaria F, Capovilla G, Bianchi A, Caffi L, Cardilli V, Darra F, Bernardina BD, Fusco L, Gaggero R, Giordano L, Guerrini R, Incorpora G, Mastrangelo M, Spaccini L, Laverda AM, Vecchi M, Vanadia F, Veggiotti P, Viri M, Occhi G, Budetta M,Taglialatela M, Coviello DA, Vigevano F, Minetti C. Genetic testing in benignfamilial epilepsies of the first year of life: clinical and diagnosticsignificance. Epilepsia. 2013 Mar;54(3):425-36

Zuberi SM, Brunklaus A, Birch R, Reavey E, Duncan J, Forbes GH. Genotype–phenotype associations in SCN1A-related epilepsies. Neurology. 2011 Feb 15;76(7):594-600.

Използвани електронни източници:

- PolyPhen-2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/)
- PROVEAN/SIFT (http://provean.jcvi.org/)
- Mutation taster (www.mutationtaster.org/)
- NetGene2 (http://www.cbs.dtu.dk)
- Human Splicing Finder (http://www.umd.be/HSF3/)
- Ensembl (http://www.ensembl.org)
- 1000Genomes (http://www.internationalgenome.org/)
- Human Gene Mutation Database - HGMD (www.hgmd.cf.ac.uk)
- Exome Aggregation Consortium (http://exac.broadinstitute.org/)
- ClinVar (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar)
- база - данни за SCN1A мутации на Лабораторията по Молекулярна генетика, Университет на Антверпен (http://www.molgen.vib-ua.be/SCN1AMutations/)
- OMIM - Online Mendelian Inheritance of Man: https://www.omim.org
- GeneCards: https://www.genecards.org
- DECIPHER: https://decipher.sanger.ac.uk/
- ISCA Consortium: http://dbsearch.clinicalgenome.org
- ClinVar: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar
- Database of Genomic Variants: http://dgv.tcag.ca