МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

****

АНДРЕЙ ВЕНЦИСЛАВОВ КИРОВ

МОЛЕКУЛНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ИДИОПАТИЧНА ГЕНЕРАЛИЗИРАНА ЕПИЛЕПСИЯ И СИНДРОМНИ ЕПИЛЕПСИИ С РАННО НАЧАЛО В БЪЛГАРИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен

„ДОКТОР”

Научна специалност:„Биохимия”

Шифър: 01.06.10

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:

Чл. Кор. Проф. Д-р Ваньо Митев, дм, дбн

ОФИЦИАЛНИ РЕЦЕНЗЕНТИ:

Доц. Алексей Савов, дб

Доц. Д-р Венета Георгиева, дм

София, 2013

Дисертационнят труд съдържа 133 страници,58 фигури и 18 таблици.

Цитирани са 125 литературни източника и 10 интернет сайта.

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

Включените в дисертацията изследвания са извършени в:
Катедра по Медицинска Химия и Биохимия,
Медицински Университет – София;

Генетична Медико-Диагностична Лаборатория „Геника", София

Работата по дисертационния труд е финансирана частично
от Съвета за медицинска наука
на Медицински Университет – София
(Договори № 29/2010, 49/2011 и 21/2012).

Дисертационният труд е представен на заседание на разширен катедрен съвет на Катедра „Медицинска Химия и Биохимия", Медицински Университет - София, на 01.04.2013г. и насрочен за защита към 18.06.2013г.

Защитата ще се състой на 18.06.2013г.
адрес: Катедра Медицинска Химия и Биохимия, Медицински Университет София, ул. Здраве 2, гр. София

Материалите по защитата са на разположение в Катедра „Медицинска Химия и Биохимия", Медицински Университет – София и са публикувани на интернет страницата на МУ-София - Развитие на академичния състав - http://career.mu-sofia.bg

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

CDKL5 – Cyclin-dependent kinase like 5 gene

EFMR - Epilepsy and mental retardation limited to females

Е-ГТКП - епилепсия с генерализирани тонично-клонични пристъпи

FOXG1 - Forkhead G1 gene

IGE (ИГЕ) – Идиопатична генерализирана епилепсия

kb – килобази

MeCP2 – Methyl-CpG-binding protein 2

MECP2 – Methyl-CpG-binding protein 2 gene

MLPA - Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification

PCDH19 –

PCR/ПВР – Polymerase chain reaction, полимеразна верижна реакция

RTT – Rett syndrome

бд/bp – базови двойки, base pair

ДАЕ - детска абсанс-епилепсия

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

ЕМА - епилепсия с миоклонични абсанси

МАЕ - миоклонично-астатична епилепсия

РНАЕ - абсансна епилепсия с ранно начало

РНК – рибонуклеинова киселина

С-ИГЕ - смесени ИГЕ-синдроми

ЮАЕ - ювенилна абсанс-епилепсия

ЮМЕ - ювенилна миоклонична епилепсия

СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ	**5**
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	**7**
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	**8**
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	**9**
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	**49**
БИБЛИОГРАФИЯ	**51**
ИЗВОДИ	**54**
ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ	**55**
ПРИНОСИ	**57**
SUMMARY	**58**

ВЪВЕДЕНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ

Епилепсиите са сред най-честите неврологични заболявания при хората с честота около 3% [Hauser, et al., 1993] като в същото време при голям процент засегнати остава неизяснена. В резултат на това, на засегнатите семейства не може да бъде предложено адекватно генетично консултиране и репродуктивно планиране чрез пренатална диагностика.

Една от най-големите групи епилептични заболявания е идиопатичната генерализирана епилепсия (ИГЕ). Това е група от епилепсии с различни клинични прояви и съставлява 20-30% от епилепсията в общата популация. При пациентите от групата се наблюдават нормални неврологични резултати и липса на интелектуален дефицит. Началото на заболяването е в детска възраст, въпреки че диагностицирането може да настъпи и по-късно. Пристъпите са различни типове генерализирани гърчове: миоклонични, абсансни или генерализирани тонично-клонични. Генетичните изменения водят до предразположение към пристъпи, като се понижава прагът за тяхното възникване.

Генетичните изменения, водещи до ИГЕ фенотип, в повечето случаи остават неизяснени. При пациенти с умствено изоставане и епилепсия [Sharpet et al., 2008], шизофрения [International Schizopherenia Consortium 2008], аутизъм и други невропсихични нарушения [Stefansson et al., 2008] се наблюдават микроделеции в региона 15q13.3 с честота 0,2-0,3%. Публикуваните данни от последните 3 години показват, че честотата на 15q13.3 микроделеция при пациенти с ИГЕ е по-висока (около 1%) [Helbig et al., 2009] спрямо предишни публикации. Това най-вероятно се дължи на изключително хетерогенната група от изследвани пациенти в първоначалните проучвания. Освен микроделеции в региона се откриват и микродупликации. Най-честата от тях обхваща само *CHRNA7* гена. Влиянието на тази микродупликация върху тежестта и/или изява на епилепсия е спорно, защото освен при пациенти с ИГЕ е откривана и при здрави контроли [Helbig et al., 2009]. На базата на тези резултати микродупликацията се счита като предразположение към епилепсия в значително по-ниска степен спрямо микроделеции в същия регион [Helbig et al., 2008; Stein, 2009].

Rett синдром (RTT, OMIM #312750) е най-честата причина за Х – свързан интелектуален дефицит при момичета. Честотата на заболяването е 1:10 000, 1:15 000 [Hagberg et al., 1997]. Това е прогресиращо заболяване, засягащо неврологичното развитие. Заболяването се характеризира с прогресираща енцефалопатия [Hagberg et al., 1983].

Епилепсия се наблюдава при 70% до 90% от пациентите с класически синдром на Rett [Cooper at al.,1998a,b; Nagie & Witt, 1989; Steffenbutg et al., 2001]. Пристъпите обикновено са от различни типове, включително комплексни, парциални, атипични абсансни и генерализирани тонично-клонични [Appleton, 2003].

Поради огромното разнообразие от клинични симптоми, съпровождащи RTT, през 2010 година критериите за заболяването бяха ревизирани [Neul et al., 2010] и това налага прекласифициране на голям брой пациенти.

Синдромът на Rett се дължи на de novo възникнали точкови мутации или големи делеции в *MECP2* (methyl-CpG binding protein 2) гена и по-рядко на мутации в *CDKL5* (cyclin dependent kinase-like 5) и *FOXG1* (Forkhead G1) гените. Мутации в *MECP2* гена се срещат при около 95-97% от индивидите с типичен RTT [Neul et al., 2008]. Важно е да се отбележи, че между 3-5% от индивидите, които отговарят на стриктните клинични критерии за синдром на Rett, не носят мутации в *MECP2* гена. Мутации в други генетични локуси освен *MECP2* се откриват при пациенти с атипичен RTT.

В редица случаи прациентите със синдром на Rett показват фенотипни прилики с епилептичните енцефалопатии с ранно начало (early infantile epileptic encephalopathy – EIEE). Епилептичните енцефалопатии са група от редки заболявания, асоциирана с когнитивни и поведенчески нарушения, както и други нарушения на мозъчната функция. Тази хетерогенна група има множествена етиология като симптоматични мозъчни лезии, метаболитни заболявания или различни генетични синдроми.

Епилепсията с ранно начало има потенциално по-високо отражение върху детското развитие спрямо епилепсиите с по-късно начало. Началото е силно вариабилно дори и в рамките на един синдром или заболяване. Обикновено гърчовете и когнитивните функции варират в зависимост от нивото на развитие на отделните деца. С времето гърчовете може да отшумят, но не и поведенческите и познавателните проблеми, които могат да останат под една или друга форма и след детството.

Обект на настоящия дисертационен труд са EIEE тип 2 и тип 9. Тези заболявания са асоциирани с мутации в гените *CDKL5* (EIEE, тип 2) и *PCDH19* (EIEE, тип 9).

Настоящата научна разработка беше фокусирана върху изясняване приноса на микроделеции в хромозомен регион 15q13.3 за фенотипна изява на идиопатична генерализирана епилепсия и изследване молекулните характеристики на синдромни епилепсии с ранно начало при български пациенти.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ на настоящия дисертационен труд е изясняване приноса на микроделеции в хромозомен регион 15q13.3 за фенотипна изява на идиопатична генерализирана епилепсия и изследване молекулните характеристики на синдромни епилепсии с ранно начало при български пациенти.

ЗАДАЧИ

1. Идиопатична генерализирана епилепсия (ИГЕ)

- Въвеждане и оптимизиране на методи за анализ на делеции и дупликации в региона на 15-та хромозома (15q13.3).
- Проспективен подбор на пациенти с ИГЕ съгласно съвременната номенклатура.
- Приложение на разработените методи за диагностика при подбраната група български пациенти с ИГЕ.
- Сравнение на получените резултати с публикуваните данни.

2. Синдром на Rett (RTT)

- Подбор и класификация на пациенти с класически и атипичен синдром на Rett в зависимост от наличие или отсъствие на епилепсия.
- Скрининг за мутации в *MECP2* гена при подбраната група пациени.
- Генотип-фенотипни корелации при изследваните пациенти: мутации в *MECP2* гена и епилепсия.
- Провеждане на допълнителни изследвания в други гени при генетично неизяснените пациенти.
- Модификация на системния подход за молекулярно-генетична диагностика при пациенти с RTT.
- Сравнение на получените резултати с публикуваните данни.

3. Епилептични енцефалопатии (ЕЕ)

- Подбор и класификация на пациенти с клинична диагноза ЕЕ съгласно съвременната номенклатура.
- Въвеждане и оптимизиране на методи за анализ на гените *PCDH19* и *CDKL5*, мутации в които са асоциирани с ЕЕ.
- Приложение на разработените методи за диагностика при група пациенти с ЕЕ.
- Изработване на системен подход за молекулярно-генетична диагностика при пациенти с ЕЕ.
- Сравнение на получените резултати с публикуваните данни.

2.2.4. Обобщение на получените резултати

МАТЕРИАЛИ

1. **КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ – 152 пациента**
   - 100 Пациенти с идиопатична генерализирана епилепсия;
   - 37 момичета са с клинична диагноза Rett синдром;
   - 15 пациенти с епилептична енцефалопатия с ранно начало;

2. **БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ - ДНК**

МЕТОДИ

1. **ПРЕДАНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА МАТЕРИАЛА**
   - 1.1. Изолиране на ДНК
   - 1.2. Бисулфитно конвертиране на ДНК
2. **АНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА МАТЕРИАЛА**
   - 2.1. Полимеразна верижа реакция (ПВР; Polymerase chain Reaction; PCR) на следните гени:
     - MECP2
     - CDKL5
     - PCDH19
     - FOXG1
   - 2.2. Електрофореза в агарозен гел
   - 2.3. Директно секвениране по Sanger с флуоресцентно белязани дидезокси нуклеотиди.
   - 2.4. Мултиплексна лигазно зависима амплификация (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification, MLPA).

● Използвани MLPA китове в дисертационния труд:

SALSA MLPA Kit P297-B2 Microdeletion syndromes - 2

SALSA MLPA Kit P015C - MECP2

[www.mlpa.com]

● Литературни база данни, използвани в проучването

При секвенционния анализ на изследваните гени, разчетената от нас секвенция се сравнява с публикуваната за всеки ген в GenBank базата данни. Използванити генни секвенции в настоящето проучване имат следните регистрационни номера: X99686 (*MECP2*), NM_001037343 (*CDKL5*), NM_005249.4 (*FOXG1*), NM_001184880.1 (*PCDH19*).

За сравнителния анализ на откритите мутации при български пациенти с публикуваните данни в литературата са използвани редица проучвания на други автори, цитирани в раздел „Резултати и Обсъждане“. Използвани са мутационните бази данни:

- International Rett Syndrome Foundation database - www.mecp2.chw.edu.au
- The Human Gene Mutation Database - http://www.hgmd.org/
- Leiden Open Variation Database - http://www.lovd.nl
-

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Групата пациенти с епилепсия, която представлява обект на молекулярно-генетични изследвания в настоящия дисертационен труд се състои от 152 неродствени пациента.

На базата на предварително проведените клинични изследвания пациентите бяха разделени в 3 групи:

1) Идиопатична генерализирана епилепсия - 100 неродствени пациента
2) Синдром на Rett - 37 неродствени пациента, насочени с диагноза RTT
3) Епилептична енцефалопатия с ранно начало (EIEE) – 15 неродствени пациента

Резултатите от клинико-генетичните изследвания са представени в 4 публикации [Авджиева и сътр. 2010; Dimova et al., 2012; Kirov et al., 2012; Киров и сътр. 2013].

1. ИДИОПАТИЧНА ГЕНЕРАЛИЗИРАНА ЕПИЛЕПСИЯ

Епилепсията е едно от най-честите неврологични заболявания и се среща с честота около 3% в човешката популация [Hauser, et al 1993; Mulley and Mefford, 2010; Mefford and Mulley, 2011]. Най-голямо разнообразие на епилептични синдроми се наблюдава в детска и юношеска възраст. Идиопатичните епилепсии са заболявания, при които липсва сигурна и/или установима причина. Приема се, че основна роля играят генетични фактори. Едни от най-честите епилептични синдроми в детско-юношеска възраст са идиопатичните генерализирани епилепсии (ИГЕ). ИГЕ съставляват около 30% от всички епилепсии и са най-честата група наследствени епилептични пристъпи [Scheffer and Berkovic, 2010]. Те имат комплексни наследствени и придобити характеристики, включващи множество генетични и епигенетични фактори. Генетичните особености на ИГЕ все още остават неясни и представляват най-интригуващия пъзел в генетиката на епилепсиите. Много проучвания за генна асоциация са опитвали да установят общи варианти при ИГЕ, но до момента не са потвърдени такива като статистически определящи рискови фактори [Marini et al., 2004; Mulley and Mefford, 2010; Mefford and Mulley, 2011; Scheffer and Berkovic, 1011].

В последно време в проучвания, насочени към определени геномни области, бяха установени рецидивиращи микроделеции в хромозоми 15q11.2, 15q13.3 и 16p13.11, които се приемат за едни от най-важните генетични фактори, предразполагащи към ИГЕ [de Kovel, et al., 2009; Dibbens, et al, 2009; Helbig et al., 2009; Mefford, et al; 2010]. Тези хромозомни области се наричат горещи геномни точки за пренареждане (rearrangement genomic hotspots), свързани с епилепсия и други чести психоневрологични заболявания, като например шизофрения [Mefford and Mulley, 2010]. В едно от основните проучвания Helbig и съавт. [2009] установиха 15q13.3 микроделеции при 1% от ИГЕ (12/1223 случая)

като най-честата наследствена причина (предразположение) за епилепсия, открита до момента. Повечето от техните случаи са били без коморбидности като интелектуален дефицит, аутизъм и шизофрения, които преди това са били установени като свързани с нарушение в региона 15q13.3 [Helbig et al., 2009; Stein 2009; Mulley and Dibbens, 2009]. ИГЕ субсиндромите, свързани с такова нарушение в 15q13.3, са разделени на детска абсансна епилепсия (ДАЕ), ювенилна абсансна епилепсия (ЮАЕ) и ювенилна миоклонична епилепсия (ЮМЕ) [Helbig et al., 2009]. Авторите не установяват 15q13.3 микроделеции в голяма кохорта от контроли.

Всички микроделеции, докладвани до момента в хромозомен регион 15q13.3, покриват един общ ген: генът за α7 ацетилхолиновия рецептор (*CHRNA7*) [Helbig et al., 2009]. В това проучване се установяват също *CHRNA7* дупликации при 12 пациенти и 23 от контролите, поради което е било прието, че дупликациите (в тази много нестабилна област от генома) не представляват основен рисков фактор за ИГЕ [Stein 2009; Mulley and Dibbens, 2009].

1.1. ПОДБОР НА ГРУПА ПАЦИЕНТИ С ДИАГНОЗА ИДИОПАТИЧНА ГЕНЕРАЛИЗИРАНА ЕПИЛЕПСИЯ. КЛИНИЧНИ ДАННИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНАТА ГРУПА ПАЦИЕНТИ

Беше подбрана група от 100 неродствени пациента с различни ИГЕ синдроми, лекувани стационарно или проследявани амбулаторно в Детска неврологична клиника при МБАЛНП „Св. Наум”. Допълнително бяха изследвани 7 индивида, родственици на деца с епилепсия.

Демографски характеристики на изследваната популация

Неродствените пациентите в подбраната група бяха на възраст от 2 до 18 г. (n=100). Средната възраст в проучената популация е 8.2 години. Възрастта на начало на епилепсията е била в диапазона 10 мес. - 16 г., средно 7.2 години.

Класифициране на епилептичния синдром при изследваните индивиди

Класифицирането на епилепсията бе извършено съгласно съвременната Класификация на епилепсията и епилептичните синдроми [ILAE, 1989] с някои допълнения/уточнения, направени в Предложението за Класификация на Епилепсиите и Епилептичните Синдроми от 2001 г. [Engel J Jr., 2001]. Диагностицирането и определянето на синдромологичната принадлежност бе извършено въз основа на доминиращия вид епилептични пристъпи, възрастта на изявата им и електроенцефалографската (ЕЕГ) находка. Съгласно тази класификация бяха изследвани пациенти със следните епилептични синдроми:

1) детска абсанс-епилепсия (ДАЕ)

2) ювенилна абсанс-епилепсия (ЮАЕ)

3) ювенилна миоклонична епилепсия (ЮМЕ)

4) епилепсия с генерализирани тонично-клонични пристъпи (Е-ГТКП)

5) смесени ИГЕ-синдроми (С-ИГЕ), т.е. такива с различни генерализирани епилептични пристъпи (напр. абсанси+миоклонични+ГТКП+/-фебрилни гърчове, ФГ)

6) миоклонично-астатична епилепсия (МАЕ)

7) синдром на Jeavons (рефлексна фоточуствителна епилепсия с миоклонии на клепачите и абсанси)

8) абсансна епилепсия с ранно начало (РНАЕ), преди 3 годишна възраст

9) епилепсия с миоклонични абсанси (ЕМА)

<u>Честота на отделните ИГЕ синдроми</u>

Разпределението на пациентите според честотата на отделните ИГЕ синдроми в проучената кохорта от 100 пациенти е представено в Таблица 1 и Фигура 1 по-долу.

Таблица 1. Разпределение на пациентите според вида на епилептичния синдром.

ДАЕ	ЮМЕ	ЮАЕ	РНАЕ	МАЕ	ЕМА	Е-ГТКП	С-ИГЕ	Jeavons
35	20	2	5	7	2	10	10	5



Фигура 1. Графично представяне на разпределението на пациентите според вида на епилептичния синдром.

Изследваните родители са били, съответно със С-ИГЕ (2 души), ДАЕ (1 родител) и Е-ГТКП (1 родител).

В изследваната група доминират деца с ДАЕ, което отразява и голямата честота на този епилептичен синдром сред всички форми на епилепсия [ILAE, 1989], сред ИГЕ формите и в частност, в детско-юношеската популация.

<u>Наследственост за епилепсия сред изследваната популация</u>

За положителна фамилна история се приема и наличието на фебрилни гърчове (ФГ) при някои от родителите. Фамилност установихме общо при 21 пациенти с различни ИГЕ фенотипове. Разпределението сред различните ИГЕ синдроми е представено в Таблица 2.

Таблица 2. Честота на фамилност за епилепсия сред различните синдроми**.**

ДАЕ	Смесени	ЮМЕ	ЮАЕ	РНАЕ	ГТКП	ЕМА	Jeavons
8	3	2	1	2	2	2	1

При 8-те пациенти с ДАЕ с положителна фамилна история за ИГЕ, засегнатите родственици (винаги родители, а не сиблинги) най-често имаха ГТКП (4), 3 имаха ДАЕ и един родител е с данни за ФГ. Двамата пациенти с ЮМЕ и наследственост имат сиблинг със същата форма на епилепсия (ЮМЕ); при пациента с ЮАЕ засегнатият родител има ФГ; двете деца с РНАЕ имат родители с ГТКП; двете деца с ГТКП имат родител с ГТКП или ФГ; двете деца с ЕМА имат родител с ЕМА и ДАЕ, съответно. Детето със синдром на Jeavons има родител с ДАЕ. Таблица 3 по-долу представя в обобщен вид тези данни.

Таблица 3. Честота на наследствена епилепсия, ФГ и наблюдавани фенотипове.

ДАЕ	СИГЕ	ЮМЕ	ЮАЕ	РНАЕ	ГТКП	ЕМА	Jeavons
4 – ГТКП 3 – ДАЕ 1 - ФГ	3- СИГЕ	2 - ЮМЕ	1 - ФГ	2 - ГТКП	1 - ГТКП	1 – ЕМА 1 - ДАЕ	1 - ДАЕ

Интелектуален дефицит бе установен при 13 от изследваните индивиди (13%). Разпределението на тези пациенти според честотата на ИГЕ синдромите е представено в Таблица 4 по-долу.

Таблица 4. Разпределение и честота на интелектуален дефицит според ИГЕ синдрома.

ДАЕ	МАЕ	СИГЕ	ЕМА	Jeavons
4	3	3	2	1

Сред пациентите с интелектуален дефицит 3 от децата с ДАЕ са имали засегнат родственик с епилепсия; фамилна изява на ЕМА е била налице при едно от децата с ЕМА и интелектуален дефицит. При пациентите с интелектуален дефицит е проведено психологично изследване за определяне на IQ. IQ тестовете са проведени с помощта на специализирани методи адаптирани за възрастта. Психологичното изследване при

пациентите с интелектуален дефицит (n=13, 13%) установи при всички лека степен на изоставане, т.е. IQ < 70 (до 55). Нито един от засегнатите родственици (родители) на тези деца не е бил с намален IQ.

Обобщените клинични данни са показани на Таблица 5.

Таблица 5. Клинични данни при подбраната група пациенти с ИГЕ (100 пациента).

	Брой пациенти	**Позитивна фамилна история**	**Интелектуален дефицит**
Детска Абсансна Епилепсия	36	8/36 (22%)	4/36 (11%)
Ювенилна Миоклонична Епилепсия	20	2/20 (10%)	-
Ювенилна Абсансна Епилепсия	2	1/2 (50%)	-
Абсансна Епилепсия с ранно начало	5	2/5 (40%)	-
Миоклонична-астатична епилепсия	7	-	3/7 (43%)
Епилепсия с миоклонни абсансни	2	2/2 (100%)	2/2 (100%)
Епилепсия с генерализирани тонично-клонични пристпи	11	2/11 (18%)	-
IGE – некласифицирана	12	3/12 (25%)	3/12 (25%)
Jeavons синдром	5	1/5 (20%)	1/5 (20%)
Общо	100	21/100 (21%)	13/100 (13%)

Невrофизиологично (ЕЕГ) верифициране на епилепсията

При всички пациенти бе проведено електроенцефалографско (ЕЕГ) изследване. Изследванията бяха извършени в Детска неврологична клиника при МБАЛНП „Св. Наум”. Проведената видео-ЕЕГ даде възможност за верифициране на клинично изявени пристъпи и беше постигнато по-точно класифициране на епилептичния синдром.

Невроизобразяващи изследвания

При всички деца и 4-мата изследвани родители с епилептични пристъпи е проведено компютър-томографско (КТ) изследване на главен мозък. При 4 деца е проведено магнитно-резонансна томография (МРТ). При нито един от изследваните индивиди КТ и/или МРТ не са показали патологични изменения, които могат да бъдат свързани етиологично с епилепсията, а някои отклонения (вкл. при случай 1 по-долу) са били интерпретирани като случайна находка, без причинно-следствена връзка със заболяването (както е известно от практиката и литературата).

1.2. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

В хромозомен регион 15q13.3 е известно наличието на хомоложни последователности с права и обратна посока, което създава предпоставки за реаранжировки в региона и обуславя горещо място за протичане на хомоложна рекомбинация. Такива региони се наричат точки на разкъсване (Break points – BP). Публикуваните данни от последните години показват, че сред пациентите с IGE честотата на 15q13.3 микроделеция достига около 1% и се приема за копиен вариант специфичен за IGE [Helbig et al., 2009]. Освен микроделеции в региона се откриват и микродупликации. Най-честата от тях обхваща само *CHRNA7* гена. Влиянието на тази микродупликация върху тежестта и/или изява на епилепсия е спорно, защото освен при пациенти с IGE е откривана и при здрави контроли [Helbig et al., 2009]. Приема се, че дупликациите, ако въобще са свързани с епилепсия, то това е в значително по-ниска степен спрямо микроделеции в същия регион [Helbig et al., 2008; Stein, 2009].

При подбраната група пациенти беше проведен MLPA анализ за големи делеции/дупликации в хромозомен регион 15q13.3. При двама пациенти беше открита промяна в броя копия (CNV) в изследвания хромозомен регион:

- една делеция - del[15q13.2 - *MTMR15, TRPM1, KLF13, CHRNA7* – 15q13.4]
- една дупликация с размер ~ 500 kb, ангажираща само един ген *CHRNA7*

При пациентите с изменения в хромозомен регион 15q13.3 и техните семейства беше проведена и сравнителна геномна хибридизация (array CGH).

Тези два случая са представени по-подробно като клинични и генетични характеристики на изследваните пациенти и техните роднини.

Случай I – делеция в 15q13.3 региона

Клинични данни

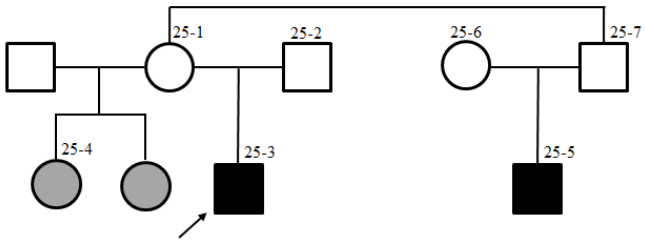
Касае се за момче на 12г. с диагноза Детска Абсанс-Епилепсия. Пациентът е проследяван в продължение на 4 години по повод на абсанси и лек интелектуален дефицит (психологичното изследване установи IQ=64, при наличие на ало-/автоагресия). Детето е родено от 4-та нормално протекла и завършила бременност, с т.т. 3100 г, без данни за асфиксия. Проходил е на 18 м., налице е изоставане в речевото развитие. Епилептичните пристъпи са с начало 8 г. възраст, с характер на типични абсанси, многократни през деня. Пристъпите са верифицирани и в ЕЕГ профила. Поради нередовна терапия абсансите, както и типичната генерализирана пароксизомална активност в ЕЕГ са персистирали в

следващата една година. Клинично бяха докладвани изразени поведенчески промени – агресия и автоагресия, на фона на овладяни пристъпи и нормализирана ЕЕГ.

Фамилност

1) Родителите отричат пристъпи с възможен епилептичен характер при самите тях.

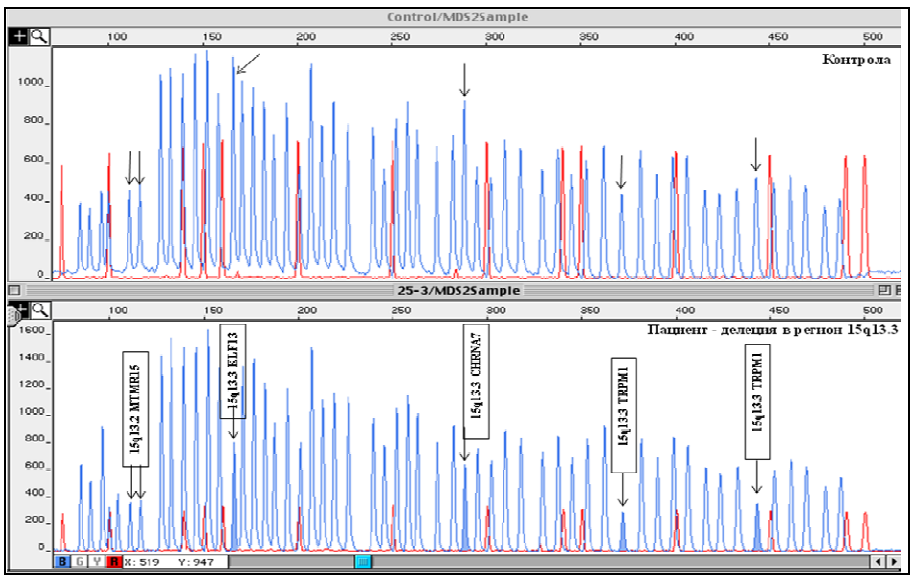
2) Майката има две по-големи дъщери от предишен брак (родословно дърво – Фигура 2), които, по думи на майката, са лекувани за епилепсия в детска възраст. Пристъпите не приличат на тези на пробанда - най-вероятно са имали големи припадъци (*т.е. ГТКП*) или фебрилни гърчове. Едната полусестра към момента отказва генетично изследване. Вуйчото на пациента има син с епилептични пристъпи, които също са различни от тези на пробанда (Фигура 2).



Фигура 2. Родословно дърво при пациент с ИГЕ.

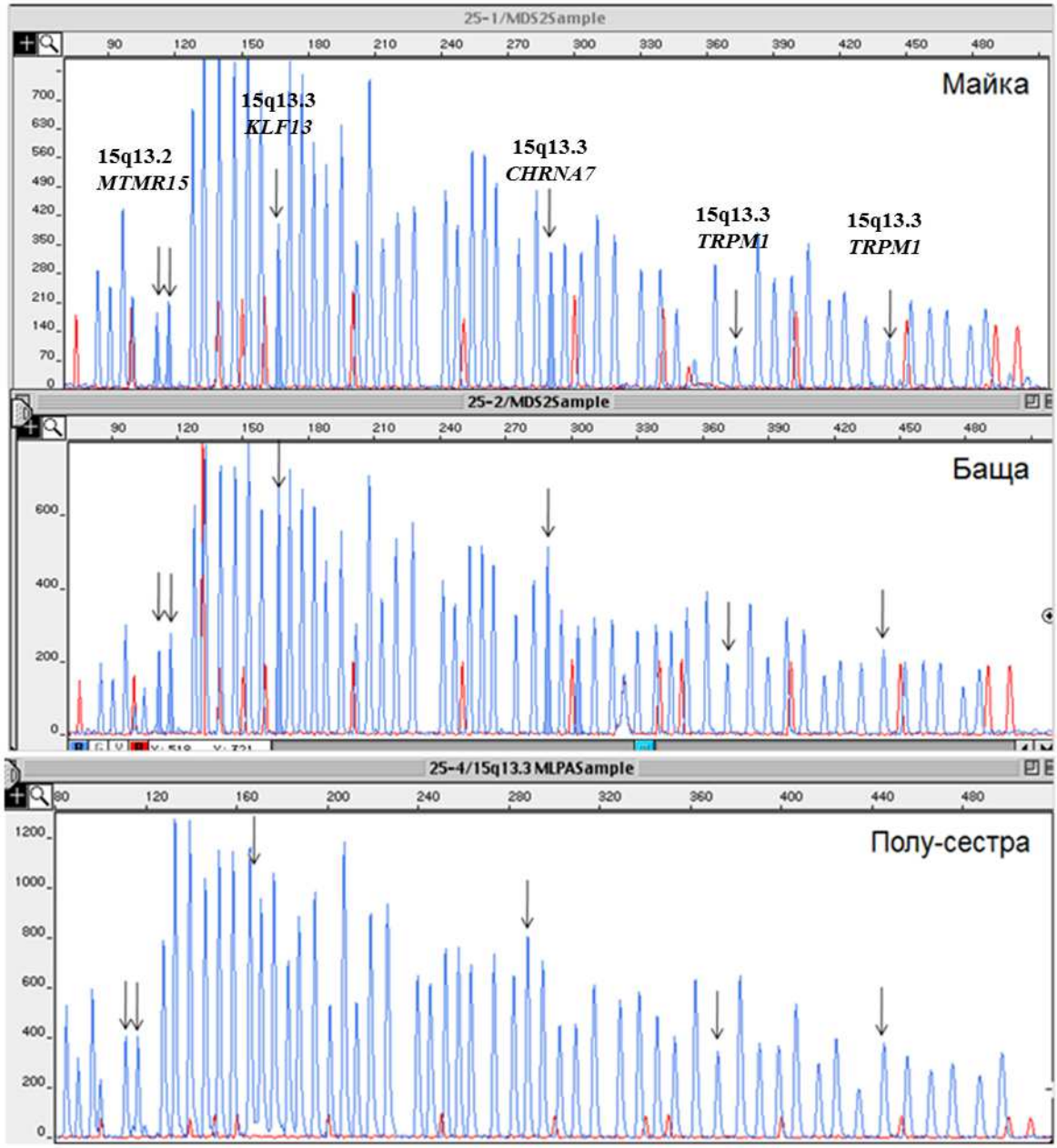
Молекулярно-генетичен анализ

Проведеният MLPA анализ при индексния пациент 25-3 показа наличието на делеция в хромозомен регион 15q13.3. Електрофоретичният профил при индексния пациент в сравнение с контрола е показан на Фигура 3.



Фигура 3. Електрофоретичен профил при MLPA анализ на пациент с делеция в регион 15q13.3 спрямо контрола. Намалените наполовина пикове при пациента са обозначени със стрелки и са оказани съответните гени, които са засегнати от делецията. Съответстващите нормални пикове при контролна проба са показани със стрелки.

Откритата делеция в индексния пациент и наличието на други родственици с данни за епилептични пристъпи провокира нашия интерес да изследваме всички налични родственици и да потърсим връзка генотип-фенотип в рамките на това родословие, както и да направим опит да изясним приноса на делецията за изява на епилепсия в конкретното семейство. Резултатите от MLPA анализа на роднините са представени на Фигура 4.



Фигура 4. Електрофоретични профили при MLPA анализ на майка, баща и полу-сестра на пациент с делеция в регион 15q13.3. Намалените наполовина пикове при майката са обозначени със стрелки и са посочени съответните гени, които са засегнати от делецията. Съответстващите нормални пикове при останалите роднини са показани със стрелки.

В допълнение беше проведена математическа обработка за оценка на делецията с цел по-прецизната интерпретация и минимализиране на отклоненията. Математическата оценка беше извършена с помощта на следната формула:

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

Резултатите от математическата обработка са представени в Таблица 6.

Таблица 6 Относително съотношение на пиковете в региона на делецията.

Ген	**Относително съотношение на пиковете**			
	Майка	**Баща**	**Пациент**	**Полу-сестра**
MTMR15	0.50	≈1	0.38	≈1
MTMR15	0.48	≈1	0.39	≈1
KLF13	0.54	≈1	0.45	≈1
CHRNA7	0.46	≈1	0.42	≈1
TRPM1	0.50	≈1	0.56	≈1
TRPM1	0.52	≈1	0.56	≈1

Получените съотношения бяха интерпретирани както следва:

съотношение около 1 – нормален резултат

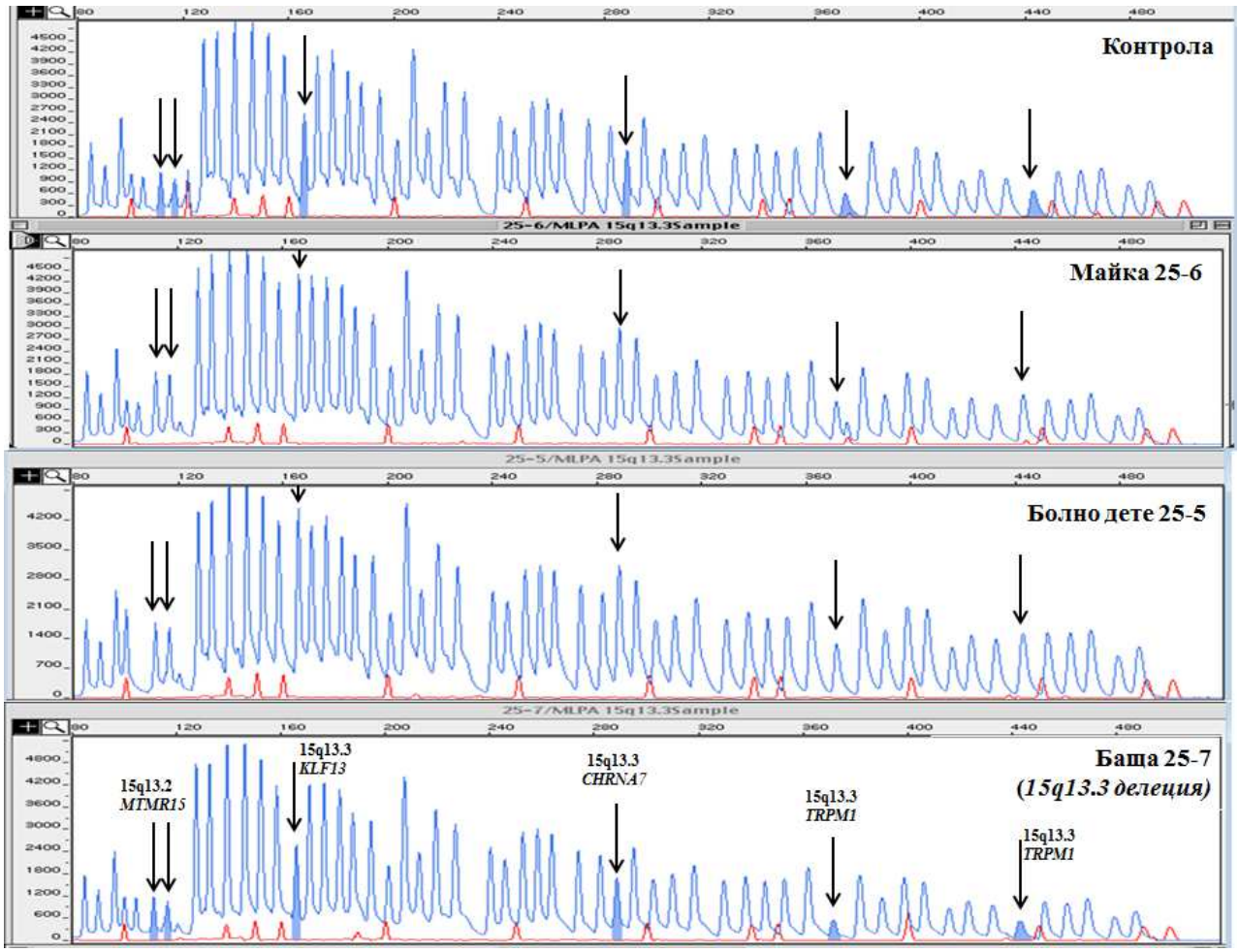
съотношение <0.6 – делеция

Проведеният математически анализ потвърди наличието на делеция в хромозомен регион 15q13.3 при индексния пациент и неговата асимптоматична майка. Бащата, както и изследваната полусестра не са носители на генетичния дефект.

В страничен клон на същото родословие (25-5) бяха установени също епилептични пристъпи и интелектуален дефицит, поради което молекулярно-генетичните изслеедвания обхванаха и пациенти 25-5, 25-6 и 25-7 (виж родословното дърво на Фигура 2). Резултатите от MLPA анализа са показани на Фигура 5.

Бащата от този клон също се оказа асимптоматичен по отношение на епилепсия носител на делецията, открита в другия клон на родословието: при неговата асимптоматична сестра и племенник с епилепсия. Тук обаче, болното дете с епилепсия и интелектуален дефицит не е унаследило делецията. Епилепсията при пациент 25-5 е с друг характер и очевидно не се дължи на CNV в региона 15q13.3. Проведеният молекулярно-

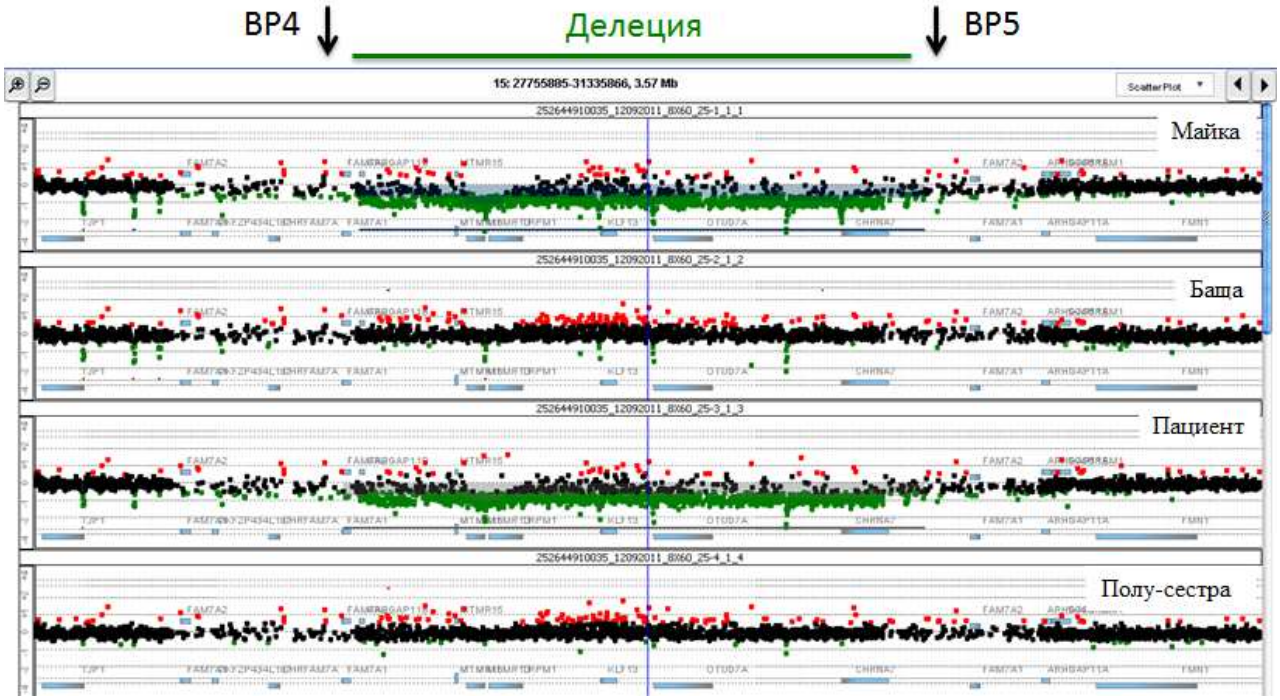
генетичен анализ не откри друг дефект, който да обясни наблюдаваната клиника при пациент 25-5, поради което той остава обект на бъдещи изследвания.



Фигура 5. Електрофоретичин профили при MLPA анализ на родственици на пациент с делеция в регион 15q13.3. Намалените наполовина пикове при бащата и съответстващите нормални пикове при контролна проба и останалите роднини са показани със стрелки. При бащата с делеция са обозначени и съответните гени, които попадат в делецията.

Чрез MLPA анализ не е възможно прецизно картиране на границите на делецията. Това затруднява прецизната интерпретация на делецията по размер и генотип-фенотип корелациите. Наложи се използване на array CGH анализ за потвърждаване на открития дефект и прецизиране границата на делецията. Сравнителната геномна хибридизация е проведена по линия на международно сътрудничество с Assist. Prof. Heather Mefford, Department of Pediatrics, Division of Genetic Medicine, University of Washington, WA, U.S.A.

Резултатите от проведеният array CGH анализ са показани на Фигура 6.

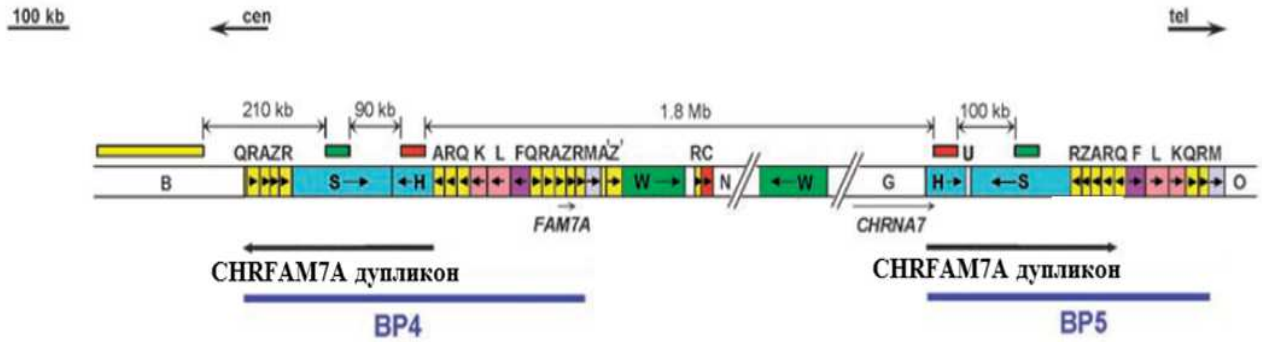


Фигура 6. Сравнителна геномна хибридизация (array CGH) при семейството на пациент с делеция в хромозомен регион 15q13.3. На абсцисата е изобразен хромозомният регион 15q13.3. На ординатата са отбелязани броят копия в сравнение с нормална контрола (от -4 до +4). Всички региони с нормален брой копия са представени с черен цвят, регионите с по-малък бр. копия (загуба на копие) са отбелязани в зелено, а тези с повишен брой копия – в червено.

При пациента и неговата майка се наблюдава намален сигнал за сондите в регион 15q13.3 (струпване на зелен цвят), като така дефинираната делеция попада между точки на счупване (break points – BP) – BP4 и BP5. Резултатите при бащата и полу-сестрата са нормални.

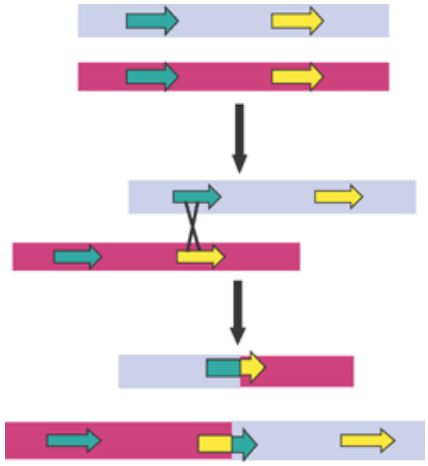
Получените резултати от array CGH потвърждават напълно резултатите от MLPA анализа и в допълнение определят размерите на делецията: тя попада между точки на счупване BP4 и BP5 и не се простира до хромозомен регион 15q11-13, което изключва делеционната форма на Prader–Willi синдром (MIM #176270), заболяване което също се характеризира с интелектуален дефицит и епилепсия.

Дългото рамо на 15-та хромозома се характеризира с наличието на т.нар. точки на счупване (break point - BP), които представляват „горещи“ места за хромозомни реаранжировки. Към момента са известни 6 BP в региона 15q11-q14 [Riley et al., 2002]. Регионът 15q13.3 се характеризира с наличието на дипликация на част от *CHRNA7* гена (виж литературен обзор, стр. 14). Части от гените *CHRNA7A* и *FAM7A* формират фузионен псевдоген *CHRFAM7A*. Получават се два дупликона с противоположна ориентация представени на Фигура 7.



Фигура 7. Модел разположение на дупликон, съдържащ *CHRFAM7A* [Flomen et al., 2008].

Тези дуплицирани региони са с обратна посока (виж Фигура 7, стрелките на дупликоните) и са основен компонент на BP4 и BP5. Тези региони с висока степен на хомоложност създават вероятност за протичане на неалелна хомоложна рекомбинация (Non allelic homologous recombination - NAHR). NAHR е форма на хомоложна рекомбинация, която се осъществява между два участъка от ДНК с висока степен на идентичност, без това да са алели на един и същи ген [Hurles and Matthew, 2006], (Фигура 8).

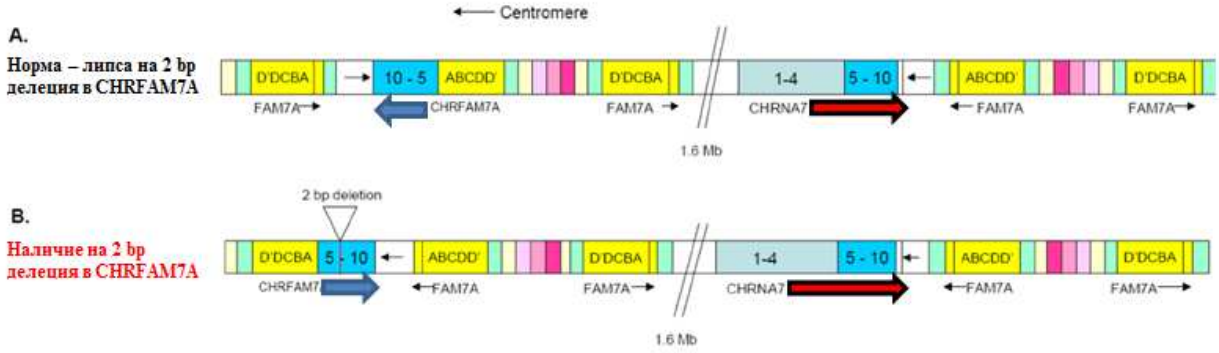


Фигура 8. Схема на протичане на неалелна хомоложна рекомбинация.

При протичане на NAHR е възможно възникване на делеция или дупликация и поради това наличието на елементи с висока степен на сходство създава горещи места за генетични реаранжировки.

Изследванията на Flomen и сътрудници [2008] изказаха предположение за съществуването на *CHRFAM7A* фузионен ген в две ориентации – права и обратна спрямо посоката на *CHRNA7* гена. Същите автори описват полиморфизъм 2 bp делеция (c.497-498delTG*)* в екзон 6 на *CHRFAM7A* и интерпретират полиморфизма като имащ отношение към посоката на *CHRFAM7A*. Този полиморфизъм е откриван само във фузионния ген и се

предполага, че възниква при инверсията на региона, съдържащ *CHRFAM7A*. При наличие на този полиморфизъм, фузионният псевдоген *CHRFAM7*A е с ориентация по посока на *CHRNA7* гена. При липса на 2 bp делеционния полиморфизъм псевдогенът е с обратна ориентация спрямо *CHRNA7* гена (Фигура 9).



Фигура 9. Схематична карта на *CHRNA7* гена и частичната му дупликация в *CHRFAM7A*.
(A) Див тип *CHRFAM7A* – липса на 2 bp делеция. Наблюдава се противоположна посока на *CHRFAM7A* (синя стрелка) спрямо *CHRNA7* гена (червена стрелка).
(B) Делеция на 2 bp в екзон 6 на *CHRFAM7A* и свързаната с него инверсия [Sinkus et al., 2009]. Наблюдава се еднаква посока на *CHRFAM7A* (синя стрелка) и *CHRNA7* гена (червена стрелка).

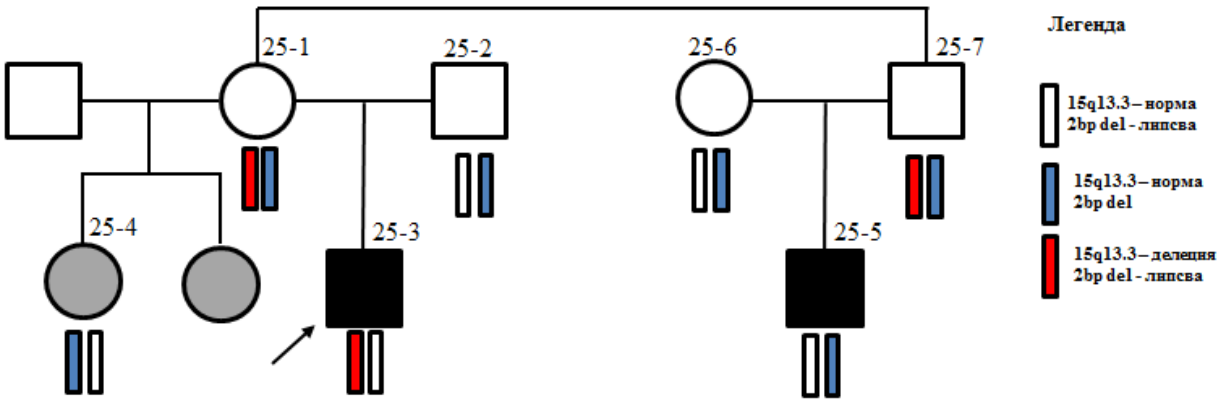
Към момента не е ясно дали *CHRFAM7A* псевдогенът се транслира и дали има експресия. Възможно е транслационният продукти на *CHRFAM7A* да взаимодейства с тези на *CHRNA7* и да играе ролята на доминантно негативен регулатор [Flomen et al. 2008]. Това взаимодействие може би се повлиява от липсата/присъствието на 2bp делеционния полиморфизъм. Друг фактор, влияещ на това взаимодействие между транскрипционните продукти може би е ориентацията на фузионния ген [Flomen et al. 2008].

Интересно е предположението, че микроделецията в 15q13.3 може би е по-вероятно да възникне, когато псевдогенът е с права ориентация спрямо *CHRNA7* гена в дуплицирания сегмент [Makoff & Flomen, 2008]. Предполага се, че еднаквата ориентация на елементи с близка секвенция улеснява протичането на неалелна хомоложна рекомбинация, докато обратната посока подтиска нейното протичане.

Тези хипотези провокираха нашия интерес да проверим 2bp делеционния полиморфизъм при семейството на пациента с 15q13.3 делеция. Изследванията показаха наличието на 2 bp делеция в хетерозиготно състояние при двамата родители и полу-сестра на пациента и отсъствието ѝ при пациента.

Проведен беше и анализ при страничния клон на семейството (25-5, 25-6, 25-7). Изследванията показаха наличието на 2 bp делеция в хетерозиготно състояние при двамата родители и детето с епилепсия.

Обобщените резултати относно 15q13.3 делецията и 2 bp полиморфизма са представени върху родословното дърво (Фигура 10).



Фигура 10. Родословно дърво при пациент с ИГЕ и резултатите от проведените молекулярно-генетични изследвания.

Отсъствието на полиморфизма при пациента с 15q13.3 делеция, за разлика от неговата майка носителка на делецията и полиморфизма означава, че полиморфизмът и делецията в 15q13.3 региона са разположени на различни алели и най-вероятно няма връзка между механизма на възникване на едното и другото делеционно събитие.

Нашите резултати противоречат на хипотезата, че неалелна хомоложна рекомбинация довела до възникването на 15q13.3 делецията е възникнала при еднаква посока на *CHRFAM7*A гена и наличие на 2bp делеционния полиморфизъм [Flomen et al., 2006]. Други автори изследват полиморфизма в светлината на фенотипната му изява и също не откриват връзка между наличието/отсъствието на полиморфизма и различни фенотипни изяви (шизофрения и когнитивни нарушения), при пациенти, които носят 15q13.3 делеция [Petrovsky et al., 2009].

Може да се заключи че наличието на 2bp делеционният полиморфизъм не е асоциирано с делеции в 15q13.3 региона. Може да се отбележи, че асимптоматичните носители на делецията, носят полиморфизма, докато индексния пациент с 15q13.3 делеция не носи полиморфизма и е с изявана ИГЕ. Възможно е наличието на *CHRFAM7*A транскрип да оказва модифициращ ефект върху фенотипната изява на *CHRNA7*.

Нашите данни показват честота на делеции в региона 15q13.3 1% (1/100), което е в корелация с изследванията на други автори през последните години [Helbig, et al. 2009; Rosenfeld, et al. 2011]. Helbig и съавт. [2009] установяват честота на носителство 5/576 (0.87%). Според други данни, в 0.5% до 1% от пациентите във всички кохорти с ИГЕ са носители на делеции в хромозомен регион 15q13.3 [Mefford and Mulley, 2010]. До момента

такива делеции не са установени в над 3 000 пациенти с фокални епилептични синдроми и поради това се приема, че носителството на 15q13.3 е рисков фактор, специфичен за ИГЕ синдромите [Mefford and Mulley, 2010]. Делеции в други хромозомни региони като 15q11.2 и 16p13.11, са установени и при фокални, и при генерализирани синдроми [de Kovel, et al., 2009; Mefford, et al., 2010], което прави 15q13.3 микроделецията единствения към момента патологичен CNV, уникално свързан с ИГЕ.

Редица изследователи докладват, че откритите делеции в 15q13.3 региона често са унаследени от асимптоматичен родител. Това предполага наличието на други генетични и епигенетични фактори, които имат отношение към фенотипната проява на делециите в региона 15q13.3.

При нашия пациент е налице клинично съчетание от детска абсанс-епилепсия и лека умствена изостаналост, което според Helbig и сътрудници е най-честият фенотип при 15q13.3 микроделеционния синдром в рамките на ИГЕ [лична комуникация, 2012]. Приема се хипотетично, че хаплоидното съдържание на 15q13.3 областта понижава гърчовия праг (т.е. повишава вероятността да се прояви епилептичен гърч) и влияе негативно върху интелекта на носителите [Mefford and Mulley, 2010]. Различни други генетични варианти проявяват подобен ефект. Някои носители на делеция не страдат от епилепсия поради това, че техният генетичен профил съдържа малък брой „патологични“ варианти, асоциирани с предразположение към епилепсия [Mefford and Mulley, 2010]. Аналогично е манифестирането на интелектуалния дефицит. Някои носители не проявяват IQ дефицит, поради това, че техният IQ е достатъчно висок, за да може дори при наличен ефект на 15q13.3 делецията да остане в границите на нормата. Други, обаче, които имат IQ с т.нар. „гранични стойности”, ще покажат IQ дефицит, поради клиничната изява на вариацията в броя копия [Mefford and Mulley, 2010]. Това показва че фенотипната изява всъщност е комплесна и е функция на целия генетичен профил, а не само на конкретен вариант в броя копия на отделен регион.

Случай II – дупликация на *CHRNA7* гена

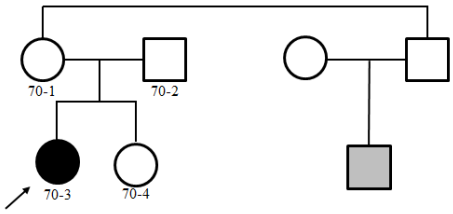
Клинични данни

Пациентката е на 13 г., родена нормално, без данни за асфиксия. Лекувана е двукратно по повод „пристъпи след заспиване”, по описание – миоклонии с различно разпространение и малка продължителност, както и 3 ГТКП по време на сън. Въпреки назначената терапия, пристъпите при заспиване персистират, родителите съобщават за повишена сънливост и дълъг сън (12-14 часа). В проведената видео-ЕЕГ след сънна

депривация са регистрирани многобройни двигателни феномени, най-чести в началните стадии на съня. Епилептични пристъпи не са регистрирани.

Фамилна история

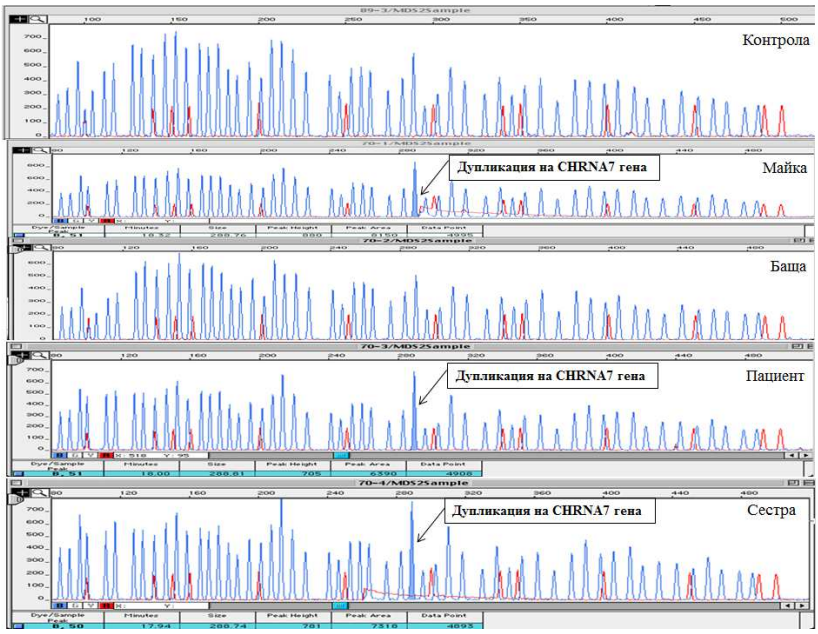
Детето има по-голяма здрава сестра. Съобщава се обаче, за братовчед по майчина линия с неясен единичен пристъп на 27 г. възраст. Родословното дърво е показано на Фигура 11.



Фигура 11. Родословно дърво при пациент с ИГЕ и дупликация на *CHRNA7* гена.

Молекулярно-генетичен анализ

Извършеният MLPA анализ при пациента показа наличието на микродупликация в изследвания регион. В допълнение дупликацията бепе открита и при здравата сестра и асимптоматичната майка. Единствено бащата от това семейство не носи дупликацията. Резултатите са показани на Фигура 12.



Фигура 12. Електрофоретичен профил при MLPA анализ на пациент с дупликация на *CHRNA7* гена и неговото семейство.

Математическата обработка за по-прецизна интерпретация на резултатите от MLPA анализа е направена по формулата:

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

Резултатите от математическата обработка са представени в Таблица 7.

Таблица 7. Математическата обработка на резултатите от MLPA анализа.

Ген	Относително съотношение на пиковете			
	Майка	**Баща**	**Пациент**	**Полу-сестра**
CHRNA7	1,98	≈1	2.06	2.04

Получените съотношения бяха интерпретирани както следва:

съотношение около 1 – нормален резултат

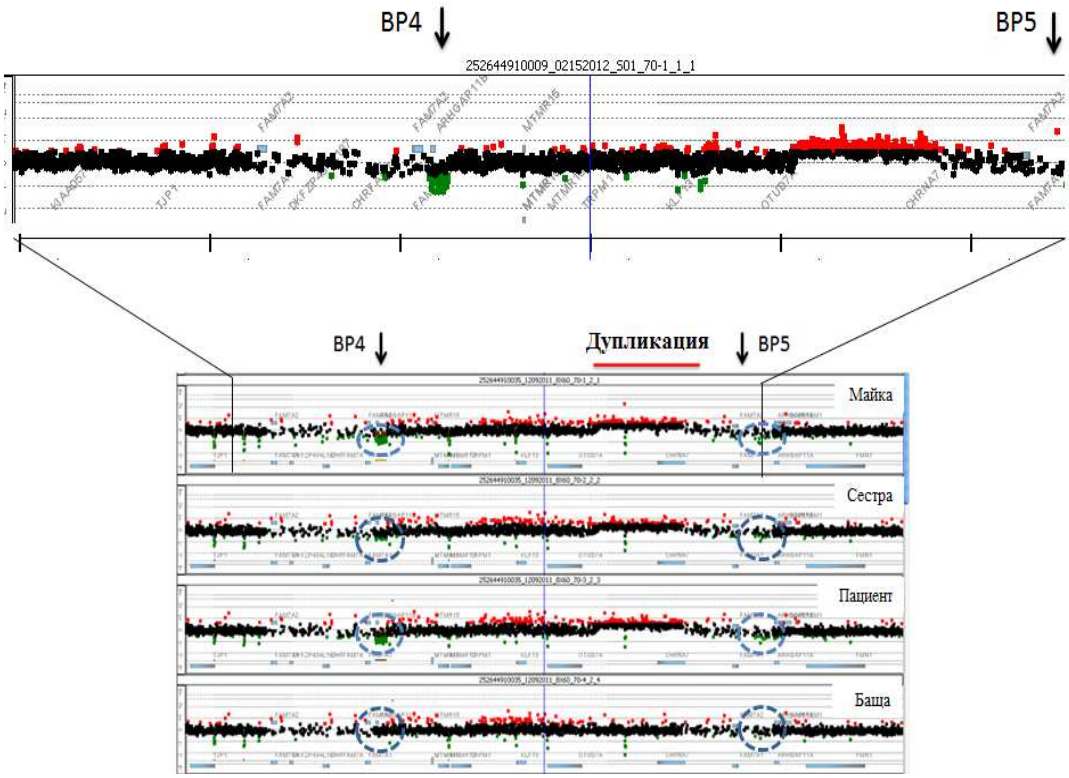
съотношение >1.6 – дупликация

Проведеният математически анализ потвърди резултатите от MLPA анализа: наличието на дупликация в *CHRNA7* гена, разположен в хромозомен регион 15q13.3 при индексната пациентка, нейната здрава сестра и тяхната асимптоматична майка. Бащата не е носител на дупликацията.

С цел потвърждаване на дупликацията и изследването й като размер и граници се наложи използване на втори метод – array CGH анализ. Сравнителната геномна хибридизация е проведена по линия на международно сътрудничество с Assist. Prof. Heather Mefford, Department of Pediatrics, Division of Genetic Medicine, University of Washington, WA, U.S.A.

Резултатите от проведения array CGH анализ са показани на Фигура 13. Array CGH показва дуплициран сигнал за сондите в региона на *CHRNA7* гена (сондите са означени с червен цвят). Дупликацията не обхваща целия регион между BP4 и BP5. Това предполага, че механизмът на възникване на дупликацията е различен от механизма провокиращ делеция в региона (виж по-горе при пациента с 15q13.3 делеция).

Сравнителната геномна хибридизация в допълнение показа наличието на 2 малки делеции попадащи точно в горещите точки на разкъсване BP4 и BP5 (оградени с пунктирана окръжност). При бащата, единственият който не носи дупликация, не се откриват тези делеции (регионите също са оградени за сравнение). Делециите се наблюдават при пациентката, нейната сестра и майката, т.е. при всички носители на *CHRNA7* дупликация. Профилът на двете малки делеции при сестрата е различен в сравнение с този при майката и индексния пациент, които са идентични.

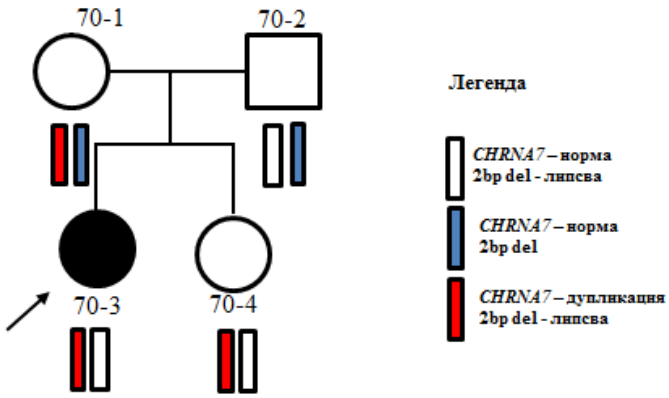


Фигура 13. Сравнителна геномна хибридизация (array CGH) при семейството на пациент с дупликация в хромозомен регион 15q13.3. На абсцисата е изобразен хромозомния регион 15q13.3. На ординатата са отбелязани броят копия в сравнение с нормална контрола (от -4 до +4). Всички региони с нормален брой копия са представени с черен цвят, регионите с по-малък бр. копия (загуба на копие) са отбелязани в зелено, а тези с повишен брой копия – в червено.

На база на получените резултати и познанията ни относно архитектурата на 15q13.3 региона беше предположено, че най-вероятно делециите са възникнали заедно с дупликацията при протичане на хромозомните реаранжировки в региона. Най-вероятно се касае за първоначално възникване на голяма дупликация в региона между PB4 и PB5 чрез неалелна хомоложна рекомбинация. Това би дестабилизирало 15q13.3 региона, което предполага спонтанно делетиране на част от дупликацията.

Тъй като събитията се развиват между PB4 и PB5 и в това семейство беше проверено носителството на 2 bp делеционния полиморфизъм в *CHRFAM7A*, асоцииран с посоката на фузионния ген и на тази база евентуално повлияващ вероятността за протичане на неалелна хомоложна рекомбинация.

Проведеният молекулярно-генетичен анализ показа носителство в хетерозиготно състояние на 2 bp делеционния полиморфизъм в *CHRFAM7A* при двамата родители и отсъствието му при двете деца. Обобщените резултати относно дупликацията и 2 bp полиморфизма са представени върху родословното дърво (Фигура 14).



Фигура 14. Родословно дърво при пациент с ИГЕ и резултатите от проведените молекулярно-генетични изследвания.

Отсъствието на полиморфизма при пациентката с 15q13.3 микродупликация и нейната здрава сестра със същата дупликация, за разлика от тяхната майка носител на дупликация и 2bp делеция означава, че полиморфизмът и дупликацията в 15q13.3 региона са с транс-разположение, т.е. намират се на различни алели и най-вероятно няа връзка между механизма на възникване на двете събития. Получените резултати в семейството с дупликация в хромозомен регион 15q13.3 са аналогични на тези при семейството с делеция. Може да се заключи, че наличието на 2bp делеционният полиморфизъм не е асоциирано с хромозомни реаранжировки в 15q13.3 региона.

В литературата има няколко предложени механизма за възникване на различни дупликации в региона на *CHRNA7* гена [Szafranski et al., 2010]. Към момента междинните генни реаранжировки, предположени от тези модели, не са доказани, най-вероятно поради тяхната нестабилност. Получените в настоящия дисертационен труд резултати предполагат протичането на голяма дупликация с последващо отпадане на генетичен материал. Остава въпросът за точния механизъм на протичане на тези реаранжировки. Получените в настоящия дисертационен труд резултати показват, че най-вероятно 2bp делеционният полиморфизъм и съответната ориентация на *CHRFAM7*A дупликоните не участват в този механизъм на възникване на 15q13.3 реаранжировки.

При изследване на група от 100 пациента с IGE, нашите данни показват честота на дупликации в региона 15q13.3 1% (1/100). Дупликации в региона 15q13.3 не бяха открити при 10 здрави контроли. Данните за прицелната група ИГЕ пациенти са в корелация с изследванията на други автори през последните години [Helbig, et al. 2009]. Микродупликации на *CHRNA7* гена са открити както при пациенти с ИГЕ (0,98%), така и при здрави контроли (0,62%), което показва, че наличието на дупликация не е рисков фактор за изява на ИГЕ фенотип [Helbig et al., 2009]. В изследваната от нас контролна група

здрави пациенти дупликация не беше открита, най-вероятно поради малкия брой пациенти в групата.

1.3. Обобщение на получените резултати

Подбраната група от 100 пациента беше клинично добре охарактеризирана. Набирането на пациентите е последователно, а не ретроспективно и е проведено в един клиничен център, което позволява стриктно спазване на критериите за включване към групата пациенти с ИГЕ. Последователният подбор осигурява минимални отклонения в резултатите, дължащи се на ретроспективна селекция на пациентите и намалява риска от неточности и смесен фенотип в групата за изследване.

С работата по настоящата научна разработка успешно беше въведена за рутинна диагностика методика на базата на MLPA анализ за детекция на делеции и дупликации в 15q13.3 региона.

Проведеният MLPA анализ при прицелната група пациенти с ИГЕ показа наличието на един пациент с делеция в региона [15q13.2 - *MTMR15, TRPM1, KLF13, CHRNA7* – 15q13.4] и един пациент с микродупликация, обхващаща *CHRNA7* гена. Получените честоти на делеции (1%) и дупликации (1%) при изследваната група пациенти корелират със съобщаваните в световната литература. Съответствието между нашите и световните данни показва, че успешно сме се справили с подбора на групата и клиничното охарактеризиране на изследваните пациенти.

Получените резултати при изследване на CNV в хромозомен регион 15q13.3 показват, че делеции, но не и дупликации в 15q13.3 региона могат да допринасят за изява на ИГЕ фенотип. Въпреки това, наличието на делеция, само по себе си не е достатъчно за изява на ИГЕ фенотип. Делеционни CNVs водят до предразположение към пристъпи, като се понижава прага за тяхното възникване. Колкото повече се снижава този праг, толкова по-вероятно е пристъпите да се проявят. Поради това се предполага, че пристъпите са резултат от комплексно понижаване прага на епилепсия под действието на набор от фактори – генетични (CNVs, мутации) и епигенетични.

Получените резултати при изследваната група с идиопатична генерализирана епилепсия бяха публикувани в международно списание - Epilepsy Research, 2013 и бяха представени в две постер сесии на международни конгреси - ESHG Conference, 2011, Amsterdam, The Netherlands; Национален Конгрес по Неврология, Боровец, България и 9th Balkan Meeting of Human Genetics, Timisoara, Romania, 2011.

4.2. СИНДРОМ НА RETT

Rett синдром **(RTT, OMIM #312750)** е тежко прогресивно невродегенеративно заболяване, засягащо предимно момичета. Честотата на заболяването е 1:10 000, 1:15 000 [Hagberg et al., 1997]. Наред с умствено изоставане, епилепсия се наблюдава при 70% до 90% от пациентите с класически синдром на Rett [Cooper at al.,1998a,b; Nagie & Witt, 1989; Steffenbutg et al., 2001]. Пристъпите обикновено са от различни типове, включително комплексни, парциални, атипични абсансни и генерализирани тонично-клонични [Appleton, 2003]. Миоклоничните пристъпи често са трудни за различаване от типичните стереотипни движения, тремора на ръцете и дистонията, характерни за синдром на Rett [Moser at al., 2007; d'Orsi et al, 2009].

Синдромът на Rett се характеризира с широк фенотипен и генотипен спектър. Това силно затруднява генотип-фенотипните корелации.

2.1. КЛИНИЧНИ СИМПТОМИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНАТА ГРУПА МОМИЧЕТА С ДИАГНОЗА RETT СИНДРОМ

Поради огромното разнообразие от клинични симптоми, съпровождащи RTT, през 2010 година критериите за заболяването бяха ревизирани.

Обект на изследване в настоящия дисертационен труд бяха 37 момичета с RTT. При интерпретацията на резултатите групата е увеличена с още 39 пациента [Тодоров Т, 2011, дисертационен труд], като по този начин обхваща всички пациенти изследвани за RTT в България.

Пациентите в изследваната група бяха разпределени в четири групи на базата на клиничната симптоматика:

- класически Rett синдром с епилепсия
- класически Rett синдром без епилепсия
- атипичен Rett синдром с епилепсия
- атипичен Rett синдром без епилепсия

Клиничните симптоми са представени в Приложение 1. При атипичен (вариант) RTT е направен опит за прецизиране на варианта (Zapella, Henefeld и Rolando вариант) съгласно международните критерии [Neul et al., 2010].

При 6 от пациентите, насочени с клинична диагноза атипичен RTT, предоставените клинични данни частично или напълно не покриват критериите за синдром на Rett. Тези пациенти са с нарушения от аутистичния спектър, частично или изобщо непокриващи

критериите за RTT (като например липса на стереотипни движения на ръцете или регрес в НПР), наблюдава се:

1. Аутизъм
2. Липса на типичния „втренчен поглед“
3. Липса на епилептични епизоди
4. Нетипични ЕЕГ абнормалности
5. Изоставане в невропсихичното развитие (НПР), но без наличие на регрес
6. Част от пациентите посещават училище

При тези пациенти са проведени молекулярно-генетични изследвания съгласно поставената от насочващия лекар клинична диагноза „синдром на Rett”, въпреки противоречивите клинични данни. Молекулярно-генетичните изследвания не показват наличието на генетични дефекти в *MECP2* гена; при един от тези пациенти хромозомният анализ показва делеция на късото рамо на Х-хромозомата, ангажираща гените *ARX* и *CDKL5*. Поради противоречивите клинични данни и негативните молекулярно-генетични резултати тези пациенти са извадени от групата при статистическата обработка на резултатите.

Степента на интелектуален дефицит в групата пациенти варира от лек (IQ=50-69) до много тежък (IQ<20). Като съпътстваща диагноза в някои от случаите се споменава аутизъм и симптоматична (криптогенна) епилепсия. Заболяването при всички представени случаи има прогресиращ характер. Началото на заболяването варира между първите месеци след раждане и 3 годишна възраст.

При всички изследвани случаи липсват говорни умения и се наблюдава загуба на социален контакт. Друга характерна особеност при всички засегнати деца от тази група е наличието на стереотипни движения на ръцете (симптом на „миещи ръце”) и краката. Моторното развитие при тези деца е също тежко засегнато. Наблюдава се мускулна хипотония, забавен растеж на главата, клатещо се нестабилно тяло или ходене на пръсти, сколиоза. В някои случаи самостоятелното придвижване е невъзможно. Гърчове и епилептични припадъци са регистрирани при 37 пациента (55%). Лицев дисморфизъм (микроцефалия) се наблюдава при около 1/4 от изследваните момичета.

Появяват се дихателни проблеми, които се задълбочават при стрес, дишането обикновено е нормално в спящо състояние и се появяват проблеми в будно състояние. Проблеми в циркулацията, водят до студени, посиняли крака и ръце. Ваксинации или прекарани инфекциозни заболявания се съобщават от родителите като отключващ фактор за поява на първите симптоми.

4.2.2. ЦИТОГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

Като първа стъпка в процеса на изясняване на диагнозата при пациенти с предполагаем Rett синдром се извършва хромозомен анализ (кариотип), с помощта на който могат да бъдат отдиференцирани големи хромозомни преустройства, ангажиращи гени на Х хромозомата и по този начин причиняващи симптоматика на Rett синдром.

Хромозомният анализ при всички изследвани пациенти показа нормален резултат.

В групата на пациентите, които не покриват критериите за RTT, при един пациент (ID 6-3) от Приложение 1 беше установен патологичен кариотип, делеция на късото рамо на Х хромозомата 46,XX,del(X)(p1.22).

4.2.3. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

Като база за системен подход при молекулярно-генетични изследвания на Rett синдром е използван алгоритъм, разработен от Тодоров и сътрудници [2011, дисертационен труд].

1. Секвениране на MECP2 гена

Изследванията започват с PCR/секвениране на екзоните и екзон-интронните граници на *MECP2* гена, където попадат точкови мутации, малки делеции и инсерции и комбинирани мутационни събития.

След пълното анализиране на кодиращата последователност, екзон/интронните граници и промоторната област на *MECP2* гена, се преминава към MLPA анализ за търсене на големи делеции и дупликации по дължината на *MECP2* гена. С помощта на този анализ с предишно проучване са били открити големя делеции на екзон 3 и част от екзон 4 на *MECP2* гена при двама пациенти [Тодоров Т, 2011, дисертационен труд].

Откритите мутации в предишно проучване - 10 пациента с мутации в *MECP2* гена [Тодоров Т, 2011, дисертационен труд] и тези обект на настоящия дисертационен труд (18 пациента с мутации в *MECP2* гена) са предоставени в Таблица 8, като пациентите са групирани на базата на клиничните симптоми с акцент върху наличие или отсъствие на епилепсия.

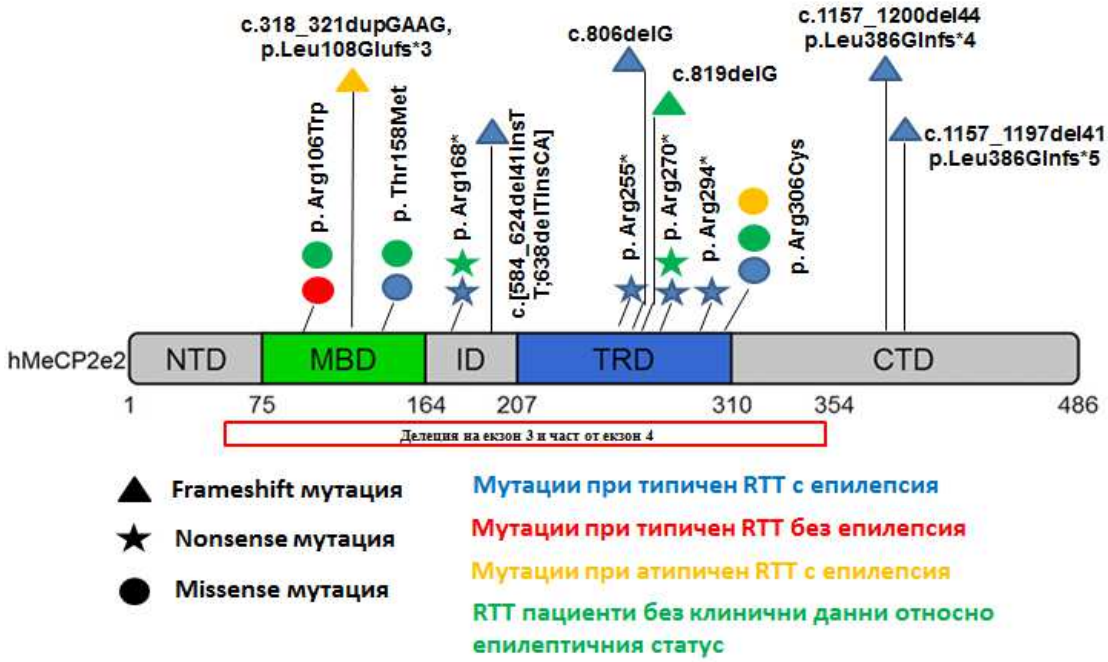
В хода на проведените молекулярно-биологични изследвания бяха открити мутации в *MECP2* гена при 28 пациента (28/70=40%) (Таблица 8). Това са всички пациенти в България с доказана мутация в *MECP2* гена. Точковите мутации засягат 11 различни нуклеотидни/аминокиселинни позиции.

Таблица 8. Резултати от молекулярно-генетичен анализ на *MECP2* гена при пациенти с RTT.

Синдром на Rett - типове	Мутации в *MECP2* гена	Пациенти	
		Тодоров, 2011	Настоящо проучване
Класически RTT с епилепсия **20 пациента** **15/20 = 75%**	c.27-8C>G		1
	c.473C>T, p.Thr158Met	1	2
	c.502C>T, p.Arg168*		1
	c.763C>T, p.Arg255*	1	2
	c.806delG, p.Gly269Alafs*20		1
	c.808C>T, p.Arg270*	2	1
	c.880C>T, p.Arg294*	1	1
	c.1157_1200del44, p.Leu386*fs	1	
Класически RTT без епилепсия **12 пациента** **4/12 = 33%**	Делеция на екзон 3 и част от екзон 4 (c.27-?_*?del)	2	
	c.[584_624del41insTT;638delTinsCA]	1	
	c.316C>T, p.Arg106Trp		1
Атипичен RTT с епилепсия **14 пациента** **2/14= 14%**	c.318_321dupGAAG, p.Leu108Glufs*3		1
	c.916C>T, p.Arg306Cys		1
Атипичен RTT без епилепсия **9 пациента**	Не се откриват мутации в *MECP2* гена	-	-
RTT пациенти с непълни клинични данни относно епилептичния статус **15 пациента** **7/15 = 47%**	c.316C>T, p.Arg106Trp		1
	c.473C>T, p.Thr158Met		1
	c.502C>T, p.Arg168*		1
	c.808C>T, p.Arg270*		1
	c.819delG		1
	c.916C>T, p.Arg306Cys	1	
	c.1157_1197del41		1

Всички описани до тук мутации в *MECP2* гена са свързани с тежка клинична симптоматика, бърза прогресия на заболяването и тежко засягане на психомоторното развитие на засегнатите деца.

Позицията на точковите мутации и малки делеции/инсерции в MeCP2 протеина са показани на Фигура 15.



Фигура 15. Схематично представяне на MeCP2 протеина и неговите домени – N-краен домен (NTD), метил-ДНК свързващ домен (MBD), междинен домен (ID), подтискащ транскрипцията домен (TRD) и С-краен домен (CTD).

Мутации се срещат във всички домени с изключение на N-крайния домен, но повечето са съсредоточени в двата най-важни функционални домена MBD и TRD.

Мутациите при пациенти с типичен RTT с епилепсия са разпръснати по продължение на *MECP2* гена с изключение на NTD домена. Това показва важността на функционалните домени – засягането на един от тях води до загуба на функционалност на MeCP2 протеина и развитие на RTT и епилепсия. Единствено при тези пациенти се наблюдават мутации в С-крайния домен.

Мутациите при пациенти с типичен RTT без епилепсия засягат MBD домена или водят до изместване рамката на четене на генетичната информация.

Мутациите при пациенти с атипичен RTT с епилепсия засягат двата основни функционални домена MBD и TRD. Домените са ключови за функционирането на протеина и вероятно повлияват епилептичния праг при пациентите.

Сплайс-сайт и missens точковите мутации и малки делеции бяха допълнително обработени със специализиран софтуер за предсказване ефекта на мутациите - Alamut - Interactive Biosoftware v2.2. Това се налага защото ефекта на тези два типа мутации не е напълно изяснен и може да се очаква по-лек фенотип в сравнение с nonsense и framesift мутациите, които теоретично водят до по-тежка фенотипна изява.

Всички без една (c.316C>T, p.Arg106Trp) точкови мутации в *MECP2* гена, обект на изследване в настоящия дисертационен труд, попадат в екзон 4b на *MECP2* гена. Missense

мутациите засягат различни по консервативност нуклеотиди, но винаги се променя високо консервативна аминокиселина от протеиновия домен за свързване с метилирана ДНК (Methyl-CpG DNA binding domein - MBD), което пряко повлиява функциите на MeCP2 протеина.

MBD играе роля на транскрипционен репресор и участва в заглушаването на редица гени, сред които е *BDNF* (Brain-derived neurotrophic factor) гена. Продуктът на *BDNF* гена спада към фамилия растежни фактори наречени невротрофини (neurotrophins), които са асоциирани с растежа, поддържането и оцеляването на различни групи неврони от централната нервна система.

BDNF, подобно на другите невротрофини е полипептиден фактор, отговорен за пролиферация, диференциация и преживяване на неврона като по този начин всъщност повлиява невронната морфология и синаптогенеза [Barde, 1989]. BDNF се синтезира от неврони в гръбначния мозък, хипокампуса и кортекса, след което може да се транспортира до дендритите на различни неврони на централната нервна система (ЦНС). *In vitro* опити доказват, че невротрофините (в това число и BDNF) силно повлияват невронната възбудимост [Binder et al., 2001]. Същите автори доказват, че при епилептични гърчове транскрипцията на *BDNF* гена се засилва с пик около 6 ч. след гърчовете и нормализиране около 12 ч. след гърчовете. Това предполага прякото участие на BDNF в свръхвъзбуждането на невроните, създаващо предпоставка за възникване на епилептично огнище. Може да се заключи, че липсата на супресия от страна на MeCP2 води до повишена активност на *BDNF* гена. Това предизвиква свръхвъзбуждане на неврони в ЦНС и значително понижава прага на епилепсия.

Повлияването на пролиферацията, диференциацията и преживяването на неврони от ЦНС може да обясни регреса и интелектуалния дефицит. Увреждането на ЦНС може да се свърже и с другите симптоми на синдром на RTT - апраксия, клатещо се нестабилно тяло или ходене на пръсти, сколиоза, спастични парапарези, вазомоторни нарушения на крайници и др. Различната фенотипна проява може да се дължи на наличие/отсъствие на компенсаторни механизми, които да модифицират ефекта на BDNF – например варианти в гени, кодиращи останалите невротрофини.

MLPA анализ за търсене на големи делеции и дупликации

Секвенционният анализ на *MECP2* гена има едно сериозно ограничение – не позволява детекцията на големи дефекти (делеции и дупликации), обхващащи повече от един екзон.

Този проблем се преодолява чрез използване на MLPA анализ [www.mlpa.com]. Първото приложение на тази техника за детекция на делеции/дупликации в *MECP2* гена при Български пациенти беше направено в разработки на Тодоров и сътрудници [Тодоров Т, 2011, дисертационен труд].

В настоящия дисертационен труд, също се използва MLPA анализ, покриващ едновременно Х хромозомните гени *MECP2, CDKL5* и *ARX* с цел търсене на големи делеции или дупликации. При изследване на момичета за гени от Х хромозомата, интерпретацията на резултатите е комплицирана, поради наличието на две копия от Х хромозомни гени. Делеция при пациент от женски пол се детектира като наполовина намален пик(ове), спрямо този/тези при контролата. Наличието на дупликация се детектира като по-висок пик(ове) от този/тези при контролата.

Прецизната интерпретация на резултатите е извършена според въведените от други автори алгоритми [Тодоров Т, 2011, дисертационен труд].

В изследваната група от 37 неродствени RTT пациенти не бяха открити големи делеции. Следователно за общо интерпретираната група от 70 RTT пациента от български произход остават намерени само 2 големи делеции в проучването на Тодоров и сътрудници [2011, дисертационен труд]. Следователно този вид големи дефекти се оказват доста редки за българските RTT пациенти (~3% - 2/70), за разлика от точковите мутации и малки делеции/инсерции/дупликации (37% - 26/70).

Генотип-Фенотип корелация при RTT пациенти

1. Генотип-фенотип при пациенти с делеции

Данните от международни проучвания показват, че носители на големи делеции, засягащи *MECP2* гена, манифестират по-тежък фенотип. Например едно австралийско проучване [Bebbington et al., 2012] показва, че носители на големи делеции, в *MECP2* гена, манифестират по-тежка степен на интелектуален дефицит, и с по-малка вероятност се научават да ходят, имат по-тежко засягане на ПМР и епилепсия.

Изследванията при български пациенти [Тодоров Т, 2011, дисертационен труд] показват, че пациентките с делеция, която покрива целия екзон 3 и част от екзон 4 на

MECP2 гена, манифестират фенотип, типичен за класически RTT без наличие на епилептични епизоди. Това противоречи на пуликуваните до момента данни в световната литература. Възможно е големите делеции да предизвикват преимуществено хиперметилиране на мутантното копие. Това би осигурило активна експресия на здравото копие. Предполагаме, че точковите мутации и малки делеции/инсерции не предизвикват преимуществено хиперметилиране на мутантното копие. Вероятно е и наличието на допълнителен компенсаторен механизъм – например варианти в гени, кодиращи невротрофини или техни регулатори.

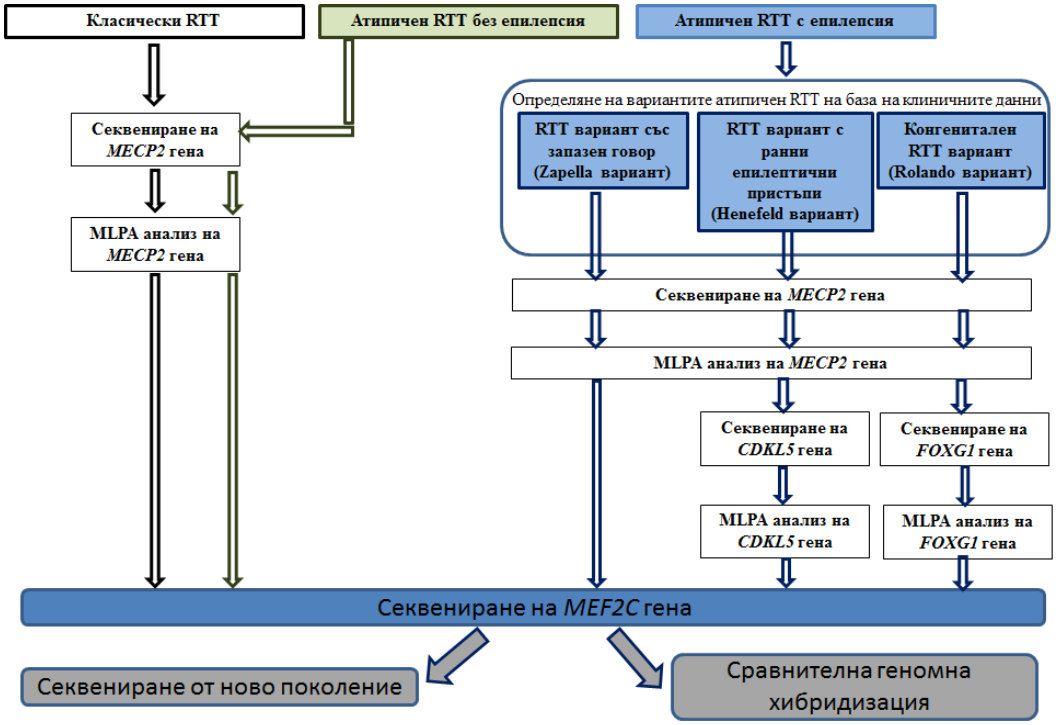
2. Епилепсия и мутации в *MECP2* гена

Епилепсия се наблюдава при 70% до 90% от пациентите с класически синдром на Rett [Cooper at al.,1998a,b; Nagie & Witt, 1989; Steffenbutg et al., 2001]. Въпреки това към момента според последната ревизия на критериите за RTT , епилепсията не участва в основните критерии [Neul et al., 2008].

Нашите резултати показват, че наличието на епилептични епизоди при пациенти с типичен RTT с по-висок процент се свързва с мутации в *MECP2* гена [Neul et al., 2010]. Мутации в *MECP2* гена се срещат около 2 пъти по-често при пациенти с епилепсия и типичем RTT, отколкото при пациенти с класически RTT без епилепсия (Таблица 8). Това е в съгласие с публикуваните данни [Neul et al., 2010]. Епилепсията може да се счита за симптом, провокиран от нарушаване репресионната фукнция на MeCP2 протеина спрямо *BDNF* гена. Това засилва експресията на *BDNF* гена в невроните на ЦНС и се променя невронната морфология и синаптогенеза. В резултат се причинява хиперактивност на мозъчните неврони и драстично снижаване на епилептичния праг.

Описаните в дисертационния труд резултати показват, че наличието/отсъствието на епилептични епизоди спомага не само за определяне на RTT вариантите при атипичен RTT, но и дава ценни насоки относно алгоритъма за провеждане на молекулярно-генетичния анализ на *MECP2* гена. След изчерпване на възможностите за анализ на *MECP2* гена в зависимост от клиничните симптоми е възможно да се премине към изследване на други гени, като например *CDKL5*, *FOXG1*, *MEF2C* и др.

Във връзка с това разработихме нов алгоритъм за молекулярно-генетично изследване на пациентите с клинична диагноза RTT (Фигура 16).



Фигура 16. Системен подход за молекулярно-генетичен анализ на пациенти с RTT. Секвенирането на *MECP2* гена е препоръчително да се извършва на 2 етапа:
1) секвениране на екзон 4 на *MECP2* гена
2) цялостно секвениране на *MECP2* гена

Проверка наличието на откритите генни изменения при родителите на болните деца

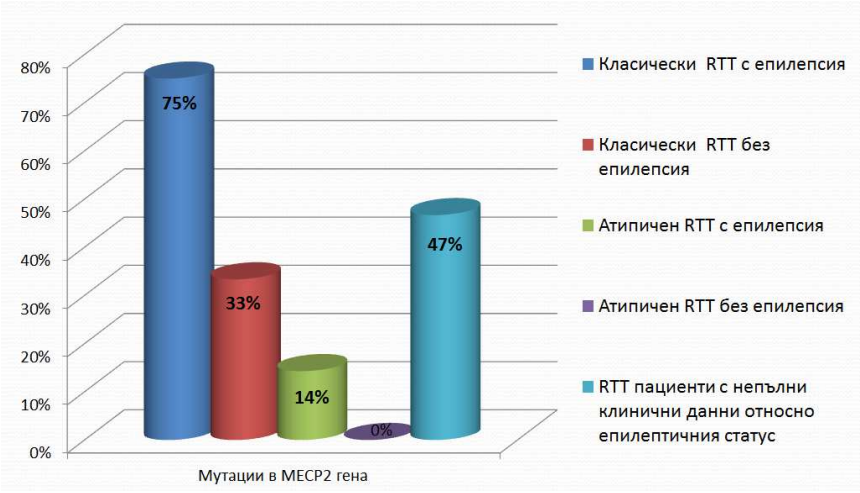
Всички открити мутации в изследваната група пациенти бяха проверени при техните родители. Резултатите показаха, че всички мутации са нововъзникнали при болното дете и не са унаследени от родителите. Тези резултати потвърждават патологичния характер на откритите генни изменения и появата им като повтарящи се мутационни събития, засягащи определени нуклеотидни последователности в генома. Водеща роля в генерирането на такъв тип мутационни събития има околната ДНК последователност [Todorov et al., 2012]. Хромозомният сегмент, в който е разположен *MECP2* гена изобилства с прави и обратни повторени последователности. Това може да генерира нестабилни ДНК структури, провокиращи грешки по време на репликация [Todorov et al., 2012].

Сравняване на получените резултати със световната база данни

Една от откритите мутации (c.318_321dupGAAG) в *MECP2* гена е открита за пръв път при български пациент и не е описвана до момента в световната литература. Останалите мутации в настоящето изследване са известни в световната литература. Повечето открити мутации при нашите пациенти в действителност са едни от най-честите генетични изменения в *MECP2* гена, причиняващи класическа форма на Rett синдром. В световната литература се съобщава, че откритите мутации в 94% от пациентите с Rett

синдром са точкови мутации, малки екзонни делеции и инсерции и само в около 6% се откриват големи и комплексни генни преобразувания [Philippe et al., 2006].

В настоящето изследване бяха открити мутации в *MECP2* гена при 40% от пациентите с диагноза Rett синдром. При изследване на пациенти с типичен RTT, мутации в *MECP2* гена се откриват при 59% от случаите, но само при 8,7% от атипичните RTT пациенти. Тези резултати се различават от публикуваните данни по отношение на типичния синдром на Rett. Cheadle и сътрудници [2000] съобщава 80%. При изследваните пациенти с типичен RTT и епилепсия мутации в *MECP2* гена се откриват при 75%, което е близо до публикуваните данни в световни проучвания [Cheadle et al., 2000]. По отношение на атипичния RTT мутации в *MECP2* при други проучвания (20%) [Cheadle et al., 2000] надвишават съществено процента в настоящия дисертационен труд – 8,7%.



Фигура 17. Мутации в *MECP2* гена при пациенти с RTT.

Това, най-вероятно, се дължи на факта, че групата пациенти с атипични RTT има силно хетерогенен и най-вероятно смесен характер. Обновяването на текущата класификация показва, че в нашата група пациенти попадат немалко пациенти (6) непокриващи съвременните критерии за синдром на Rett.

По отношение на големите делеции, резултатите при български пациенти показват честота на такъв тип дефект ~3%. Това показва, че тези дефекти са с два пъти по-ниска честота при български пациенти в сравнение с публикуваните данни в световната литаратура (6%) [Philippe et al., 2006].

С настоящето изследване се продължават вече положените основи от Тодоров и сътрудници [2011, дисертационен труд] като беше доразвит алгоритъма за молекулярно-генетичен анализ при пациенти с клинична диагноза синдрим на Rett. Беше изяснено влиянието на епилептичните пристъпи като клиничен показател при RTT и корелацията им с мутации в *MECP2* гена.

Други изследвани гени

В допълнение, в зависимост от клиничната симптоматика при част от засегнатите момичета бяха секвенирани гените *CDKL5* и *FOXG1*, където се съобщават мутации асоциирани с Rett синдром [Neul et al., 2010].

Не бяха открити мутации в *CDKL5* гена. Мутация във FOXG1 гена се открива при един пациент (20% - 1/5) от изследваната група с конгенитален (Rolando) RTT вариант. Случаят е разгледан подробно по-долу.

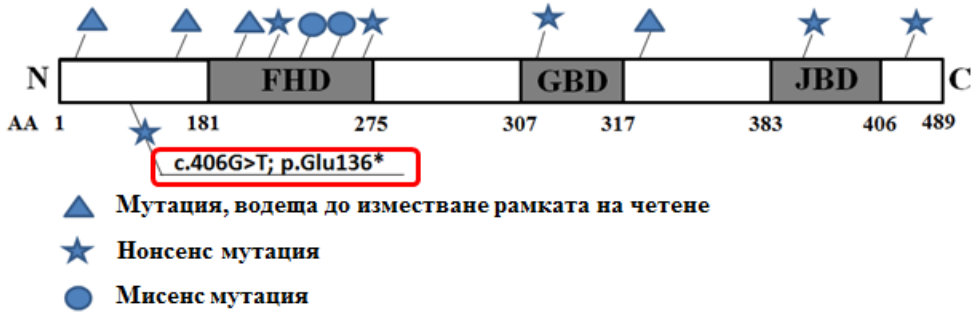
Пациентката е 4 годишно момиче с клинична диагноза RTT. Тя е с нормален радиус на главата (occipitofrontal head circumference - OFC) при раждане. След това се наблюдава изоставане в растежа на главата (OFC - 45 cm), микроцефалия (standard deviation score, SDS - 3,43). При пациентката се наблюдава нарушен сън, лабилност в настроението и безпричинен плач. Регрес в психомоторното развитие започва на 5 месечна възраст. Скоро след това (11м.в.) започват парциални гърчовете. В допълнение се наблюдават: тежък интелектуален дефицит, избягване на очен контакт, нарушения в речта, хипотония, постепенна загуба на придобитите умения на ръцете, стереотипни движения на ръцете, невъзможност да ходи, бруксизъм и конвергентен страбизъм.

Проведеният молекулярно-генетичен анализ на *MECP2* гена не доведе до откриване на генетичен дефект. След прецизиране на диагнозата съгласно актуализираните критерии пациентката беше класифицирана като конгенитална (Rolando) форма на RTT. Особено специфични за този вариант са следните клинични данни: тежка постнатална микроцефалия, регрес на 5 м.в. и начало на гърчовете след начало на психомоторния регрес.

Като следваща стъпка в алгоритъма, съгласно международните препоръки [Neul et al., 2010] беше проведен секвенционен анализ на *FOXG1* гена. Молекулярно-генетичният резултат показва непубликувана до момента мутация в хетерозиготно състояние. Мутацията генерира стоп кодон и се намира в екзон 1 на *FOXG1* гена: c.406G>T; p.Glu136*.

Макар че, мутацията генерира стоп кодон и нейният патогенен характер е ясен, тя не е публикувана, поради което мутацията също беше обработена с метематически софтуер. Nonsense мутацията води до преждевременно терминиране на протеиновата синтеза, като засегнатата аминокиселина не е високо консервативна. Новата, по-къса рамка на четене води до получаване на РНК продукт с преждевременен стоп кодон, който се разгражда чрез нонсенс-опосредствано РНК разграждане.

Откритата мутация във *FOXG1* гена попада в N-терминалния домен, където се срещат основно мутации, водещи до изместване рамката на четене (Фигура 18).



Фигура 18. Схематично представяне на съобщаваните до момента мутации в гена *FOXG1*. На схемата са представени функционалните домени: ДНК-свързващ домен (DNA-binding forkhead domain - FHD), Gro-свързващ домен (Gro-binding domain - GBD) и KDM5B-свързващ домен (KDM5B binding domain - JBD). Аминокиселинната номерация (AA) е показана в долния край на схемата. Различните типове съобщавани мутации са показани със символи. Откритата мутация в настоящия дисертационен труд е оградена с червено.

В N-крайния домен до момента са съобщавани само мутации, водещи до изместване рамката на четене и това е първата nonsense мутация в този регион. Това води до разнообразяване на типа мутации, засягащи В N-крайния домен. Клиничните данни при пациентите с мутации в този регион са идентични, което е логично в светлината на разграждане на получените РНК продукти чрез нонсенс-опосредствано РНК разграждане. Въпреки това мутацията е интересна от гледна точка, че е първата съобщавана мутация в този регион.

Изследването при двамата родители не показа носителство на откритият дефект при тях. Този клиничен случай е пример за нуждата от постоянно ревизиране на клиничната диагноза синдром на Rett, съгласно действащите съвременни критерии и прецизиране на RTT вариантите в случай на атипичен RTT. Това позволява по-прецизно определяне на алгоритъма за молекулярно-генетичен анализ при всеки пациент. Откритият генетичен дефект позволи изясняване на клиничната диагноза при пациента и провеждане на адекватна генетична консултация в семейството.

Получените резултати при изследваната група пациенти с RTT бяха публикувани: Педиатрия, 2010; Педиатрия 2013 – Под печат.

3. ЕПИЛЕПТИЧНИ ЕНЦЕФАЛОПАТИИ С РАННО НАЧАЛО

Епилептичната енцефалопатия е група от редки заболявания асоциирана с когнитивни и поведенчески нарушения, както и други нарушения на мозъчната функция. Тази хетерогенна група има множествена етиология като симптоматични мозъчни лезии, метаболитни заболявания или различни генетични синдроми.

Епилепсията с ранно начало има потенциално по-високо отражение върху детското развитие спрямо епилепсиите с по-късно начало. Началото е силно вариабилно дори и в

рамките на един синдром или заболяване. Обикновено гърчовете и когнитивните функции варират в зависимост от нивото на развитие на отделните деца. С времето гърчовете може да отшумят, но не и поведенческите и познавателните проблеми, които могат да останат под една или друга форма и след детството.

Класификацията на епилепсията и терминологията при описване на епилептични пристъпи е въведена от The International League Against Epilepsy (ILAE) Task Force on Classification and Terminology [Engel, 2001].

3.1. КЛИНИЧНИ И ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ПРИ ГРУПАТА ПАЦИЕНТИ

Изследвани бяха 15 пациента с клинична диагноза Епилептична енцефалопатия с ранно начало (EIEE). Като критерии за изключване от групата бяха определени патологично протекла бременност, асфикция, черепно-мозъчни травми, метаболитни нарушения и доказана на молекулярно-генетично ниво диагноза.

При подбраната група пациенти бяха проведени молекулярно-генетични изследвания на *PCDH19* и/или *CDKL5* гените в зависимост от манифестираните симптоми. Изследването се базира на секвенционен анализ на двата гена (*PCDH19* и *CDKL5*).

Изследвани бяха 9 пациента само за мутации в *PCDH19* гена, 2 пациента само за мутации в *CDKL5* гена и при 4 пациента бяха изследвани и двата гена.

Подробните клинични данни са показани в приложение 2. Пациентките от групата, при които е проведен молекулярно-генетичен анализ на *PCDH19* гена се характеризират с пристъпи с ранно начало (6-36 месечна възраст) и когнитивни нарушения. Характерно е начало на епилептичните гърчове преди поява на интелектуален дефицит.

При пациентките, насочени за молекулярно-генетичен анализ на *CDKL5* гена наблюдаваният фенотип е по-тежък, гърчовете са с по-ранно начало (преди 6 месечна възраст или веднага след раждането) в сравнение с тези, насочени за изледване на гена *PCDH19*.

В случай, че даден пациент не може да се отнесе към едната от двете групи се извършва генетичен анализ и на двата гена. На Таблица 9 са показани проведените молекулярно-генетични анализи при подбраната група пациенти .

Таблица 9. Молекулярно генетични анализи, проведени при подбраната група пациенти с EIEE.

№	Изследване на *PCDH19* гена	Изследване на *CDKL5* гена
1	**Мутация** **c.2705dupA; p.Asp902Lysfs*6**	
2	✓	
3	✓	
4	✓	✓
5	✓	✓
6	✓	
7	✓	
8	✓	✓
9	✓	
10		✓
11	**Мутация** **c.1091delC; p.Pro364Argfs*4**	✓
12	✓	
13	✓	
14		**Мутация** **c. 539C>T; p. Pro180Leu**
15	✓	

Молекулярно-генетичният анализ показа наличие на мутации в *PCDH19* гена при двама от изследваните пациенти (пациенти 1 и 11). При един пациент (14) беше открита мутация в *CDKL5* гена. Подробното описание на трите EIEE пациента с поставена на молекулярно-генетично ниво диагноза са представени по-долу.

Случай I (пациент 1)

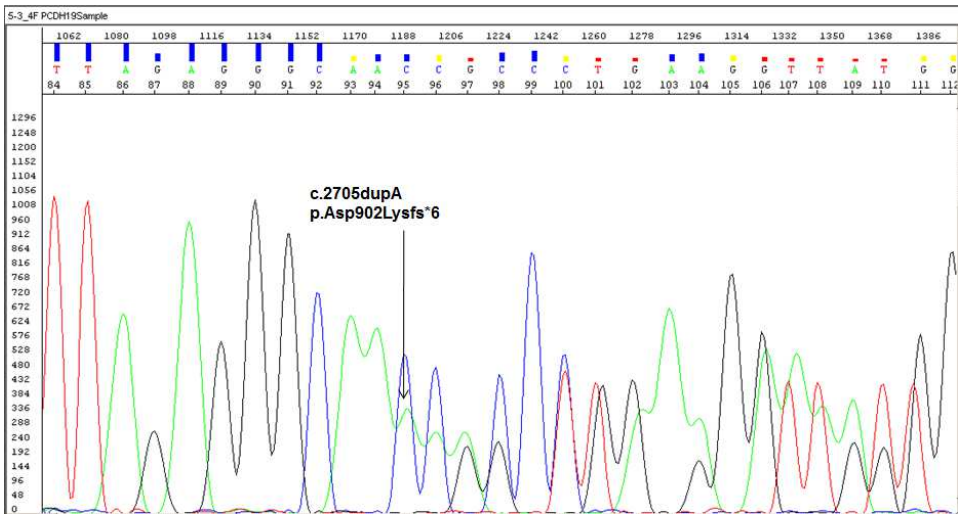
Момиче на 13 годишна възраст, родено от първа, нормално протекла бременност и неродствени родители. Семейството е от български произход и няма данни за фамилна обремененост. Момичето показва първоначално нормално постнатално развитие. На 5 месечна възраст започва поява на фебрилни тонични пристъпи. Продължителността на пристъпите е около 2 минути и са групирани в клъстери от 6-15 на ден в продължение на 2-4 дни. Предприетото медикаментозно лечение е без ефект. ЕЕГ показва нормален резултат в интерикталната фаза. На 2 г.в. резистентните тонични пристъпи продължават и

преминават в генерализирани тонично-клонични пристъпи. Детето прохожда на 14м., но експресивна реч развива на 3г. Първото приемане в специализирано медицинско звено по детска неврология е на 4г. В рамките на 72 часа се провокират 20 тонични и кратки тонично-клонични гърча в условия на фебрилитет. Невропсихологичните тестове покават интелектуален дефицит (вербален IQ – 45; невербален IQ – 40), аутизъм и агресия. Поради агресивното поведение детето не може да посещава дори специализирано училище.

Последователно са изпробвани редица медикаменти, но епилептичните пристъпи остават резистентни. На 6г. за пръв път се появяват и афебрилни гърчове, групирани в клъстери с циклична поява на всеки 50-60 дни и тенденция към удължаване на свободните от пристъпи периоди.

Описаната клинична картина показва прилика с ранна инфантилна епилептична енцефалопатия 9 (Epileptic Encephalopathy, Early Infantile 9 – EIEE9) и пациентката е насочена за молекулярно генетичен анализ на *PCDH19* гена. Молекулярно-генетичният анализ доведе до откриване на непубликувана до момента дупликация в изследвания ген - c.2705dupA; p.Asp902Lysfs*6 (Фигура 19).

Секвенционният профил на генетичния дефект и софтуерната обработка са показани на Фигури 48 и 49.



Фигура 19. Генетична последователност на част от *PCDH19* гена в региона на мутацията.

Дупликацията води до изместване рамката на четене. Новата рамка на четене генерира стоп кодон 6 кодона downsream. Полученият РНК продукт с преждевременен стоп кодон се разгражда чрез нонсенс-опосредствано РНК разграждане.

Изследването при родителите потвърди носителство на същия генетичен дефект при асимптоматичната майка. Майката не манифестира пристъпи, има нормално

интелектуално развитие (IQ 98) и ЕЕГ не показва отклония, както в будно състояние, така и по време на сън.

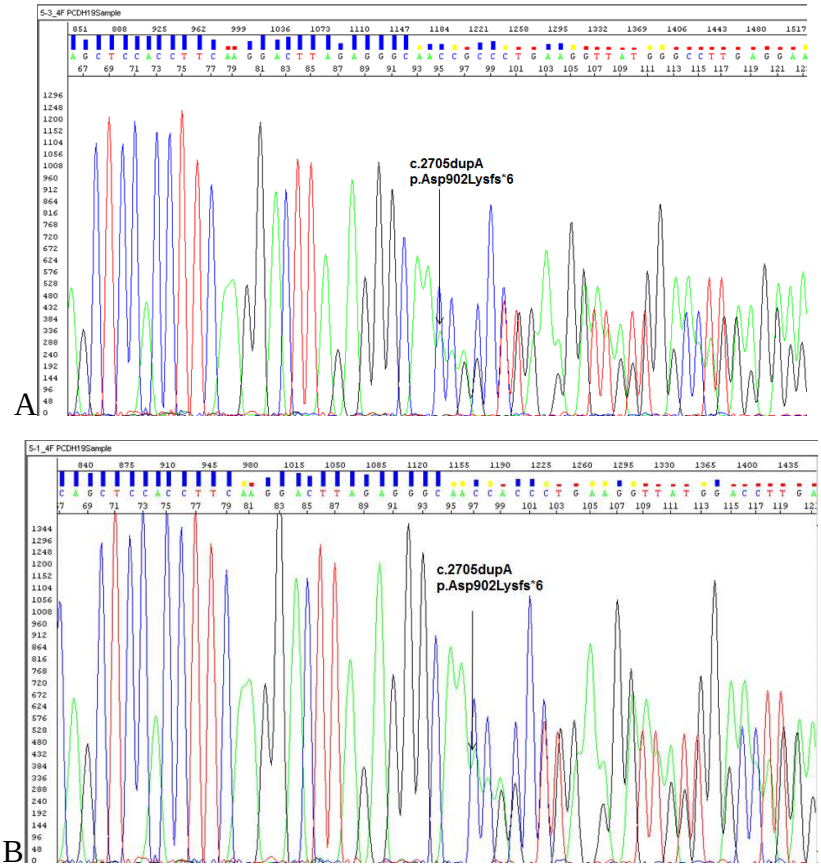
Типичната фенотипна проява на мутации в *PCDH19* гена е описана в редица проучвания през последните години [Marini et al., 2010; Depienne et al., 2011; Hirugashi et al., 2011; Specchio et al., 2011]. Генерализираните гърчове с ранно начало са първоначално провокирани от фебрилитет, честотата им нараства и достига пик около 6г. Пристъпите са в клъстери с продължителност няколко дена и не се повлияват от антиконвулсанти, но постепенно отшумяват с напредване на възрастта. Невропсихологичното състояние включва среден интелектуален дефицит, аутистично и агресивно поведение.

За първи път в България при пациент с EIEE се открива мутация в *PCDH19* гена. Редица особености в гореописания клиничен случай го отличават от публикуваните до момента литературни данни. Мутацията в *PCDH19* гена е локализирана в екзон 5 на гена, докато повечето съобщавани мутации са съсредоточени в екзон 1 [Jamal et al., 2010; Depienne et al., 2011] (виж Фигура 21). Екзон 5 кодира двата цитоплазмени домена, които са силно консервативни [Hynes et al., 2010; Jamal et al., 2010]. Откритата мутация води до изместване рамката на четене и ненавременно терминиране на транслацията

Специфична особеност в изследваното семейство е носителството на патогенната мутация от клинично здрава майка. Това е един от малкото известни в света случаи на подобно унаследяване на мутация в *PCDH19* гена. Обикновено при фамилните случаи мутацията се унаследява от клинично здрав баща или майка с по-лека клиника [Depienne et al., 2009]. По-леката клиника се обяснява с наличие на мозайцизъм в соматични и гонадни клетки [Dibbens et al., 2011]. При носителство на мутация при бащата, тя е без фенотипна изява поради липса на клетъчна интерференция.

Секвенционните профили при изследваната пациентка и нейната майка не подсказва наличието на мозайцизъм. Изследваната ДНК проба е изолирана от венозна кръв, а секвенирането по Sanger (Фигура 20).

Липсата на фенотипна изява при асимптоматичната майка може да се обясни с неслучайна Х-инактивация в съотношение по-голямо от 30:70 или 20:80, което не позволява изява на клетъчна интерференция и преминаване на минималния праг на епилепсия. Преимуществена инактивация на Х-хромозомата в съотношения като 70:30 или 80:20 се предполага, че има отношение към изява на по-лек фенотип, отколкото случайната (50:50) Х-инактивация, причиняваща максимална степен на клетъчна интерференция [Depienne et al., 2011].



Фигура 20. Генетична последователност на част от екзон 5 на *PCDH19* гена в региона на мутацията при пациентката (A) и нейната майка (B).

Изследване на Х-инактивацията чрез молекулярно-генетичен анализ на ДНК, изолирана от лимфоцити при носители на мутации в *PCDH19* гена са провеждани от Marini и сътрудници [2010], но корелация не се открива. Въпреки това, изследването на Х-инактивацията в ДНК от лимфоцити не носи точна информация за Х-инактивационния статус в нервни клетки. Поради това, функционален мозайцизъм в резултат на преимуществена Х-инактивация не може да се изключи като механизъм, обясняващ вариабилната клиника при различните пациенти. При изследваната асимптоматична майка е възможно да се наблюдава инактивация по-голяма от 80:20, причиняваща ниско ниво на *PCDH19* мутантни или нормални клетки, което не е достатъчно за предизвикване на „клетъчна интерференция“. За липса на фенотип няма значение кое копие на Х хромозомата (мутантно или нормално) ще е преимуществено инактивирано, защото и в двата случая се подтиска клетъчната интерференция (виж литературен обзор, стр. 34). Пълна липса на клетъчна интерференция може да обясни липсата на фенотипна изява при майката. Пълна липса на клетъчна интерференция, заедно с други генетични и епигенетични фактори може да обясни липсата на фенотипна изява при майката.

Случай II (пациент 11)

Пазиентка от арменски произход манифестира типичната клинична изява на EIEE, тип 9. Наблюдава се среден интелектуален дефицит и аутистично поведение. Епилепсията е фокална, изразена в клъстери от епилептични гърчове.

Молекулярно-генетичният анализ показва хетерозиготно носителство на мутацията c.1091delC; p.Pro364Argfs*4 в екзон 1 на *PCDH19* гена.

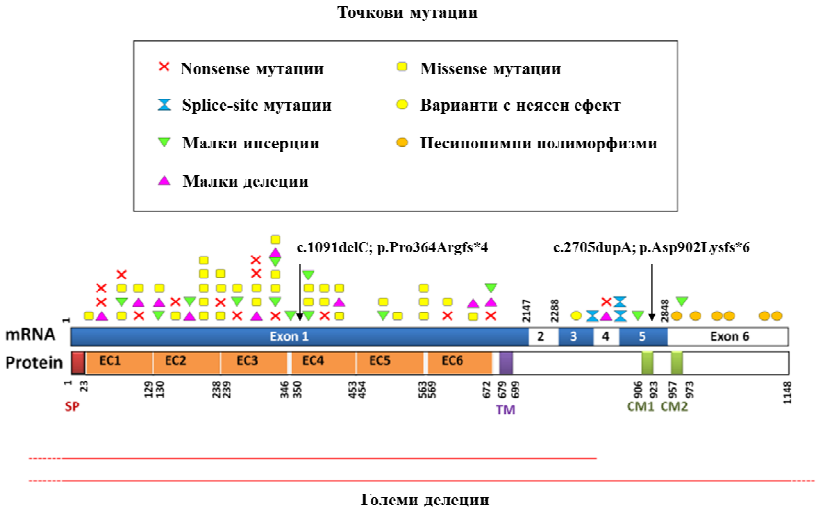
Дупликацията води до изместване рамката на четене – изместването започва от 108-ма аминокиселина (Leu). Новата рамка на четене генерира стоп сигнал 2 кодона downsream. Полученият РНК продукт с преждевременен стоп кодон се разгражда чрез нонсенс-опосредствано РНК разграждане.

Мутацията попада в региона кодиращ екстрацелуларен домен 4 на *PCDH19* протеина и до момента не е съобщавана при други пациенти в световните бази данни.

Биологичен материал от родителите не беше достъпен и поради това не бяха изследвани за изясняване на носителския им статус по отношение на гореописаната мутация.

Генотип-фенотип корелации на мутациите в *PCDH19* гена и сравнението им с литературните данни

Настоящият дисертационен труд разширява спектъра на познатите мутации в *PCDH19*-асоциираните епилепсии при жени. Откритите мутации в настоящето изследване не са съобщавани от други автори. Позициите на двете мутации в протеина, спрямо всички останали мутации, публикувани до момента, са показани на Фигура 21.



Фигура 21. Позиция на мутациите в *PCDH19* гена, открити в настоящия дисертационен труд спрямо известните мутации в литературата.

Мутацията, открита при пациент 1 – c.2705dupA; p.Asp902Lysfs*6 е разположена в екзон 5, кодиращ цитоплазмен домен 1 (Фигура 21 CM1) и е сред малкото дефекти, които са откривани в този домен.

Цитоплазматичните домени CM1 и CM2 като цяло са рядко засегнати от мутации. Всички мутации в CM1 и CM2 водят до епилепсия и интелектуален дефицит при момичета, но въпреки това различните мутации показват специфичен фенотип. Когнитивните и поведенчески отклонения също варират: от нормално умствено развитие до среден по тежест интелектуален дефицит с или без аутистично поведение. Като цяло гърчовете са периодични, групирани в клъстери и повечето от тях се индуцират от фебрилитет. Обикновено изхода е свободно от пристъпи състояние (с или без медикаментозна терапия) или поне тенденция към постепенно удължаване на свободния от пристъпи период. Описаната от нас мутация причинява типичен фенотип по отношение на манифестираните гърчове и епилептичния изход.

Мутацията, открита при пациент 11 – c.1091delC; p.Pro364Argfs*4 е разположена в екзон 1, кодиращ извънклтъчен домен 4 (Фигура 21, EC4). В този екзон са разположени преобладаващата част от съобщаваните в световната литература мутации. Това е логично с оглед на размера на екзон 1 (съдържа повече от 50% от кодиращата последователност на *PCDH19* гена).

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

Получените при пациент 1 резултати бяха публикувани в международно списание – Pediatric Neurology 2012 46(6):397-400 и представени в постер сесия на международен конгрес: ESHG 2012, Nurnberg, Germany.

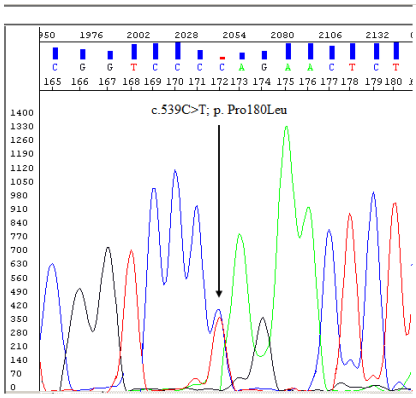
Случай III (пациент 14)

Пациентката показва фенотипна изява, съответстваща на синдром с инфантилни спазми. Пациентката страда от тежък интелектуален дефицит, липса на ръчни умения, хипотония, липса на очен контакт, не може да говори и не ходи. Терминът инфантилни спазми се използва да се опише типа на гърчовете, епилептичния синдром или и двете. Първоначалната клинична диагноза е синдром на Rett. След изключване на мутации в *MECP2* гена диагнозата е ревизирана. При преразглеждане на клиничните симптоми прави

впечатление липсата на фаза на регрес при пациентката, което е важен диагностичен симптом. Клиничната диагноза на пациентката беше ревизирана на EIEE, тип 2 и беше насочена за изследване на *CDKL5* гена.

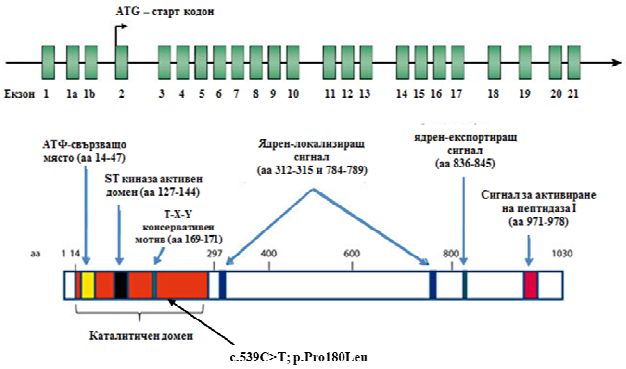
Молекулярно-генетичният анализ показва мутация в *CDKL5* гена - c.539C>T; p. Pro180Leu (Фигура 22).

Секвенционният профил на генетичния дефект е показан на Фигури 54.



Фигура 22. Генетична последователност на част от *CDKL5* гена в региона на мутацията.

Мутацията е missense и софтуерната обработка показва сравнително висока вероятност за патогенност (MutationTaster: disease causing (p-value: 0.684)). Това е логично, защото мутацията попада в каталитичния домен на протеина (Фигура 23).



Фигура 23. Структура на CDKL5 протеина и разположение на описаната при български пациенти мутация в *CDKL5* гена.

Мутацията е съобщавана като патогенна в базата данни Uniprot - UniProtKB/Swiss-Prot O76039: Variant p.Pro180Leu).

Пациентът показва типична клинична картина на EIEE, тип 2, но редица клинични симптоми, включително липсата на фаза на регрес отличава този пациент от случаите на атипичен RTT синдром, описани в глава 4.1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Епилепсиите са сред най-честите неврологични заболявания при хората с честота около 3%. Проведените големи епидемиологични проучвания установяват, че около 5% от пациентите имат пряк родственик с епилепсия. Наследствеността при епилепсия е отдавна известна, но появата на молекулярната генетика бележи революция в познанията за генетика на епилепсиите, която има не само научно, но и все по-нарастващо клинично значение.

Настоящата научна разработка беше фокусирана върху изясняване приноса на микроделеции в хромозомен регион 15q13.3 за фенотипна изява на идиопатична генерализирана епилепсия и изследване молекулните характеристики на синдромни епилепсии с ранно начало при български пациенти.

Идиопатичната генерализирана епилепсия (IGE) представлява група от епилепсии с различни клинични прояви. IGE съставлява 20-30% от епилепсията в общата популация. Заболяването е полигенно, въпреки че са известни и фамилни случаи с моногенно унаследяване.

Част от генетичните изменения са свързани с промяна броя копия на гени в хромозомен регион 15q13.3. Тези изменения водят до предразположение към пристъпи, като се понижава прага за тяхното възникване.

Синдром на Rett (RTT) е най-честата причина за Х – свързан интелектуален дефицит при момичета. Епилепсия се наблюдава при 70% до 90% от пациентите с класически синдром на Rett. RTT се дължи на de novo възникнали точкови мутации или големи делеции в *MECP2* (methyl-CpG binding protein 2) гена и по-рядко на мутации в *CDKL5* (cyclin dependent kinase-like 5) и *FOXG1* (Forkhead G1) гените.

Сред спектъра на синдромни епилепсии с ранно начало са епилептичните енцефалопатии (EIEE). Това са група от редки заболявания, асоциирани с когнитивни и поведенчески нарушения, както и други нарушения на мозъчната функция. Ранното начало на тази група заболявания оказва потенциално по-високо отражение върху детското развитие спрямо епилепсиите с по-късно начало.

Обект на настоящия дисертационен труд са EIEE тип 2 и тип 9. Тези заболявания са асоциирани с мутации в гените *CDKL5* (EIEE, тип 2) и *PCDH19* (EIEE, тип 9).

В настоящата работа бяха извършени молекулярно-генетични изследвания при 152 неродствени пациента с епилепсия и/или интелектуален дефицит. На базата на клиничната диагноза пациентите са групирани в 3 групи: идиопатична генерализирана епилепсия - 100 неродствени пациента; Синдром на Rett - 37 пациента и епилептична енцефалопатия с ранно начало (EIEE) – 15 неродствени пациента.

Настоящата научна разработка беше фокусирана върху изясняване на молекулните дефекти по дължината на гените *MECP2*, *CDKL5*, *FOXG1*, *PCDH19*, както и наличие на делеции/дупликации в хромозомен регион 15q13.3.

В групата пациенти с RTT бяха изследвани 37 неродствени пациента, към които бяха добавени 39 пациента, изследвани от други автори като по този начин се обхващат всички изследвани до момента в България RTT пациенти.

На базата на получените резултати при групата пациенти с RTT се установи, че мутации в *MECP2* гена се откриват при 75% от пациентите с типичен RTT и епилепсия, 33% от пациентите с типичен RTT без епилепсия и 14,3% от пациентите с атипичен RTT с епилепсия. Общо изяснени на молекулно ниво 40% от изследваните пациенти.

В допълнение, в зависимост от клиничната симптоматика при част от засегнатите момичета бяха секвенирани гените *CDKL5* и *FOXG1*, където се съобщават мутации асоциирани с Rett синдром. Не бяха открити мутации в *CDKL5* гена. В гена *FOXG1* беше открита една мутация - при пациентката, която беше класифицирана като конгенитална (Rolando) форма на RTT.

Проведените молекулярно-генетични изследвания на гените *PCDH19* и *CDKL5* при епилептична енцефалопатия доведоха до изясняване на 20% от изследваните случаи. Една от откритите PCDH19 мутации е унаследена от асимптоматична майка (единични такива случаи са докладвани в световната литература), което предполага ролята на неслучайна X-инактивация при формиране на фенотипната изява.

Нашата група пациенти с все още неизвестен молекулен дефект представлява обект за нови проучвания. Имайки предвид високата цена на секвенирането от нова генерация и комплексността при анализ на получените данни, от изключителна важност е пациентите да са максимално добре клинично охарактеризирани и класифицирани съгласно съвременните номунклатури. Пациентите трябва също така да са редварително скринирани за най-честите известни генетични причини и да се изключат тези, които се дължат на дефекти във вече известни гени.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. БЪЛГАРСКА ЛИТЕРАТУРА:

1. Иванов и сътр., 2005 Българска неврология 5(5): 311-316.
2. Димова, и сътр., Българска неврология 8(3): 125-128.
3. Димова, 2010a Педиатрия 50(3): 6-10.
4. Димова, 2010b Педиатрия 50(3): 11-13.
5. Сарайлиева и сътр., 2010 Педиатрия; 50 (3) 39-42.
6. Тодоров Т. 2011 дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор".

2. ЧУЖДОЕЗИЧНА ЛИТЕРАТУРА (по азбучен ред):

1. Adler et al., 1995 Mamm Genome 6(8):491-2.
2. Amir et al., 2000 Ann Neurol 47:670–679.
3. Amir et al., 1999 Nat Genet. 23:185–188.
4. Appleton 2003 Guildford, UK: Clarius Press Ltd. p. 47–64.
5. Araud et al., 2011 Biochem Pharmacol. 82(8):904-14.
6. Archer et al., 2006 J Med Genet 43:729-734.
7. Ariani et al., 2008 Am J Hum Genet.; 83:89–93.
8. Artuso et al., 2010 Brain Dev 32(1):17–24.
9. Bahi-Buisson et al., 2008 Brain Dev 30(2):126–30.
10. Bahi-Buisson N et al., 2008 Brain 131(10):2647-61.
11. Barde, 1989 Neuron 2, 1525–1534
12. Bebbington et al., 2008 Neurology 70(11):868–75.
13. Bebbington et al., 2012 Eur J Hum Genet. 20(9):921-7.
14. Benbadis & Luders 1996 Epilepsia 37:1029-1034.
15. Benbadis, 1999 Seizure 8:140-145.
16. Benbadis, 2001 Neurologic Clinics 19:251-270.
17. Berkovic & Benbadis, 2001 In: Wyllie E (ed). The treatment of epilepsy: Principles and practice. 3rd edition. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, pp. 485-490.
18. Bianchi et al., 2003 Seizures 12:203-10.
19. Binder et al., 2001 Trends Neurosci. 24(1):47-53.
20. Biswas et al., 2010 J Cell Biol 191(5):1029-41.
21. Buoni et al., 2008 Clin Neurophysiol 119(11):2455–8.
22. Carney et al., 2003 Pediatr Neurol. 28:205–211.
23. Cheadle et al., 2000 Hum. Molec. Genet. 9: 1119-1129.
24. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy 1989 Epilepsia 30(4):389-99.
25. Cooper et al., 1998 Eur J Paediatr Neurol 2(3):127–35.
26. Coppola et al., 1995 Epilepsia 36(10):1017-24.
27. Coy et al., 1999 Hum Mol Genet 8(7):1253-62.
28. d'Orsi G et al., 2009 Epilepsy Behav 15(2):260–2.
29. Depienne et al., 2009 PLoS Genet 5 e1000381.
30. Depienne et al., 2011 Hum Mutat 32:E1959-75.
31. DeRisi et al. 1996 Nature Genetics 14, 457–460.
32. D'Esposito et al., 1996 Nat Genet 13(2):227-9.
33. Dibbens et al., 2011 Neurology 76:1514-9.
34. Dibbens et al., 2008 Nat Genet 40:776–81.
35. Dimova et al., 2010 Pediatr Neurol. 42(2):137-40.
36. Elia et al., 2008 Neurology 71(13):997-9.
37. Elmslie et al., 1997 Hum Mol Genet 6: 1329– 1334.
38. Emond et al., 2009 Dev Biol 334(1):72-83.

39. Engel, 2001 Epilepsia 42(6):796-803.
40. Fabisiak & Erickson 1990 Clin Genet 38:353–8.
41. Flomen et al., 2006 Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 141: 571– 575.
42. Flomen et al., 2008 Eur J Hum Genet. 16, 1364–1371.
43. Frank & Kemler 2002 Curr Opin Cell Biol 14(5):557-62.
44. Gaitan & Bouchard 2006 Gene Expr Patterns 6(8):893-9.
45. Glaze et al., 2010 Neurology 74(11):909–12.
46. Guideri et al., 1999 Neuropediatrics 30(3):146-8.
47. Hagberg & Hadberg 1997 Eur Child Adolesc Psych 1:5-7.
48. Hagne et al., 1989 Electroencephalogr Clin Neurophysiol 72:1–6.
49. Hardwick et al., 2007 Eur J Hum Genet 15:1218-1229.
50. Hauser et al., 1993 Epilepsy 34: 453-68.
51. Helbig et al., 2008 Lancet Neurol. 7, 231–245.
52. Helbig I et al., 2009 Nat Genet 41(2):160-2.
53. Hertel & Redies 2011 Cereb Cortex 21(5):1105-17.
54. Hurles&Matthew 2006 Genomic Disorders: The Genomic Basis of Disease, pp.341–355.
55. International Schizophrenia Consortium 2008 Nature 455:237–241.
56. Juberg & Hellman 1971 J Pediatr 79:726–32.
57. Junghans et al., 2005 Curr Opin Cell Biol 17(5):446-52.
58. Kallioniemi et al. 1992 Science 258, 818–821.
59. Kankirawatana et al. 2006 Neurology 67:164–166.
60. Kerr et al., 1997 Europ Child Adolesc Psychiat 6 (suppl. 1): 71-74.
61. Kim et al., 2007 Neuroscience 147(4):996- 1021.
62. Kim et al., 2010 Neuroscience 170(1):189-99.
63. Kirchhoff et al. 1998 Cytometry 31, 163–173.
64. Kleefstra et al., 2002 Clin Genet 61:359-362.
65. Krishna et al., 2011 Neuroscience 175:37-48.
66. Lancman et al., 1995 J Epilepsy 8:215-218.
67. Laviolette & van der Kooy 2004 Nature Reviews Neuroscience 5:55-65.
68. Lichter et al. 2000 Seminars in Hematology 37, 348–357.
69. Locke et al. 2003 Genome Biol 4: R50.1 – R50.9.
70. Lugtenberg 2009 Eur J Hum Genet 17(4):444-53.
71. Marini et al., 2010 Neurology 75(7):646-53.
72. Meehan et al., 1992 Nucleic Acids Res 20:5085-5092.
73. Melani et al., 2011 Dev Med Child Neurol 53:354–360.
74. Morishita & Yagi 2007 Curr Opin Cell Biol 19(5):584-92.
75. Moser et al., 2007 Pediatr Neurol 36(2):95–100.
76. Nabbout & Dulac 2003 J Clin Neurophysiol. 20(6):393-7.
77. Neubauer et al., 1998 Neurology 51: 1608– 1612.
78. Neul et al. 2008 Neurology. 70:1313–1321.
79. Neul et al., 2010 Ann Neurol. 68(6):944-50.
80. Nissenkorn et al., 2010 Epilepsia 51(7):1252–8.
81. Ottman 2005 Epilepsia 46(10):7–14.
82. Patel et al., 2003 Curr Opin Struct Biol 13(6):690-8.
83. Patel et al., 2006 Cell 124(6):1255-68.
84. Percy et al. 2007 J Child Neurol. 22:1338–1341.
85. Petrovsky et al., 2009 Int J Neuropsychopharmacol. 12(2):267-73.
86. Philippe et al., 2006 Eur J Med Genet 49(1):9-18.
87. Pintaudi, 2010 Epilepsy Behav 19(3):296– 300.
88. Rang, 2003 Pharmacology (5th ed.). Edinburgh: Churchill Livingstone
89. Ravn et al., 2005 Hum Mut 25(3):324-329.
90. Redies et al., 2005 Cell Mol Life Sci 62(23):2840-52.

91. Reutens & Berkovic 1995 Neurology 45:1469- 1476.
92. Riley et al., 2002 Genomics 79: 197– 209.
93. Ryan et al., 1997 Nat Genet 17(1):92-5.
94. Scala et al., 2005 J Med Genet 42:103-107.
95. Schena et al. 1995 Science 270, 467–470.
96. Shaffer 2000 Annual Review of Genetics 34, 297–329.
97. Sharp et al. 2008 Nat Genet 40:322–328.
98. Sinkus 2009 Brain Res. 29; 1291: 1–11.
99. Speicher et al. 1993 Human Molecular Genetics 2, 1907–1914.
100. Stassen et al. 2000 Am J Med Genet; 96: 173– 177.
101. Stefansson et al. 2008 Nature 455:232–236.
102. Steffenburg et al., 2001 Acta Paediatr 90:34–9.
103. Stein, 2009 Clin Genet 76: 21-23.
104. Steven et al., 2004 Nature Reviews Neuroscience 5:55-65.
105. Suls et al., 2010 Neurology 75(1):72-6.
106. Szafranski et al., 2010 Hum Mutat, 31(7):840-50.
107. Tai et al., 2010 Brain Res 1344:13-24.
108. Theisen, 2008 Nature Education 1(1).
109. Todorov et al., 2010 Balkan Journal of Medical Genetics 13(2):11-25.
110. Todorov et al., 2012 Mutat Res. 734(1-2):69-72.
111. Turecki et al., 2001 Mol Psychiatry 6: 570–578.
112. Vanhalst et al 2005 Cell Mol Life Sci 62(11):1247-59.
113. Vilain et al., 1996 Cytogenet Cell Genet 74(4):293-4.
114. Wan et al. 1999 Am J Hum Genet. 65:1520–1529.
115. Watson et al. 2001 J Med Genet. 38:224–228.
116. Wieland et al., 2004 Am J Hum Genet 74(6):1209-15.
117. Wolverton & Lalande, 2001 Genomics 76(1-3):66-72.
118. Yagi & Takeichi, 2000 Genes Dev 14(10):1169-80.
119. Yordanova et al., 2011 Neurosci Lett. 494(2):180-3.

3. ИНТЕРНЕТ САЙТОВЕ:
1. http://genome.ucsc.edu
2. www.mecp2.chw.edu.au
3. www.mlpa.com
4. www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM
5. http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CHRFAM7A
6. http://emedicine.medscape.com
7. www.mecp2.chw.edu.au
8. http://www.hgmd.org/
9. http://www.lovd.nl
10. http://www.who.int/mental_health/neurology/Epilepsy_atlas_r1.pdf

ИЗВОДИ

1. Разработените и приложени най-съвременни методики за детекция на варианти в броя копия (MLPA анализ и сравнителна геномна хибридизация) доведоха до откриване на делеции и дупликации в хромозомен регион 15q13.3 при 1% от пациентите с ИГЕ.
2. Беше установено, че делеции, но не и дупликации в 15q13.3 региона допринасят за изява на ИГЕ фенотипа чрез снижаване прага на епилепсия, което е в съгласие с литературните данни.
3. Модифицираният системен подход за анализ на пациенти с RTT с и без епилепсия, съгласно ревизираните критери позволи молекулното охарактеризиране на 40 % от българските пациенти.
4. На базата на получените резултати се установи, че мутации в *MECP2* гена се откриват при:
   - 75% от пациентите с типичен RTT и епилепсия
   - 33% от пациентите с типичен RTT без епилепсия
   - 14,3% от пациентите с атипичен RTT с епилепсия
5. Мутация във *FOXG1* гена се открива при един пациент (20%) от изследваната група с конгенитален (Rolando) RTT вариант.
6. Получените честоти на мутации в *MECP2* гена при различните подгрупи пациенти с RTT и в частност наличие/отсъствие на епилепсия се различават от публикуваните данни, с изключение на групата с типичен RTT и епилепсия.
7. Разработените методики за молекулярно-генетичен анализ на гените *PCDH19* и *CDKL5* при епилептична енцефалопатия доведоха до изясняване на 20% от изследваните случаи.
8. Една от откритите *PCDH19* мутации е унаследена от асимптоматична майка (единични такива случаи са докладвани в световната литература), което предполага ролята на неслучайна X-инактивация при формиране на фенотипната изява.

ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

● Публикации във връзка с дисертационния труд

1. Д. Авджиева, Т. Тодоров, А. Тодорова, А. Киров, И. Литвиненко, Д. Христова, Р. Тинчева, Д. Тончева. (2010). Връзка между синдромите на чуплива Х Хромозома и Rett с разстройствата от аутистичния спектър. Педиатрия 1:35-37.

2. Dimova PS, Kirov A, Todorova A, Todorov T, Mitev V (2012) A novel PCDH19 mutation inherited from an unaffected mother. Pediatr Neurol. 46(6):397-400.
   First two authors contributed equally.
   Импакт фактор - 1.522

3. Kirov A, Dimova P, Todorova A, Mefford H, Todorov T, Saraylieva G, Bojinova V, Mitev V, Helbig I. (2013) 15q13.3 microdeletions in a prospectively recruited cohort of patients with idiopathic generalized epilepsy in Bulgaria. Epilepsy Res. 104:241-245.
   First two authors contributed equally.
   Импакт фактор - 2.290

4. А. Киров, Т. Тодоров, П. Димова2, Д. Авджиева, Р. Тинчева, И. Литвиненко, Г. Сарайлиева2, Д. Денева2, В. Божинова2, А. Тодорова, В. Митев. (2013) Синдром на Rett – клинична картина и молекулни характеристики при български пациенти. Педиатрия 2:2-5.

ОБЩ ИМПАКТ ФАКТОР: 3.812

● Научни прояви във връзка с дисертационния труд

1. Димова П, ***Киров А***, Тодоров Т, Божинова В, Сарайлиева Г, Тодорова А, Митев В. (2011) Два случая с идиопатична генерализирана епилепсия и нарушения в хромозомна област 15q13.3. Българска Неврология 11(2):92; Постер Р33; XII Национален Конгрес по Неврология, 19-21 май 2011, Боровец, България.

2. Kirov A, Dimova P, Todorov T, Todorova A, Bojinova V, Saraylieva G, Mitev V (2011). Chromosome 15q13.3 region disruptions in idiopathic generalized epilepsy. Eur J Hum Genet, 2011, 19 (suppl 2):408, P12.086; ESHG Conference 2011, Amsterdam, The Netherlands, May 28 - 31, 2011.

3. ***Kirov A***, Yordanova I, Todorov T, Todorova A, Dimova P, Tincheva R, Litvinenko I, Yotovska O, Mitev V. (2011) Four case reports on generalized epilepsy. Balkan Journal of Medical Genetics 14 (suppl):73-74; P60; 9th Balkan Meeting of Human Genetics, 15-17 September, Timisoara, Romania.

4. Kirov A, Dimova P, Todorova A, Todorov T, Bojinova V, Mitev V (2012). Novel PCDH19 mutations in Bulgarian epilepsy cases. Eur J Hum Genet, 2012, 20 (suppl 1):326, P12.190; Nurnberg, Germany, June 23-26, 2012.

ПРИНОСИ

1. Български пациенти със синдромни епилепсии бяха прекласифицирани според последната номенклатура.

2. Беше разработен системен подход за молекулярно-генетичен анализ при пациенти с ИГЕ и синдромни епилепсии с ранно начало.

3. Бяха открити непубликувани мутации в гените *MECP2*, *PCDH19* и *FOXG1*.

4. Пациентите с неизяснен молекулен дефект, представляват клинично добре класифицирана и прескринирана на молекулно ниво група за анализи от нова генерация.

SUMMARY

Epilepsy is one of the most common diseases in people with frequency of 3%. Some large epidemiological researches showed that 5% of the epilepsy patients have close relative with epilepsy.

The present study was focused on clearing the molecular genetics defects causing Idiopathic generalized epilepsy (IGE) and early onset syndromic epilepsy.

IGE is a group of different epilepsies with different clinical manifestation and represent 20-30% of all epilepsy diseases. IGE is polygenic diseas, although family monogenic cases are reported. Some of the genetic changes causing IGE are copy number variations (CNVs) of genes localized on chromosome region 15q13.3. These changes higher the probability to manifest epilepsy

Rett syndrome (RTT), is the most common cause for X-linked mental retardation in female patients. Epilepsy is manifested in 70 to 90% of the cases with typical RTT. RTT is cause by *de novo* mutations (point mutation and large deletions) of the *MECP2* (methyl-CpG binding protein 2). In rare cases it is cause by mutations in the genes *CDKL5* (cyclin dependent kinase-like 5) and *FOXG1* (Forkhead G1).

In the spectrum of early onset syndromic epilepsies are early onset epileptic encephalopathy (EEIE). This is a group of rare disease causing cognitive impairment and other brain function disturbances.

The present study was focused on EEIE types 2 and 9, which are associated with *CDKL5* and *PCDH19* gene mutations.

In the present study, molecular genetic testing was performed in 152 patients with epilepsy and/or intellectual disability. Based on their clinical symptoms the patients were separated in 3 groups: IGE (100 patients), RTT (27 patients) and EEIE (15 patients).

The present study was focused on screening for genetic mutation in the *MECP2*, *CDKL5*, *FOXG1* and *PCDH19* genes and deletions/duplication in chromosome region 15q13.3.

In the IGE group 1 (1%) deletion in 15q13.3 region was detected - [15q13.2 - *MTMR15*, *TRPM1*, *KLF13*, *CHRNA7* – 15q13.4]. In the same group 1 (1%) duplication of the *CHRNA7* gene was also detected. Both CNVs was confirmed by arrayCGH.

37 RTT patients were tested for the *MECP2* gene mutation. In addition 39 patients from a previous study were added to the group so all Bulgarian RTT patients that have been genetically tested were included in this group.

The molecular genetic testing of the MECP2 gene detected 75% mutations in typical RTT patients with epilepsy, 33% mutations in the typical RTT patients without epilepsy and 14,3%

mutations in the group of atypical RTT patients with epilepsy. In total *MECP2* mutations were detected in 40% of all RTT patients. In addition some of the RTT patients in dependence of the manifested clinical symptoms were genetically tested for mutations in the *CDKL5* and *FOXG1* genes. No mutations in the *CDKL5* gene were detected. In one case of congenital (Rolando) RTT a *FOXG1* mutation was detected.

The molecular genetic testing of the *PCDH19* and *CDKL5* genes showed mutations in 20% of the EEIE patients. One of the mutations was inherited from the asymptomatic mother. This is very rarely reported in the literature and the lack of symptoms is most probably caused by skewed X-inactivation in the mother.

The main contributions of the present study are:

- Pre-classification of the syndromic epilepsy patients according the latest nomenclature
- Develop algorithm for molecular-genetic testing of IGE and early-onset syndromic epilepsy patients
- Detection of unreported mutations in the *MECP2*, *PCDH19* and *FOXG1* genes