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

ДИСЕРТАЦИЯ

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

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).

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

		Стр.
РЕЗЮМЕ		**1**
SUMMARY		**3**
ВЪВЕДЕНИЕ		**5**
1.	**ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР**	**8**
1.1.	**ЕТИОЛОГИЯ НА ЕПИЛЕПСИЯТА**	**8**
1.1.1.	**ИДИОПАТИЧНА ЕПИЛЕПСИЯ**	**8**
1.1.2.	**СИМПТОМАТИЧНА ЕПИЛЕПСИЯ**	**8**
1.1.3.	**КРИПТОГЕННА ЕПИЛЕПСИЯ**	**9**
1.1.4.	**ПРОГРЕСИВНА ЕПИЛЕПСИЯ**	**9**
1.2.	**КЛАСИФИКАЦИЯ НА ЕПИЛЕПТИЧНИТЕ ПРИСТЪПИ**	**9**
1.2.1.	**ПАРЦИАЛНИ ПРИПАДЪЦИ**	**9**
1.2.2.	**ГЕНЕРАЛИЗИРАНИ ПРИПАДЪЦИ**	**10**
1.2.3.	**НЕЕПИЛЕПТИЧНИ ПРИПАДЪЦИ**	**11**
1.2.4.	**ЕПИЛЕПТИЧЕН СТАТУС**	**11**
1.3.	**ИДИОПАТИЧНА ГЕНЕРАЛИЗИРАНА ЕПИЛЕПСИЯ - КЛИНИЧНА КАРТИНА И МОЛЕКУЛНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ**	**11**
1.4	**СИНДРОМ НА RETT - КЛИНИЧНА КАРТИНА И МОЛЕКУЛНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ**	**18**
1.5	**ЕПИЛЕПТИЧНИ ЕНЦЕФАЛОПАТИИ - КЛИНИЧНА КАРТИНА И МОЛЕКУЛНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ**	**27**
1.5.1.	**РАННА ИНФАНТИЛНА ЕПИЛЕПТИЧНА ЕНЦЕФАЛОПАТИЯ, ТИП 9**	**29**
1.5.2.	**РАННА ИНФАНТИЛНА ЕПИЛЕПТИЧНА ЕНЦЕФАЛОПАТИЯ, ТИП 2**	**35**
1.6.	**ОБОБЩЕНИЕ НА ЛИТЕРАТУРНИТЕ ДАННИ**	**35**
2.	**ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**	**36**
2.1.	**ЦЕЛ**	**36**
2.2.	**ЗАДАЧИ**	**36**
3.	**МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**	**38**
3.1.	**МАТЕРИАЛИ**	**38**
3.1.1.	**КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ**	**38**
3.1.2.	**БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ**	**39**
3.2.	**МЕТОДИ**	**39**
3.2.1.	**ПРЕДАНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА МАТЕРИАЛА**	**39**
3.2.1.1.	**Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв по солевия метод**	**39**

3.2.1.2.	Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна, капилярна кръв или букална лигавица по фенол-хлорофорен метод	41
3.2.1.3.	Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв чрез кит	42
3.3.	АНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА МАТЕРИАЛА	42
3.3.1.	ПОЛИМЕРАЗНА ВЕРИЖНА РЕАКЦИЯ	42
3.3.2.	ЕЛЕКТРОФОРЕЗА В АГАРОЗЕН ГЕЛ	47
3.3.3.	ЕЛЕКТРОФОРЕЗА ЗА ФРАГМЕНТЕН АНАЛИЗ НА АВТОМАТИЧЕН СЕКВЕНАТОР	47
3.3.5.	ДИРЕКТНО СЕКВЕНИРАНЕ ПО SANGER	49
3.3.6.	МУЛТИПЛЕКСА ЛИГАЗНО ЗАВИСИМА АМПЛИФИКАЦИЯ, MLPA	53
4.	**РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ**	**56**
4.1.	ИДИОПАТИЧНА ГЕНЕРАЛИЗИРАНА ЕПИЛЕПСИЯ	57
4.1.1.	ПОДБОР НА ГРУПА ПАЦИЕНТИ С ДИАГНОЗА ИДИОПАТИЧНА ГЕНЕРАЛИЗИРАНА ЕПИЛЕПСИЯ. КЛИНИЧНИ ДАННИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНАТА ГРУПА ПАЦИЕНТИ	58
4.1.2.	МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ	62
4.1.3.	ОБОБЩЕНИЕ НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ	79
4.2.	СИНДРОМ НА RETT	81
4.2.1.	КЛИНИЧНИ СИМПТОМИ	81
4.2.2.	ЦИТОГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ	83
4.2.3.	МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ	83
4.3.	ЕПИЛЕПТИЧНИ ЕНЦЕФАЛОПАТИИ С РАННО НАЧАЛО	100
4.3.1.	КЛИНИЧНИ И ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ	100
4.4.	ОБОБЩЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ	112
5.	**ИЗВОДИ**	**115**
6.	**БИБЛИОГРАФИЯ**	**116**
6.1.	БЪЛГАРСКА ЛИТЕРАТУРА	116
6.2.	ЧУЖДОЕЗИЧНА ЛИТЕРАТУРА	116
6.3.	ИНТЕРНЕТ САЙТОВЕ	129
7.	**ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ**	**131**
9.	**ПРИНОСИ**	**133**

РЕЗЮМЕ

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 (ИГЕ) представлява група от епилепсии с различни клинични прояви. ИГЕ 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.

Основни приноси на настоящето проучване са:

- прекласифициране според последната номенклатура на пациентите със синдромни епилепсии
- въвеждане на алгоритми за молекулярно-генетичен анализ при пациент с идиопатична генерализирана епилепсия и синдромни епилепсии с ранно начало.
- откриване на непубликувани до момента мутации в гените *MECP2*, *PCDH19* и *FOXG1*.

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

ВЪВЕДЕНИЕ

Епилепсиите са сред най-честите неврологични заболявания при хората с честота около 3% [Hauser, et al., 1993]. Средно 5% от пациентите имат пряк родственик с епилепсия [Bianchi et al., 2003; Helbig, et al., 2009], което предполага ролята на генетични фактори при това заболяване. Често епилепсията се придружава и от интелектуален дефицит, което насочва към генетична консултация и последващи генетични изследвания.

В същото време епилепсията при голям процент засегнати остава един от най-важните неизяснени проблеми в съвременното здравеопазване. 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. Заболяването е полигенно, въпреки че са известни и фамилни случаи с моногенно унаследяване [Helbig, et al., 2008]. 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. Пациентите често произхождат от семейства с фамилна история за епилепсия. Генетичните изменения водят до предразположение към пристъпи, като се понижава прагът за тяхното възникване. Въпреки че са изцяло генетични, фенотипната им проява не може да бъде точно предсказана.

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 пациентите 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.

1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Епилепсиите са сред най-честите неврологични заболявания при хората с честота около 3% [Hauser, et al., 1993]. Проведените големи епидемиологични проучвания установяват, че около 5% от пациентите имат пряк родственик с епилепсия [Bianchi et al., 2003; Helbig, et al., 2009]. Наследствеността при епилепсия е отдавна известна, но появата на молекулярната генетика бележи революция в разбирането за епилептичната генетика, която има не само научно, но и все по-нарастващо клинично значение.

1.1. ЕТИОЛОГИЯ НА ЕПИЛЕПСИЯТА

1.1.1. Идиопатична епилепсия: Най-често се свързва с развитието на епилепсия в ранното детство и юношеството. Тя е с неизвестна етиология, счита се за генетично детерминирана и обикновено се асоциира със специфични електроенцефалографски (ЕЕГ) находки, изображения чрез ядрено магнитен резонанс (ЯМР, MRI-magnetic resonance imaging) и компютърна томография (КТ, CT-computerized tomography) [Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1989]. Известно е, че рискът от унаследяване на епилепсията при близки родственици или децата на засегнатите индивиди е по-голям в сравнение с риска в общата популация [Gardiner et al, 2003]. В повечето случаи унаследяването е многофакторно, включващо повече от един ген и фактори на средата [Sheffer and Berkovic, 2003].

1.1.2. Симптоматична епилепсия: тя е придобита и се асоциира със структурни аномалии на мозъка. Причини могат да са травма на главата, родова травма, мозъчносъдово заболяване, мозъчна инфекция, малформации и тумори на мозъка. Това е най-честата причина за епилепсия при възрастните. При симптоматичната епилепсия рискът от повторение е с неясна етиология [Diagnose and management of epilepsies in children and young people, 2005; www.sign.ac.uk].

При редица генетични нарушения в периода на новороденото или първата година от живота на човека, епилепсия се появява като съпътстващ симптом на един по-сложен фенотип. Тези т.нар. симптоматични епилепсии включват метаболитни

нарушения (хиперамонемия, дефицит на пируват дехидрогеназния комплекс и др.) [Atlas: Epilepsy care in the world, 2005].

1.1.3. Криптогенна епилепсия: когато няма ясна аномалия или не е идентифициран предполагаем рисков фактор, за да бъде класифицирана като симптоматична. Обикновено при над 40% от пациентите не може да се идентифицира конкретна причина за припадъците. Този процент значително намалява с навлизането на невроизображенията, чрез ЯМР.

1.1.4. Прогресивна епилепсия: тя се характеризира с развитие на миоклонични и други припадъци заедно с други клинични наследствени дегенеративни заболявания на мозъка и вродени грешки на обмяната (адренолевкодистрофия, фенилкетонурия, порфирия). Епилепсията може да е съпътстващ симптом на други заболявания (болест на Алцхаймер, хорея на Хънтингтон и др.) [World Health Organization - Atlas: Epilepsy care in the world, 2005].

1.2. КЛАСИФИКАЦИЯ НА ЕПИЛЕПТИЧНИТЕ ПРИСТЪПИ

Съгласно международната класификация, изготвена от Dreifuss [1989] епилептичните пристъпи се делят на следните големи групи:

1.2.1. Парциални (фокални, локални, огнищни) припадъци – фокусират се в определен участък на едната мозъчна хемисфера.

Те биват: *прости* парциални, при които загубата на съзнание не е задължителна и са съпроводени със сензорни и моторни симптоми; *сложни* парциални със загуба на съзнание. Парциалните припадъци могат да се разпространят и да причинят генерализирани гърчове, като в този случай се класифицират като *вторично* генерализирани пристъпи. Парциалните припадъци са най-често срещаният тип гърчове при хора с епилепсия. Като част от парциалния пристъп могат да се наблюдават всякакви двигателни, сетивни или емоционални симптоми, включително комплексни зрителни и слухови халюцинации.

1.2.2. Генерализирани припадъци (с или без конвулсии) – засягат се двете мозъчни хемисфери от самото начало на пристъпа, което води до загуба на съзнание за различен период от време. Те биват: тонично-клонични, миоклонични, клонични, тонични, абсансни и атонични.

Генерализирани тонично-клонични припадъци (ГТКП, "гранд мал") - най-често срещаният и най-добре познатият вид генерализирани припадъци. Те започват с втвърдяване на крайниците (тонична фаза), следвано от резки движения (конвулсии) на крайниците и лицето (клонична фаза). По време на тоничната фаза, дишането може да се забави или напълно да спре, предизвиквайки цианоза на устните, на нокътните плочки и лицето. Дишането обикновено се възстановява по време на клоничната (конвулсивна) фаза, но често е неравномерно.

В някои случаи *тонични* и *клонични* припадъци се наблюдават независимо един от друг.

В резултат на припадъка може да се наблюдава инконтиненция, прехапване на езика или устните, шумно и затруднено дишане. По време на припадъка пациентът може да бъде обърнат на една страна, това ще предотврати задавяне и ще запази дихателните пътища свободни. След припадък пациентът обикновено е летаргичен, смутен и сънлив. Може да има главоболие. Напълно възстановяване настъпва от няколко минути до часове.

Миоклонични припадъци - бързи, кратки контракции на мускулите от двете страни на тялото, които обикновено се появяват по едно и също време. Рядко включват едната ръка или крак. Може да се наблюдава и при хора без епилепсия, като при тях се изразява с внезапен спазъм на крак по време на сън. Първа помощ обикновено не е необходима, но човек получил миоклонични конвулсии за първи път трябва да премине през медицински преглед.

Атонични припадъци (дроп атака, астатични или акинетични гърчове) - внезапна загуба на мускулен тонус, изразяваща се в отпускане на главата, свличане на тялото или внезапен колапс. Тъй като атоничните припадъци са внезапни и могат да доведат до наранявания на главата и лицето, понякога пациентите използват защитни шапки. Припадъците често са устойчиви на медикаментозно лечение. Оказване на първа

помощ не е необходимо (освен ако не е налице нараняване, причинено от падане). При първи атоничен припадък, пациентът трябва да премине през цялостен медицински преглед.

Абсансни припадъци – отклоняване на съзнанието, понякога с втренчване на погледа, започва и свършва внезапно, с продължителност само няколко секунди. Тези припадъци се срещат по-често при деца между 4 и 12 годишна възраст, отколкото при възрастни. Детето, независимо дали се намира в седнало или изправено положение, втренчва поглед, не говори, не чува, какво му се казва. След няколко секунди, също така внезапно, то продължава с предишната си дейност. Абсансните гърчове често са толкова кратки, че те трудно могат да бъдат открити, дори ако детето получава от 50 до 100 атаки дневно. Абсансите са свързани с типична ЕЕГ находка на острие и бавна вълна, обикновено при честота 3Hz [Atlas: Epilepsy care in the world, 2005].

1.2.3. Неепилептични припадъци – свързани са с кратка промяна във физиологичното или психично състояние на индивида и често изглеждат като епилептични припадъци. Неепилептичните гърчове не са причинени от електрически смущения в мозъка.

1.2.4. Епилептичен статус (Status epilepticus, SE) – терминът описва живото-застрашаващо състояние, при което мозъкът е в състояние на постоянна конфискация (гърч). SE се определя като един непрекъснат припадък или повтарящи се пристъпи, без възвръщане на съзнанието между тях с продължителност повече от 30 минути.

1.3. ИДИОПАТИЧНА ГЕНЕРАЛИЗИРАНА ЕПИЛЕПСИЯ - КЛИНИЧНА КАРТИНА И МОЛЕКУЛНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Идиопатичната генерализирана епилепсия (idiopathic generalized epilepsy, 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 и автозомно доминантно унаследяване [Helbig, et al., 2008]. Групата се характеризира със следните особености:

- Пациентите са с нормални резултати от неврологичните прегледи, нормална интелигентност и нормален резултат от ядрено-магнитен резонанс (ЯМР).

- Началото на заболяването е в детска възраст, въпреки че диагностицирането може да настъпи и по-късно. Пациентите често произхождат от семейства с фамилна история за епилепсия.
- Пациентите имат един или повече типове от следните генерализирани пристъпи: миоклонични, абсансни или генерализирани тонично-клонични.
- Тези епилепсии са генетично обусловени и не се наблюдават анатомични изменения на мозъка.
- Генетичните изменения водят до предразположение към пристъпи, като се понижава прагът за тяхното възникване.
- Въпреки че са изцяло генетични, фенотипната им проява не може да бъде точно предсказана.

<u>Кратко описание на основните типове пристъпи, наблюдавани при IGE:</u>

- Генерализирани тонично-клонични пристъпи – конвулсивни пристъпи с обичайна продължителност 1-2 минути.

- Абсансна епилепсия – кратки епизоди с продължителност няколко секунди, съпроводени с арест от активност.

- Миоклонични пристъпи - кратки пристъпи (обикновено сутрин) с резки конвулсии на отделни части от тялото [Benbadis et al.,1996; 1999; 2001; Berkovic et al., 2001; Lancman et al 1995; Reutens et al., 1995].

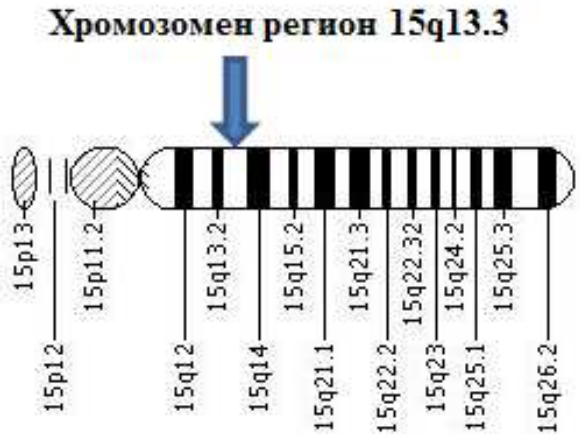
В зависимост от началото на поява, доминиращите типове гърчове и ЕЕГ находки, IGE се разделят на няколко типа:

- Детска абсансна епилепсия – обикновено започва на 4-10 годишна възраст. Основно се наблюдават абсансни пристъпи, които са кратки (около 10 секунди), но чести (обикновенно повече от 10 на ден). Средно при 50% от пациентите се наблюдават и генерализирани тонично-клонични пристъпи и много рядко миоклонични пристъпи. ЕЕГ показва много характерни вълнови комплекси.
- Юношеска миоклонична епилепсия (Juvenile myoclonic epilepsy, JME) – започва в юношеска възраст (12-18 годишна възраст), характеризира се с миоклонични пристъпи, обикновено настъпващи сутрин, ЕЕГ показва специфичен профил (генерализирани остриета, често съпроводени с комплекси острие-вълна).
- Epilepsy with grand-mal seizures – генерализирани тонично-клонични гърчове. ЕЕГ показва генерализирани остриета.

Основна част от пациентите с IGE показват сложна генетична етиология [Ottamn 2005]. Генетичните изменения, водещи до IGE 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%. Делецията е с вариращи граници, но критичният регион, който винаги отпада е с размер 1,5Mb и съдържа 7 гена:

- Rho-type GTPase-activating protein 11B (*ARHGAP11B)*
- Myotubularin related protein 10 (*MTMR10)*
- Myotubularin-related protein 15 (*MTMR15)*
- Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1 (*TRPM1)*
- Kruppel-like factor 13 (*KLF13)*
- Otu domain-containing protein 7A (*OTUD7A)*
- Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7 (*CHRNA7*)

Хромозомният регион 15q13.3 е разположен на дългото рамо на 15-та хромозома (Фигура 1).

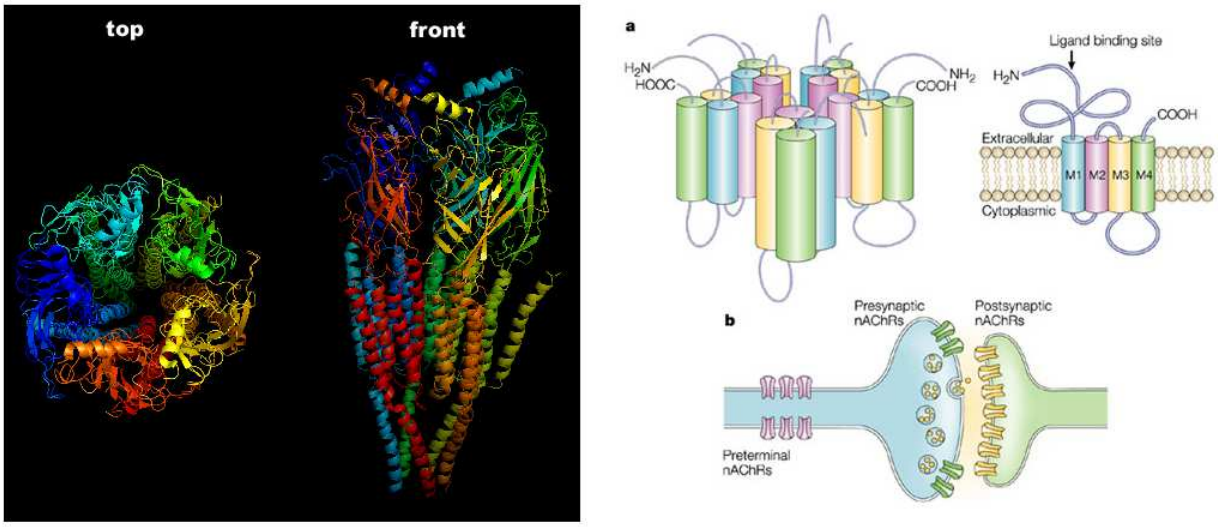


Фигура 1. Разположение на хромозомен регион 15q13.3.

Генът *CHRNA7 (OMIM *118511*) кодира α7 субединицата на никотин-ацетилхолинови рецептори и е кандидат ген за епилепсия.

Никотин-ацетилхолиновите рецептори (nAChRs) са група протеини, отнасящи се към суперфамилията на лиганд зависимите йонни канали, участващи в предаването на бързи сигнали. Те са съставени от 5 субединици (Фигура 2) като различните комбинации

от субединици водят до голямо разнообразие при този вид рецептори (Фигура 2). Всяка субединица е съставена от голям домен в N-края, който изгражда център за свързване с ацетилхолин. Следват 4 трансмембранни домена (M1-M4), от които M2 определя йонната селективност (CHRNA7 хомопентамерът е селективен за Ca^{2+} йони). C-краят представлява цитоплазмена опашка.

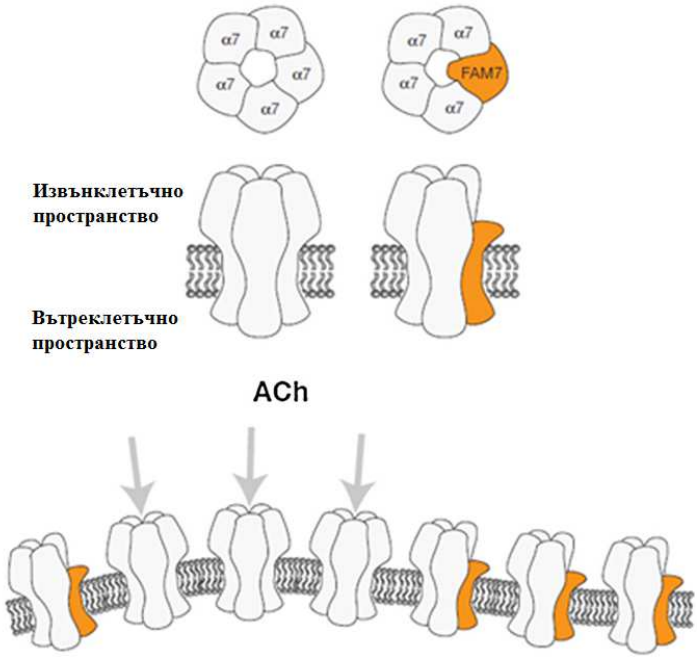


Фигура 2. Структура на nAChR [Steven at al., 2004].

Функцията на CHRNA7 протеина все още не е напълно известна, но асоциативни проучвания доказват връзката му с биполярни афективни разстройства, шизофрения и епилепсия [Elmslie et al., 1997; Neubauer et al., 1998; Stassen et al., 2000; Turecki et al., 2001].

Генетичните проучвания на региона 15q13-q14 са затруднени поради наличието на дупликация на част от *CHRNA7* гена. Дуплицираният регион е под формата на хибриден ген *CHRFAM7A*, изграден от сливане на екзони 5-10 на *CHRNA7* и екзони A-E от FAM7A гена [Riley et al., 2002]. Фузионният протеин е с доказана експресия и два варианта за алтернативен сплайсинг, но без доказана транслация. Теоретичен анализ на гена показва наличието на отворена рамка на четене. Транслацията, дори на по-голямата рамка на четене, би довела до протеин с трансмембранни домени, идентични с тези на CHRNA7, но без наличието на основната част от лиганд-свързващия домен [http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CHRFAM7A].

Някои автори приемат, че хибридният ген *CHRFAM7A* се експресира [Araud et al., 2011]. В такъв случай е възможно формирането на nAChR с или без участието на *CHRFAM7A* протеин (Фигура 3).

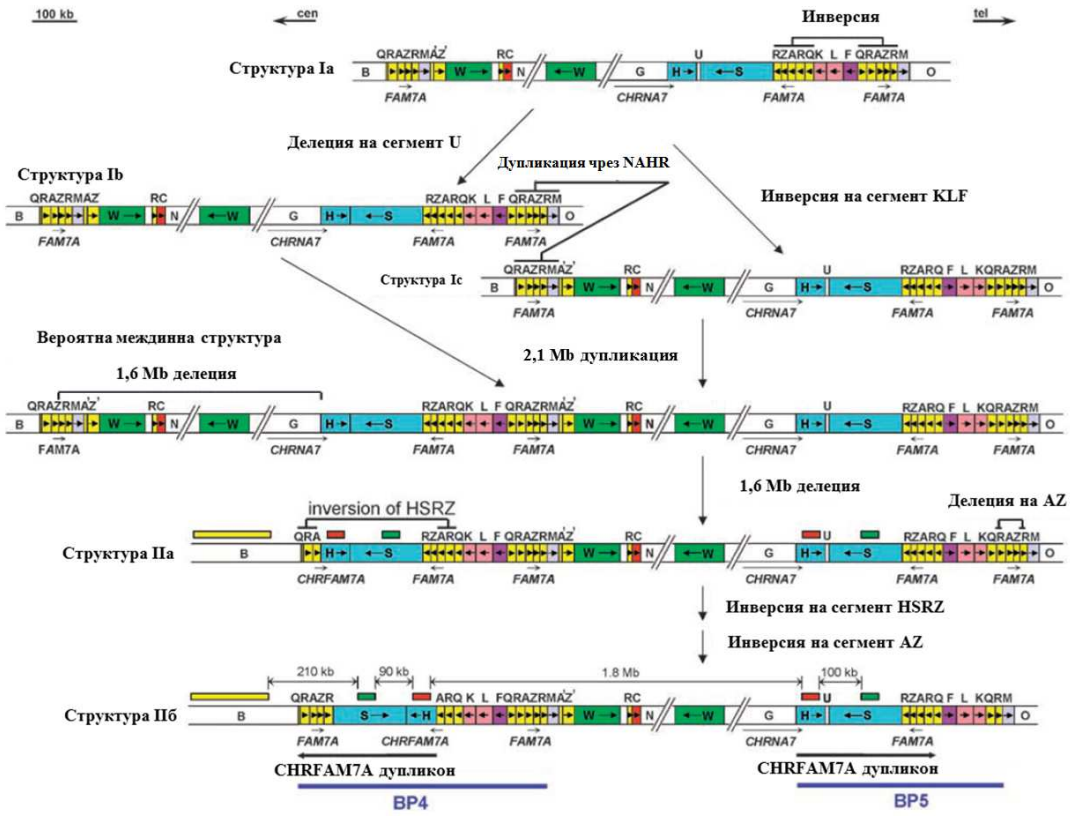


Фигура 3. Теоретична структура на nAChR при експресия и транслация на *CHRFAM7A* гена [Araud et al., 2011].

Пълната хомология в региона на трансмембранните домени позволява формирането на ацетилхолинов рецептор, но той ще бъде с нарушен цетър за свързване с ацетилхолин, т.е. йонният канал ще бъде нечувствителен към лиганда.

Интересен факт е, че наличието на хибридния ген *CHRFAM7A* е уникално за хората и не се среща при други висши примати [Locke et al., 2003]. Наблюдават се популационни вариации по отношение на броя копия (CNV) на *CHRFAM7A.* Доказани са асоциации между този CNV и различни психози [Flomen et al., 2006]. Хомозиготните носители на т.нар нулев алел на този CNV, т.е. отсъствието на хибридния ген *CHRFAM7A* в двете копия на 15-та хромозома е изключително рядко, за разлика от хетерозиготните носители. Хетерозиготните носители се срещат при психично здрави контроли с честота 16%, а при психично болни – честотата е 24% [Flomen et al., 2008].

Допълнителни изследвания на региона показват, че посоката на *CHRFAM7A* може да е както съвпадаща с посоката на *CHRNA7*, така и обратна. В класическия случай има поне 2 копия на *CHRFAM7A* дупликона с обратна една на друга посока. Това, както и познаването на структурата на нулевия алел, позволи да се предположи модел за възникване на хибридния ген (Фигура 4).



Фигура 4. Модел за възникване на дупликон, съдържащ *CHRFAM7A* [Flomen et al., 2008]. Хомоложните сегменти (например QRAZR) са отбелязани с еднаква буква.

В модела се приема наличието на две близки по последователност предхождащи структури (структура Ib и Ic), произлизащи от една първоначална структура (Ia) чрез пренареждане или отпадане на сегменти. Двата сегмента преминават през неалелна хомоложна рекомбинация (NAHR) с участието на прав повтор от хомоложни елементи QRAZRM. Това води до генерирането на нестабилна междинна структура. Тя претърпява нехомоложна делеция (структура IIa) с последващи инверсии до формиране на крайна структура (IIb) с наличие на два *CHRFAM7A* дупликона с противоположна посока. Междинните структури до момента не са изолирани и не е доказано, че съществуват, което оставя отворен въпроса за механизма на възникване на дупликоните.

Наличието на хомоложни последователности предразполага региона към допълнителни пренареждания. Такива региони се наричат точки на разкъсване (Break points – BP). При наличието на няколко BP, те се номерират последователно в посока от центромера към теломера. *CHRFAM7A* дупликоните формират 2 точки на разкъсване (BP4 и BP5).

Публикуваните данни от последните 3 години показват, че честотата на 15q13.3 микроделеция при пациенти с IGE е около 1% [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 изявата на епилепсия е спорно, защото освен при пациенти с IGE тази дупликация е откривана и при здрави контроли [Helbig et al., 2009]. По тази причина дупликацията се разглежда като рисков фактор, свързан с предразположение към епилепсия в значително по-ниска степен спрямо микроделеции в същия регион [Helbig et al., 2008; Stein, 2009].

Проучвания на IGE в България

До момента в при български пациенти с IGE са извършвани прицелни генетични изследвания при конкретни типове IGE. При български пациенти с генерализирана епилепсия с фебрилни гърчове плюс (Generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+) са откривани мутации в *SCN1A* гена [Иванов и сътр., 2005; Димова и сътр., 2008; Suls et al., 2010; Dimova et al., 2010; Yodanova et al., 2011]. Въпреки това до момента не са асоциирани CNV в 15q13.3 региона при български пациенти с IGE.

1.4. СИНДРОМ НА RETT - КЛИНИЧНА КАРТИНА И МОЛЕКУЛНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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. Наблюдава се прогресираща енцефалопатия [Hagberg et al., 1983]. Пациентите с Rett синдром обикновено показват нормално развитие през първите 6-18 месеца, след което следва задръжка в развитието, последвана от бързо влошаване на мозъчните функции. Симптомите варират от леки до тежки. Обикновено първите признаци на заболяването са хипотония и стереотипно движение на ръцете и краката. Забавен растеж на главата (микроцефалия) се забелязва около $5^{ти}$-$6^{ти}$ месец. Появяват се забележими промени в развитието, изоставане в растежа, тежки проблеми с говорното развитие. Постепенно се загубва целевото движение на ръцете, забелязва се размахване на ръцете или често поставяне в устата. Други симптоми са апраксия, клатещо се нестабилно тяло или ходене на пръсти, сколиоза, загуба на социален контакт, липса на очен контакт, дефицит на внимание. Допълнителни неврологични отклонения са спастични парапарези, вазомоторни нарушения на долните крайници и епилепсия (гърчове).

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]. Много събития, които се оприличават на пристъпи, не корелират с изменения в ЕЕГ. Пристъпите обичайно започват в детска възраст и отслабват с напредване на възрастта. Едва една малка част остават тежки и са резистентни на лечение [Buoni et al., 2008; Artuso et al., 2008]. Обикновено по-ранното начало се асоциира с по-тежко засягане [Nissenkorn et al., 2010]. Наблюдават се разлики по отношение на начало, тип на гърчовете и медикаментозна резистентност [Pintaudi et al., 2010]. Индивидите с епилепсия проявяват по-тежка клинична картина по отношение на типичния фенотип за синдрома (по-голяма степен на умствено изоставане, стереотипни движения и липса на комуникативност [Glaze et al., 2010]. Това отрицателно влияние е особено изразено при

пациенти с генерализирани, продължителни, цианозни и медикаментозно-резистентни гърчове [Bahi-Buisson et al., 2008].

Поради огромното разнообразие от клинични симптоми, съпровождащи RTT, през 2010 година критериите за заболяването бяха ревизирани [Neul et al., 2010]. Наскоро в българската медицинска литература бяха публикувани основните клинични характеристики, съвременните диагностични критерии и молекулярно-генетични подходи при синдрома [Димова, 2010a, 2010b].

Международните диагностични критерии са показани на Таблица 1.

Таблица 1. Ревизирани диагностични критерии при синдром на Rett [Neul et al., 2010].

Диагностични критерии за RTT при постнатално забавяне растежа на главата

ИЗИСКВАНИЯ	
Типичен (класически) RTT	**Атипичен (вариант) RTT**
1. Период на регрес, последван от стабилизиране	1. Период на регрес, последван от стабилизиране
2. Наличие на всички основни и допълнителни критерии	2. Наблюдават се поне 2 от 4-те основни критерии
3. Допълнителните критерии не са задължителни, но често се манифестират при класически RTT	3. Наблюдават се поне 5 от 11-те основни критерии

КРИТЕРИИ		
Основни критерии	1. Частична или пълна загуба на придобитите, съзнателно използвани умения на ръцете 2. Частична или пълна загуба на придобитите говорни умения 3. Анормална походка – частична (диспраксия) или пълна липса 4. Стереотипни движения на ръцете	
Критерии за изключване на типичен RTT	1. Мозъчни увреждания след пери- или постнатална травма,невrometаболитни заболявания или тежка инфекция, водеща до неврологични проблеми 2. Тежко абнормално психомоторно развитие през първите 6 месеца от живота	
Критерии в подкрепа на атипичен RTT	1. Дихателни нарушения в будно състояние 2. Бруксизъм в будно състояние 3. Нарушен патерн на съня 4. Абнормален мускулен тонус 5. Периферни вазомоторни нарушения 6. Сколиоза / скифоза	7. Нарушения в растежа 8. Малки, студени ръце и крака 9. Епизоди с издаване на неподходящ смях/писъци 10. Снижен праг на болка 11. Засилен очен контакт – втренчен поглед

Атипичният RTT се разделя на 3 форми според спецификата на клиничните симптоми (Фигура 5).



Фигура 5. Форми на RTT вариант според ревизираните клинични критерии [Neul et al., 2010].

През 1999 беше установено, че мутации в гена, кодиращ протеина Methyl-CpG binding protein 2 (*MECP2*), са асоциирани със синдром на RTT [Amir et al., 1999]. Генът е разположен на дългото рамо на Х-хромозомата. Мутации в *MECP2* гена се срещат при около 95-97% от индивидите с типичен RTT [Neul et al., 2008]. При „атипични“ пациенти процентът е по-нисък (50-70%) [Neul et al., 2010]. Между 3 и 5% от случаите, които отговарят на стриктните клинични критерии за синдром на RTT, нямат мутации в *MECP2*. У нас са описвани отделни случаи с класически RTT, дължащи се на различни по големина мутации в *MECP2* гена [Сарайлиева и съавт., 2010]. При по-обширни проучвания се установява сравнително ниска честота на *MECP2* мутации при български RTT пациенти – 25% [Todorov et al., 2010, Тодоров, 2011].

В допълнение към това, мутации в *MECP2* са детектирани при пациенти без клинични симптоми на RTT. Докладвани са асимптоматични жени, носителки на *MECP2* мутации при фамилни случаи на RTT [Wan et al., 1999]. Тези индивиди са с екстремна Х инактивация, позволяваща пълна липса на фенотип, поради хиперметилиране на мутантното копие на *MECP2* гена. Момчета носители на известни мутации в *MECP2* гена, причиняващи типичен RTT при момичета са с тежко засягане или загиват вътреутробно. Тези момчета развиват тежка ранна постнатална енцефалопатия, ранна

смърт и липса на типичните RTT клинични прояви. [Wan et al., 1999; Kankirawatana et al., 2006]. В някои случаи на ранна енцефалопатия, пациенти с *MECP2* мутации изявяват и други неврологични състояния, например аутизъм [Carney et al., 2003], Angelman-подобен синдром [Watson et al., 2001] и неспецифичен интелектуален дефицит.

Мутации в други генетични локуси освен *MECP2* се откриват при пациенти с атипичен RTT. Така например мутации в гена, кодиращ Cyclin-Dependent Kinase-Like 5 (*CDKL5* - MIM *300203, хромозомна локализация Xp22.13), са откривани при пациенти с RTT вариант и епилепсия с ранно начало [Bahi et al., 2008]. Пациентите обаче не изявяват някоя от отличителните черти на RTT, например ясен период на регрес и характерния „напрегнат“ втренчен поглед [Bahi et al., 2008].

При пациенти с конгенитален вариант на RTT са открити мутации в друг генетичен локус Forkhead Box G1 (*FOXG1* - MIM *164874, хромозомна локализация 14q12) [Ariani et al., 2008].

Големият брой публикувани случаи на атипичен RTT позволи да се направят някои препоръки за хода на молекулярно-генетичната диагностика при различните RTT варианти (Фигура 6).

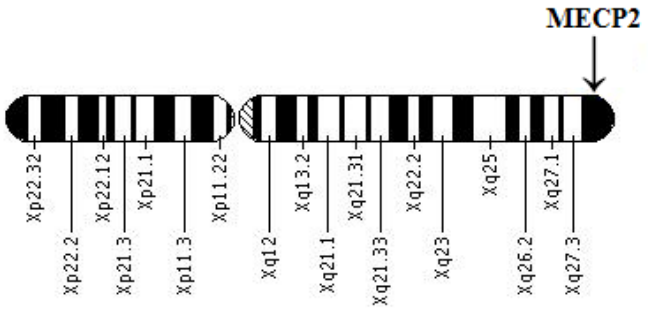


Фигура 6. Препоръки за хода на молекулярно-генетичния анализ при различни форми на RTT [Neul et al., 2010].

Генетични локуси, асоциирани със синдром на Rett:

1. ***MECP2*** (Methyl-CpG-binding protein 2, - MIM#300005)

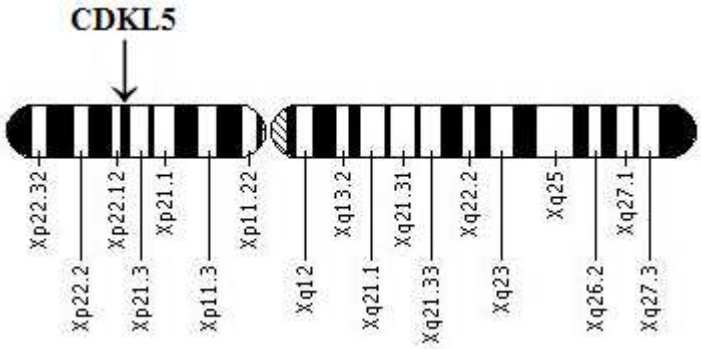
Генът е разположен на дългото рамо на Х хромозомата (Xq28) и подлежи на Х-хромозомна инактивация (Фигура 7) [Meehan et al., 1992; Adler et al., 1995; D'Esposito et al., 1996; Vilain et al., 1996].



Фигура 7. Локализация на *MECP2* гена (Methyl-CpG-binding protein 2) върху Х-хромозомата [http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/mecp2.jpeg]

Генът *MECP2* има 4 екзона, от които кодиращи са 2, 3 и 4 и се характеризира с много голям интрон 2 (около 60 кб) [Coy et al., 1999]. Транскрибира се от центромера към теломера, като на транскрипционно ниво се характеризира с високо консервативен 3'-нетранслируем регион от 8.5 кб [Coy et al., 1999]. Белтъчният продукт MeCP2 се състои от 486 аминокиселинни остатъка, асоцииран е с хроматина и има три главни домена: метил-свързващ домен, домен подтискащ транскрипцията и С-терминален домен с неясна функция. Този белтък се свързва с метилираните CpG острови, като *in vivo* е главно концентриран в зоната на хетерохроматина, но се среща и в зоната на еухроматина. Смята се, че основната функция на белтъка MeCP2 е репресираща чрез ремоделиране и опаковане на хроматина. За момента не се знаят точно гените, които се регулират специфично чрез действието на MeCP2. Друга функция на MeCP2 е взаимодействието с високоповторени елементи като LINE1 ретротранспозони [Yu et al., 2001].

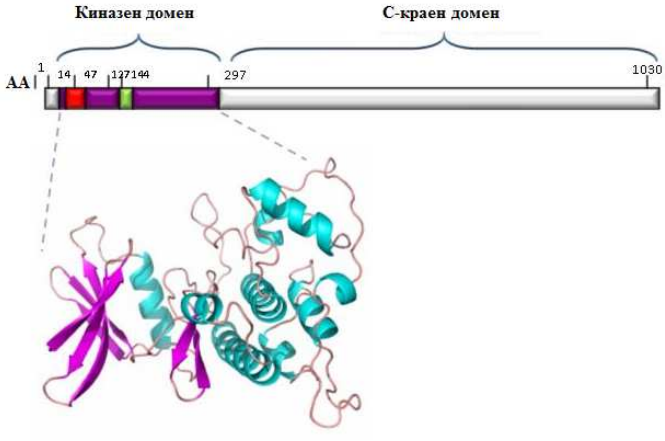
2. ***CDKL5*** – циклин-зависима киназа подобен белтък 5 (Cyclin-dependent kinase like 5, OMIM#300203) [Archer et al.,2006a]. Генът е разположен на късото рамо на Х хромозомата (Xp22) (Фигура 8) [Scala et al.,2005].



Фигура 8. Локализация на CDKL5 гена (Cyclin-dependent kinase-like 5) върху Х-хромозомата [http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/cdkl5.jpeg]

Генът *CDKL5* има 21 екзона (20 кодиращи) и покрива 228023 бази от човешкия геном. CDKL5 протеинът е от особена важност за правилната мозъчна дейност. CDKL5 е протеин с киназна активност, т.е. фосфорилирането на други протеини, чрез което влияе на тяхната функционална активност. Един от тези протеини е MeCP2, които играе важна роля в регулиране на невронната активност (виж по-горе).

Структурата на CDKL5 е сравнително проста – той е изграден от един N-краен домен с киназна активност и един С-краен домен с все още неизяснена функция (Фигура 9).



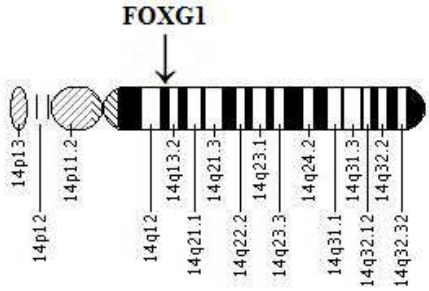
Фигура 9. Схематично представяне на структурата на CDKL5 протеина [http://protein.bio.unipd.it/research/disease.html].

Най-честите мутации в *MECP2* и *CDKL5* гените са точкови мутации: транзиции и трансверзии, при които се заменя една аминокиселина с друга (missense) или се генерира стоп кодон (nonsense). Срещат се и малки делеции и инсерции на няколко нуклеотида, както и комбинирани инсерции/делеции (indels) [Todorov et al., 2012; Тодоров Т, 2011, дисертационен труд; www.mecp2.chw.edu.au].

В допълнение в тези гени се откриват и големи делеции и дупликации, покриващи региони от един или няколко гена [Kleefstra et al., 2002; Ravn et al., 2005; Hardwick et al., 2007; Lugtenberg et al., 2009; Тодоров Т, 2011, дисертационен труд]. Голямата клинична вариабилност на RTT корелира с типа на мутацията, нейното разположение в MECP2 гена и инактивацията на Х хромозомата [Amir et al., 2000].

Множество фактори на средата могат да променят нивото на кодирания от *MECP2* гена белтък в мозъка и да предизвикат ефект подобен на мутация в *MECP2* гена. Мутации в *MECP2* и *CDKL5* гените са отговорни и за изява на атипични форми Rett синдром.

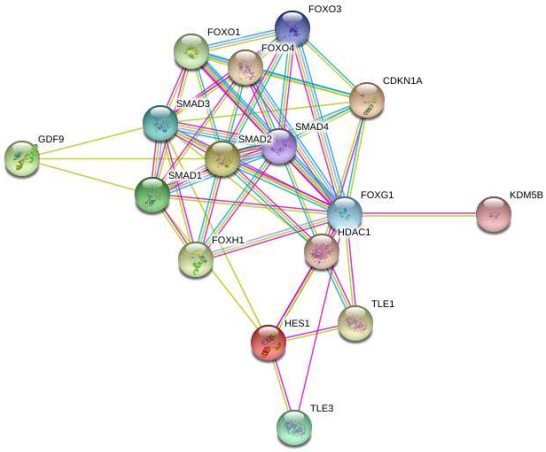
3. ***FOXG1*** (Forkhead G1, OMIM#164874). Генът е локализиран на 14-та хромозома (14q13) [Ariani et al., 2008]. Локализацията на *FOXG1* гена е представена на Фигура 10.



Фигура 10. Локализация на *FOXG1* гена (Forkhead G1) върху 14-та хромозома [http://ghr.nlm.nih.gov/gene=foxg1].

Този ген има 1 екзон и покрива 2584 базови двойки. Докладваните до момента мутации във *FOXG1* гена са точкови замени от типа missense и nonsense [www.mecp2.chw.edu.au].

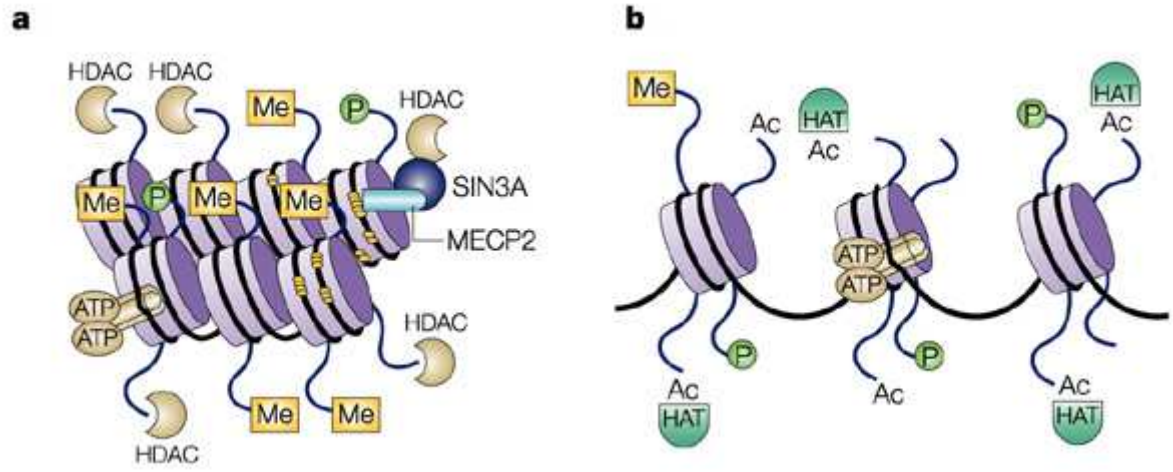
FOXG1 кодира протеина Forkhead box G1 (FoxG1). Това е транскрипционен фактор, който се експресира тъканно специфично в мозъка и тестисите. Протеинът FoxG1 си взаимодейства с транскрипционен репресор JARID1B и транскрипционни корепресори от фамилията на Groucho протеини. До момента са известни директни взаимодействия на FoxG1 протеина със сравнително малък брой протеини, но информацията за мрежата от взаимодействия постоянно се разширява (Фигура 11).



Фигура 11. Схема на взаимодействие между протеини, асоциирани с белтъка FoxG1 [http://string-db.org/].

Взаимодействието между тези транскрипционни фактори е с важна функционална роля за ранното развитие на мозъка. Подобно на белтъка MeCP2 и

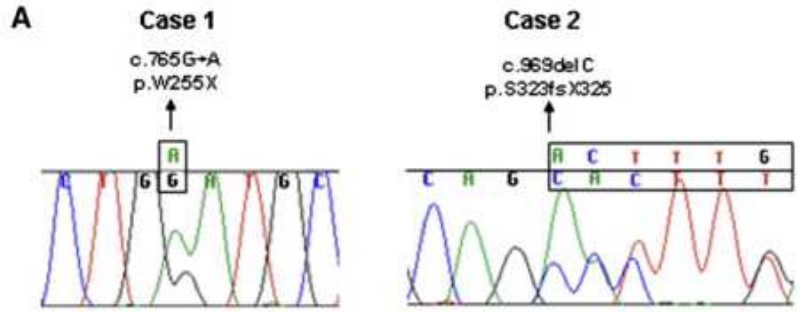
протеина FoxG1 се асоциира индиректно с хистон деацетилаза 1 и последващата пост-транслационна модификация на хистоните (Фигура 12). Сходните механизми на действие и специфична експресия са вероятна причина за близката фенотипна проява на мутациите в двата гена.

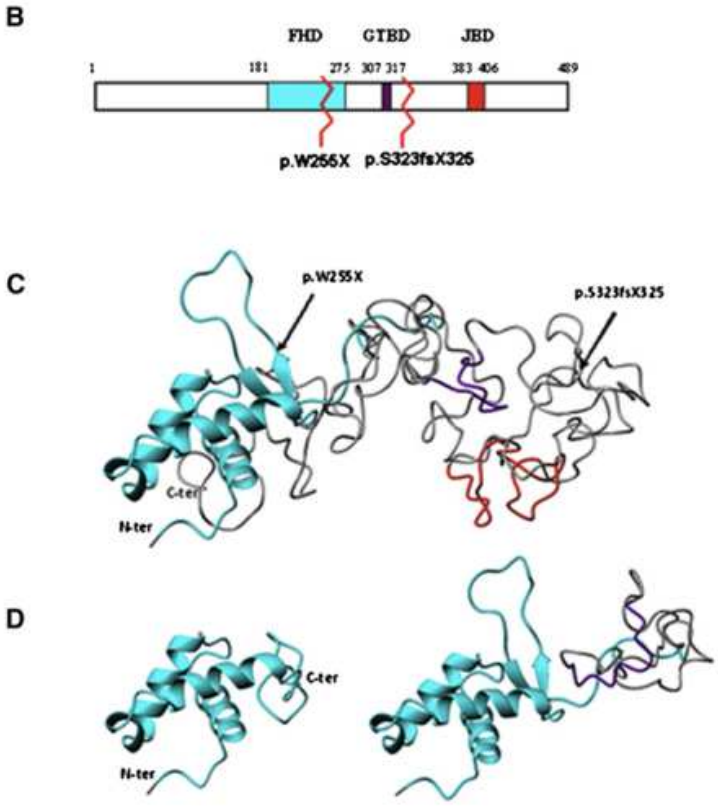


Фигура 12. Различни нива на компактност на хроматина в резултат на пост-транслационна модификация на хроматина. Компактен (a) и „отворен“ (b) хроматин при различно ниво на метилиране на ДНК и ацетилиране на хистоновите опашки.

Протеините MeCP2 и FoxG1 участват в двата основни метода за регулация на транскрипцията - метилиране на ДНК и деацетилиране на хистоновите „опашки“. Тези два процеса предизвикват компактна хроматинова конформация и последващо подтискане на транскрипцията. От друга страна деметилирането на ДНК и ацетилирането на хистоновите „опашки“ води до „отворена“ хистонова структура, която позволява висока транскрипционна активност.

До момента са правени различни опити за генотип-фенотип корелации, включително и компютърно генерирани модели на промените в протеина при различни мутации (Фигура 13).





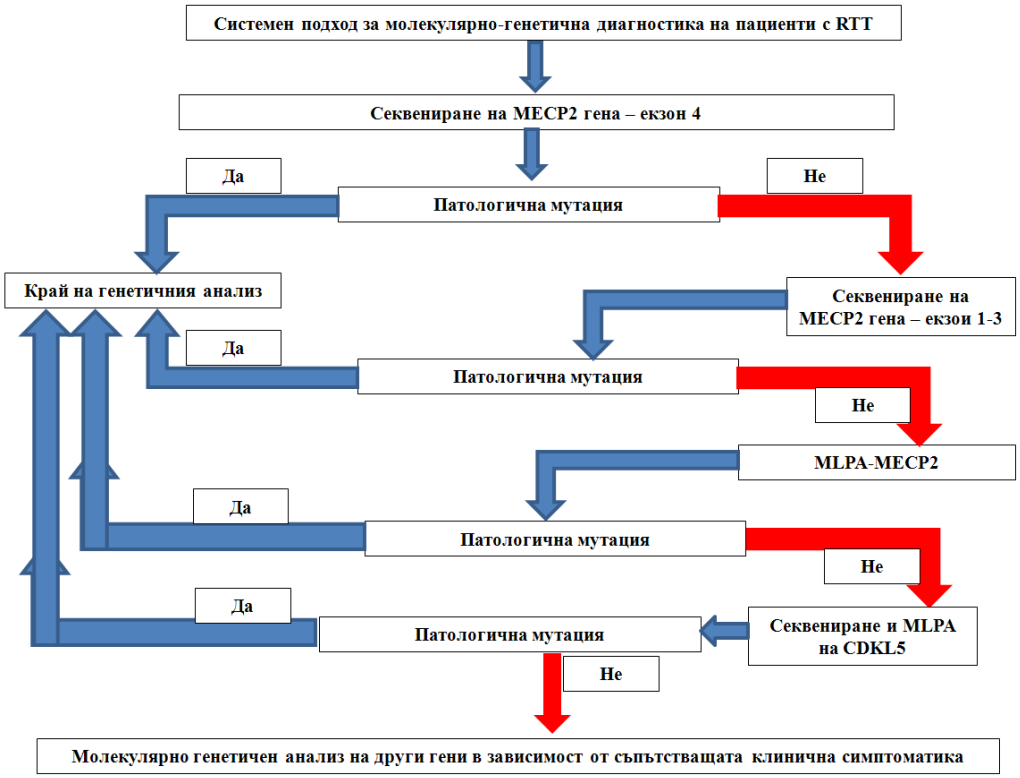
Фигура 13. Връзка между мутации и фунционални промени във FoxG1 протеина.
A) Секвенционен анализ в региона на известни мутации.
B) Схематично представяне на трите основни функционални домена във FoxG1 и разположението на някои известни мутации:
- DNA binding fork-head domain (FHD) – син цвят
- Groucho-binding domain (GTBD) – виолетов цвят
- JARID1B binding domain (JBD) – червен цвят
C, D) Триизмерен изглед на региони от четвъртичната структура на FoxG1 протеина.

В заключение може да се каже, че синдромът на Rett се характеризира с широк фенотипен и генотипен спектър. Това силно затруднява интерпретациите генотип-фенотип.

Понастоящем молекулярно-биологичната диагностика на пациент с предполагаема диагноза Rett синдром започва със секвениране на *MECP2* гена, в който се предполага, че попадат около 90-95% от мутациите, причиняващи класически Rett синдром [Williamson and Christodoulou, 2006]. Като втора стъпка се препоръчва търсенето на големи делеции/дупликации в *MECP2* гена (Фигура 13). В случай, че не се открие мутация в този ген, ако пациентката има гърчове и инфантилни спазми се преминава към търсене на мутации в гена *CDKL5* или се обсъжда изследването на други гени като *NTNG1*, *FOXG1* и др. (Фигура 13). Всички изследвания за мутации в *NTNG1*

гена за момента са безрезултатни [Archer et al., 2006b], докато за гена *FOXG1* вече има ясни доказателства, че мутации в този ген причиняват конгенитална форма на RTT [www.mecp2.chw.edu.au].

Използваният към момента в България диагностичен подход за молекулярно-генетичен анализ на пациент с RTT е показан на Фигура 14 [Тодоров Т, 2011, дисертационен труд].



Фигура 14. Системен подход за молекулярно-генетичен анализ на пациенти с RTT [Тодоров Т, 2011, дисертационен труд].

1.5. ЕПИЛЕПТИЧНИ ЕНЦЕФАЛОПАТИИ - КЛИНИЧНА КАРТИНА И МОЛЕКУЛНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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. Появата на първите симптоми е силно вариабилно дори 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.

Епилептичните енцефалопатии се характеризират със забавяне или регрес на развитието, свързани с иктална и/или интериктална епилептиформена активност. Обикновено тя е по-често по време на сън [Nabbout & Dulac, 2003]. 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]. ILAE дефинира понятието „епилептична енцефалопатия“ като: „състояние, при което се приема че епилептифомните ЕЕГ абнормалности сами по себе си допринасят за прогресиращо нарушение в мозъчната функция“. В тази категория попадат няколко синдрома:

— Ранна миоклонична енцефалопатия

— Синдром на Ohtahara

— Синдром на West

— Синдром на Dravet

— Синдром на Lennox-Gastaut

— Синдром на Landau-Kleffner

— Епилепсия с продължителни комплекси острие-вълна по време на сън

Приетата класификация се развива и модифицира, поради което някои заболявания като например „роландова епилепсия“ също могат да се впишат в дефиницията за епилептична енцефалопатия (Epileptic Encephalopathy, EE) [Coppola et al., 1995].

Както се вижда, ЕЕ описва хетерогенна група от епилептични синдроми, асоциирани с тежки когнитивни и поведенчески нарушения. Тези заболавания варират спрямо:

- начало на заболяването
- етиология на заболяването
- ниво на невропсихологичен дефицит
- ЕЕГ специфичност
- тип на пристъпите
- прогноза и изход на заболяването

Високото ниво на хетерогенност на групата довежда до трудности при разпознаването на групата заболявания в клиничната практика. Друга важна и често срещана особеност е високата резистентност към стандартните епилептични медикаменти. В резултат на това се използват „по-агресивни“ медикаменти при подтискането на интериктални епилептиформени разряди (бензодиазепани, валпроат, ламотрижин), имуномодулираща терапия (кортикостероиди, имуноглобулин и др.), кетогенна диета и др. Често се обсъжда и хирургическа намеса като опция за лечение.

Като типичен пример за ЕЕ може да се посочи синдромът на Lennox-Gastaut. Той се характеризира с умствено изоставане, генерализирани бавновълнови ЕЕГ, смесен тип пристъпи (тонични, атонични и миоклонични пристъпи). Повечето деца не се повлияват от лечението и пристъпите може да достигнат честота до стотици на ден. При такива заболявания честотата и тежеста на пристъпите пряко влияе на когнитивните способности.

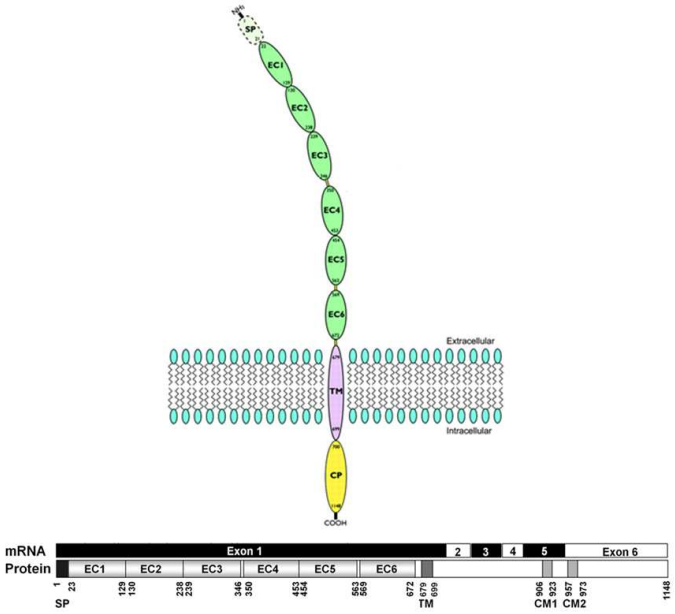
През последните години беше отбелязан значителен прогрес в идентифицирането на гените, мутации в които са отговорни за инфантилни ЕЕ. Сред синдромите с генетична предиспозиция е и един синдром с епилепсия и интелектуален дефицит при жени (Epilepsy and mental retardation limited to females EFMR (MIM #300088). Това заболяване се класифицира още като ранна инфантилна ЕЕ (EIEE), тип 9.

1.5.1. Ранна инфантилна ЕЕ (EIEE), тип 9

Заболяването се характеризира с пристъпи с ранно начало (6-36 месечна възраст) и когнитивни нарушения. Клиничните симптоми са описани преди повече от 40 години [Juberg& Hellman, 1971], като през това време е преописвано [Fabisiak & Erickson, 1990]. Заболяването клинично се припокрива със синдром на Dravet и едва през последните няколко години беше доказано, че се дължи на мутации в *PCDH19* гена [Dibbens et al., 2008; Depienne et al., 2009; Dibbens et al., 2011; Depienne et al., 2012].

Протеинът, кодиран от *PCDH19* гена, спада към семейството на Протокадхерините (Pcdhs). Те са трансмембранни протеини, участващи основно в калциево-зависимата адхезия на клетките. При бозайници са открити повече от 70 протокадхеринови гена. На база на организирането им в генома, те се разделят на две големи групи – клъстерни протокадхерини (58 гена) и неклъстерни протокадхерини (13 гена). Обичайната структура на протокадхерините представлява 6 или повече извънклетъчни домена, наречени ектодомени (EC), свързващи калциеви йони. EC домените отговарят за хомофилни или хетерофилни взаимодействия между клетките.

След ЕС домените следва трансмембранен домен, последван от специфични цитоплазмени домени (Фигура 15) [Yagi & Takeichi, 2000; Patel et al., 2003; Redies et al., 2005; Patel et al., 2006; Morishita and Yagi, 2007].



Фигура 15. Схема на структурата на PCDH19 иРНК и протеин.
SP: сигнален пептид; ЕС: извънклетъчни кадхеринови домени; ТМ: трансмембранен домен; СМ1 и СМ2: цитоплазмени домени 1 и 2.

Pcdhs, подобно на много други кадхерини се експресират предимно в мозъка, където играят важна роля при невронната миграция и синаптичната пластичност [Frank and Kemler, 2002; Junghans et al., 2005; Redies et al., 2005; Morishita and Yagi, 2007]. Комбинираната експресия на множество кадхерини отговаря за молекулярната специфичност и комплексност на невронните мрежи в церебралния кортекс [Krishna et al., 2011].

Генът *PCDH19* (MIM *300460) е разположен на дългото рамо на Х-хромозомата (Xq22.1), кодира протеин съставен от 1148 аминокиселини и спада към подклас δ2 на неклъстерните протокадхерини подобно на кодираните от гените *PCDH8*, *PCDH10*, *PCDH17* и *PCDH18* [Wolverton and Lalande, 2001; Redies et al., 2005].

Генът е съставен от 6 екзона, първият от които е необичайно голям и кодира всички извънклетъчни домени и трансмембранния домен (Фигура 14).

Експресията на *PCDH19* се регулира прецизно по време на развитието на централната нервна система. Генът се отличава с уникален експресионен профил сред протокадхерините и се експресира интензивно в развиващия се мозък, включително зони от церебралния кортекс, хипокампуса и субикулума [Vanhalst et al., 2005; Gaitan and

Bouchard, 2006; Kim et al., 2007; Krishna et al., 2009; Kim et al., 2010; Hertel and Redies, 2011; Krishna et al., 2011].

В генетичните бази данни транскриптът има две изоформи (NM_020766.1 и NM_001105243.1), получени в резултат на алтернативен сплайсинг на екзон 2 и наличието на две възможни акцепторни места в интрон 4. Тези изоформи не са достатъчно проучени *in vivo* и тяхното разпределение и роля не са напълно изяснени. Точните функция и механизъм на действие на протокадхерин 19 към момента не са известни. Известно е, че други δ2 протокадхерини доказани *in vitro* и *in vivo* са посредници в калциево-зависимата клетъчна адхезия [Redies et al., 2005] и могат да регулират изграждането на невронни връзки по време на развитието на мозъка и/или ремоделиране на синаптичните контакти по време на ранния постнатален период [Kim et al., 2007]. Въпреки това в контраст с другите кадхерини, които се асоциират със силни хомофилни взаимодействия между клетките, извънклетъчните домени на *PCDH19* проявяват специфични, но слаби хомофилни адхезионни взаимодействия. Това предполага, че *PCDH19* участва по-скоро с хетерофилните взаимодействия [Biswas et al., 2010; Tai et al., 2010].

Унаследяването на EIEE, тип 9 е необичайно. Обикновено мутации в гени, разположени на Х-хромозомата се унаследяват Х-свързано, при което мъжете са винаги засегнати, а жените са здрави или изявени носителки, но обикновено фенотипната проява (ако има такава) е по-лека.

Мутациите в *PCDH19* гена се унаследяват различно от гореописания модел. Засегнати са жените, хетерозиготни носителки на мутация в гена или мъже мозайки по мутацията [Dibbens et al., 2008; Depienne et al., 2009; Dibbens et al., 2011; Depienne et al., 2011]. Мъжете, хемизиготни носители на мутация са без клинична проява. Този специфичен начин на фенотипната изява на Х-свързан ген се обяснява чрез механизма на клетъчна интерференция (виж по-надолу текста).

Мутации в *PCDH19*: загуба на функционалност на клетъчно ниво

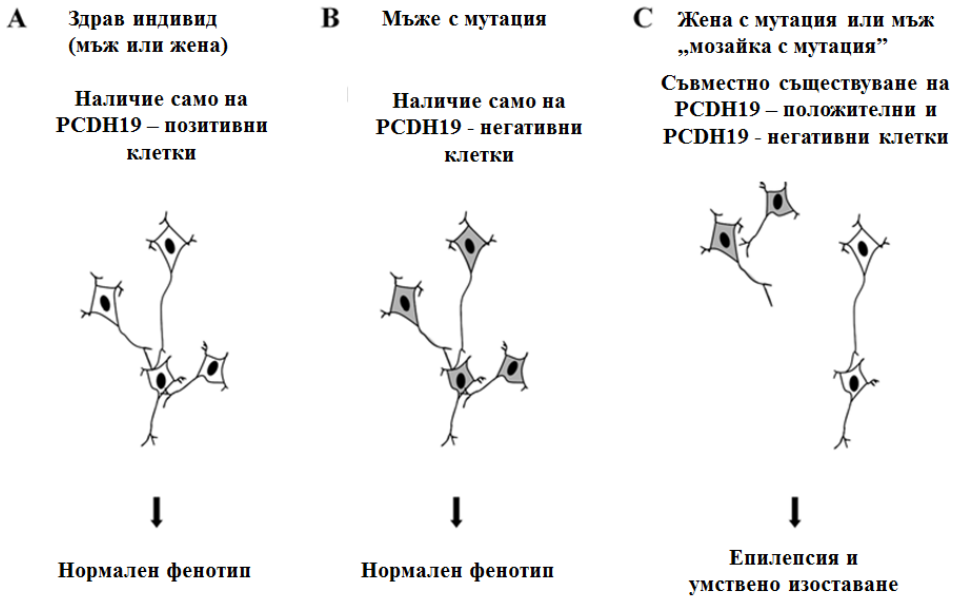
Спектърът от мутации в *PCDH19* гена води до т.нар загуба на функция. При nonsense мутации се образува стоп-кодон, причиняващ преждевременно терминиране на белтъчния биосинтез. Информационните РНКи, получени от ген с такъв тип мутация, се разграждат по пътя на нонсенс-опосредствано разграждане на иРНК (nonsense-mediated mRNA decay - NMD). Това е доказано във фибробласти [Dibbens et al., 2008]. По този

начин нивото на експресия при nonsense мутации е равно на тази при делеция на целия ген.

При наличие на missense мутации се синтезира протеин с променени адхезивни функции. Обикновено мутациите са в екстрацелуларните домени. Например за мутациите p.Asn340Ser и p.Glu414Gln е установено, че повлияват пряко аминокиселини от центъра на свързване с калциеви йони [Patel et al., 2006; Marini et al., 2010]. Въпреки това хипотезата за действие на мутациите чрез загуба на функция все още не е напълно доказана.

Мутации в *PCDH19*: поява на функционалност на тъканно ниво – клетъчна интерференция

Особеният модел на фенотипна изява на Х-свързания ген *PCDH19* се обяснява чрез т.нар модел на клетъчната интерференция (Фигура 16).



Фигура 16. Схематично илюстриране на механизма на клетъчна интерференция при мутация в *PCDH19* гена.

При нормални индивиди се наблюдава хомогенна популация от *PCDH19*-позитивни клетки, при което невроните могат да формират нормална невронна мрежа (Фигура 15-А). При мъже с мутация хемизиготността води до получаване на хомогенна популация от *PCDH19*-негативни клетки, при което невроните успяват да формират нормална невронна мрежа (Фигура 15-В). При жени, хетерозиготни носители на мутация се получава смесена популация от *PCDH19*-негативни и позитивни клетки (Фигура 15-

С). Това се дължи на случайна Х-инактивация. Наличието на две популации води до различна клетъчна миграция в двете популации и това не позволява формирането на нормална невронна мрежа. Същото положение се наблюдава при мъже с мозаечен тип мутация. Точните механизми на повлияване на формирането на невронната мрежа са все още неясни [Depienne et al., 2009].

Интересно е, че мъжете хемизиготни носители на мутация в *PCDH19* гена показват нормална когнитивна функция и липса на пристъпи, въпреки че много лек психиатричен фенотип може да се проявява при асимптоматични носители [Dibbens et al., 2008].

Липсата на сериозни симптоми при мъже показва, че постоянната загуба на функция на протокадхерин 19 (пълна липса на протеина във всички клетки на тялото) не е патогенна. Това доказва, че въпреки важната функция на *PCDH19* гена при ранната мозъчна морфогенеза при други видове [Emond et al., 2009], продуктът протокадхерин 19 не е жизнено важен при хора. Най-вероятно това се дължи на компенсирането на неговата фунция от други кадхерини или сигнални пътища.

За разлика от мъжете, жените хетерозиготни носителки проявяват пълния фенотип на заболяването. Случайното Х-инактивиране на теория води до тъканен мозайцизъм, т.е. съвместно съществуване на клетки, експресиращи мутантен *PCDH19* (или не експресиращи такъв) и нормални клетки [Depienne et al., 2009]. Този мозайцизъм може да повлиява междуклетъчните взаимодействия или да води до нови такива [Ryan et al., 1997; Dibbens et al., 2008; Depienne et al., 2009]. По този начин загубата на функция на клетъчно ниво води до поява на нова функция на тъканно ниво. Механизъм от подобен тип се нарича „клетъчна интерференция“ [Wieland et al., 2004] по аналог с термина „метаболитна интерференция“.

Идентификацията на мъже с фенотипна проява и доказана „мозаечност“ във фибробласти силно подкрепя механизма на клетъчна интерференция [Depienne et al., 2009]. За пълно доказване на теорията е нужно да се открие жена хомозиготен носител (или двоен хетерозиготен носител) на мутация в *PCDH19* гена. За момента не е съобщаван такъв случай в научната литература. Вероятността за описанието на такъв случай се намалява допълнително, тъй като теоретично се очаква липса на фенотипна изява на заболяването в този случай.

Отсъствието на подобен случай остава поле за изява на използването на миши модели с цел доказване на механизма.

Интересно е, че има още едно заболяване с подобен тип на унаследяване - краниофронтоназален синдром (CFNS; MIM# 304110). То се дължи на мутации в гена *EFNB1*, кодиращ лиганд на епинефриновия рецептор. Генът е разположен на дългото рамо на Х-хромозомата (Xq12). Сигналната каскада играе роля в клетъчната миграция и образуването на модели по време на морфогенезата [Klein, 2004]. Това напомня за функцията на *PCDH19*. Клетъчната интерференция е доказана като механизъм на патогенеза при мишки, носители на мутации в *EFNB1* гена [Compagni et al., 2003]. Това позволява да се предположи подобен механизъм на действие при мутации и в *PCDH19* гена.

1.5.2. Ранна инфантилна ЕЕ (EIEE), тип 2

Мутации в *CDKL5* гена са асоциирани освен с атипичен синдром на Rett и с EIEE тип 2. Този тип EIEE се характеризира със забавяне или регрес на развитието, свързани с иктална и/или интериктална епилептиформена активност. Началото на първите симптоми е значително по-рано (първите 5 месеца) спрямо EIEE тип 9, което води до потенциално по-високо отражение върху детското развитие спрямо епилепсиите с по-късно начало. Мутации в *CDKL5* гена са съобщавани при 17% от момичетата с EIEE и начало на пристъпите преди 5 месеца [Archer et al., 2006] и 38% от момчетата с тежък интелектален дефицит и EIEE с много ранно начало [Elia et al., 2008].

CDKL5-свързаните EIEE се отличават по няколко белега от RTT като например липса на: ясен период на регрес, втренчен поглед и невровегетативни нарушения. Фенотипната изява при момчетата, подобно на RTT е по-тежка, като при мутации в *CDKL5* гена двигателни умения не се развиват [Melani et al., 2011]. Пациентите са нормални през първите дни от живота, но много рано манифестират нарушения в невро-моторното развитие, включително вяло сучене, липса на очен контакт, дори преди поява на първите гърчове. Постепенно се забелязва липсата на целево използване на ръцете, тежко изоставане в развитието и липса на говорни умения [Archer et al., 2006; Elia et al., 2008; Neul et al. 2010; Melani et al., 2011]. Епилепсията се появява под формата на епилептична енцефалопатия с инфантилни спазми и начало между първите дни и четвъртия месец [Archer et al., 2006]. Пациентите показват специфични пристъпи с удължени генерализирани тонично-клонични гърчове с продължителност 2-4 минути, характерни са специфични ЕЕГ абнормалности [Melani et al., 2011]. Все още не е известно дали тези специфични ЕЕГ находки с необичайни инфантилни спазми са

уникални за мутации в *CDKL5* гена или се дължат на епилепсията в много млада възраст (първите дни от живота).

Въпреки наличието на специфичен фенотип, различен от този на RTT, разграничаването на пациентите с атипичен RTT и епилептични енцефалопатии с ранно начало среща редица трудности.

1.6. ОБОБЩЕНИЕ НА ЛИТЕРАТУРНИТЕ ДАННИ

Прецизната клинична диагноза в изброените по-горе синдроми с епилепсия се нуждае от потвърждение на молекулярно-генетично ниво. Единствено на базата на молекулния дефект е възможно определяне на точния тип заболяване сред голямата група синдроми, характеризиращи се с епилептични пристъпи. Изясняването на молекулните основи на заболяването при всеки пациент е от значение както за прогнозиране хода на заболяването и на тази база прилагане на правилна терапия, така и за адекватното генетично консултиране на засегнатото семейство.

Молекулярно-генетичната диагностика на гореописаните заболявания има проблем с изясняването на генните дефекти довели до изявата на конкретни заболявания поради голямата клинична и генетична хетерогенност и откриването на нови и нови гени и хромозомни региони, мутации в които се асоциират с тези заболявания.

Усилията в последно време бяха насочени към разработването на нови високоефективни, автоматизирани, модерни технологии, с помощта на които молекулярно-генетичната диагностика коренно се промени като възможност за прецизиране на генетичните дефекти, като бързина и качество на анализа и до голяма степен като почти напълно автоматизиран и компютъризиран процес.

Нашите усилия в областта на молекулярно-генетичната диагностика също са насочени от една страна към използване на съвременни методики за анализ, а от друга, съвместно с клиницистите, към изясняване молекулните характеристики на епилептичните заболявания в България. Очаква се съществен процент от пациентите с епилепсия да бъдат изяснени на молекулярно-генетично ниво и на тази база на семействата да бъде предложена адекватна генетична консултация и профилактика.

Пациентите, които останат с все още неизяснен дефект, са подготвени и представляват база за нови проучвания чрез микрочипов анализ и секвениране от нова генерация на целия геном или на цели хромозоми с цел търсене на нови гени и генни локуси, мутации в които са отговорни за изява на епилептични епизоди.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

2.1. ЦЕЛ

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.

2.2. ЗАДАЧИ

2.2.1. Идиопатична генерализирана епилепсия (ИГЕ)

2.2.1.1. Въвеждане и оптимизиране на методи за анализ на делеции и дупликации в региона на 15-та хромозома (15q13.3).

2.2.1.2. Проспективен подбор на пациенти с ИГЕ съгласно съвременната номенклатура.

2.2.1.3. Приложение на разработените методи за диагностика при подбраната група български пациенти с ИГЕ.

2.2.1.4. Сравнение на получените резултати с публикуваните данни.

2.2.2. Синдром на Rett (RTT)

2.2.2.1. Подбор и класификация на пациенти с класически и атипичен синдром на Rett в зависимост от наличие или отсъствие на епилепсия.

2.2.2.2. Скрининг за мутации в *MECP2* гена при подбраната група пациени.

2.2.2.3. Генотип-фенотипни корелации при изследваните пациенти: мутации в *MECP2* гена и епилепсия.

2.2.2.4. Провеждане на допълнителни изследвания в други гени при генетично неизяснените пациенти.

2.2.2.5. Модификация на системния подход за молекулярно-генетична диагностика при пациенти с RTT.

2.2.2.6. Сравнение на получените резултати с публикуваните данни.

2.2.3. Епилептични енцефалопатии (ЕЕ)

2.2.3.1. Подбор и класификация на пациенти с клинична диагноза ЕЕ съгласно съвременната номенклатура.

2.2.3.2. Въвеждане и оптимизиране на методи за анализ на гените *PCDH19* и *CDKL5*, мутации в които са асоциирани с ЕЕ.

2.2.3.3. Приложение на разработените методи за диагностика при група пациенти с ЕЕ.

2.2.2.3. Изработване на системен подход за молекулярно-генетична диагностика при пациенти с ЕЕ.

2.2.2.4. Сравнение на получените резултати с публикуваните данни.

2.2.4. Обобщение на получените резултати

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. МАТЕРИАЛИ

3.1.1. КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ

Молекулярно-генетичните изследвания са проведени общо при 152 неродствени пациента**,** с епилепсия и/или интелектуален дефицит, при които се очаква генетична причина за изява на заболяването. На базата на клиничната диагноза пациентите са групирани както следва:

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

Всички изследвани пациенти са спорадични и неродствени. От пациентите с RTT 10 са с румънски произход, всички останали пациенти са с български произход.

Пациентите са клинично диагностицирани и насочени за ДНК анализ от:

1. Специализирана Болница за Активно Лечение по Детски Болести ЕАД, гр.София
2. Университетска Специализирана Болница за Активно Лечение по Неврология и Психиатрия „Св. Наум”, гр. София
3. Многопрофилна Болница за Активно Лечение „Св. Марина” гр. Варна
4. Университетска Многопрофилна Болница за Активно Лечение Александровска, гр. София
5. Регионални педиатрични, неврологични центрове и генетично-консултативни звена.
6. Carol Davila University of Medicine, Pediatric Neurology Clinic, Al Obregia Hospital, Bucharest, Romania.

Настоящото изследване е финансирано частично по договори № 29/2010, 49/2011 и 21/2012 на МУ- София.

Клиничната диагноза е поставена на базата на стандартни клинични и лабораторни изследвания: оценка на характерните дисморфични белези, поведенчески фенотип и степен на умствено изоставане, генеалогичен анализ, ЕЕГ, хромозомен анализ (кариограма) и др.

3.1.2. БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ

При провеждане на изследвания на генетични заболявания на ниво ДНК и в частност при изследванията, извършени в настоящия дисертационен труд се използва високомолекулна ДНК, изолирана от левкоцити от венозна или капилярна кръв, както и ДНК изолирана от букална лигавица.

Използват се 3-6 ml венозна кръв, взета в пластмасова епруветка (тип вакутейнер) и антикоагулант етилен диамин тетраацетат – натриева сол (ЕДТА). Капилярна кръв се взима в пластмасови епруветки от 1 мл със същия антикоагулант ЕДТА. Клетки от букална лигавица се събират във вода в епруветки тип Eppendorf 1.5 мл чрез остъргване на лигавица от вътрешната страна на бузата с пластмасова шпатола и промиване на шпатолата във водата в епруветката.

Кръвните проби се взима след нахранване и се съхранява на +4^{o}C до времето за обработка (за изолиране на високомолекулна ДНК се съхранява не повече от 48 часа).

3.2. МЕТОДИ

3.2.1. ПРЕДАНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА МАТЕРИАЛА

3.2.1.1. Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв по солевия метод

Принцип:

- разрушаване на червените кръвни клетки;
- утаяване на ядрените клетки;
- разрушаване на ядрените клетки;
- преципитация на белтъците;
- преципитация на ДНК.

Процедура:

Лизиране на еритроцитите и утаяване на ядрените клетки:

В 50 ml стерилна конична пластмасова епруветка се излива 10 ml венозна кръв и се добавят 30 ml студен лизиращ буфер. Разбърква се добре и се инкубира 30 min в лед, като от време на врме епруветките се разклащат. Центрофугира се 15 min при 3000rpm и температура +4^{o}C. Надстоящата течност се отлива внимателно и се изхвърля. Епруветките се оставят да се отцедят върху филтърна хартия.

Утайката се ресуспендира в 10 ml студен лизиращ буфер и се центрофугира още веднъж при същите условия. Надстоящата течност се отлива внимателно.

Лизиране на ядрените клетки.:

Получената от предходния етап утайка, съдържаща ядрените клетки, се ресуспендира в 5ml SE (нуклеолизиращ) буфер. Добавят се 25 μl протеиназа К (10mg/ml) и 250 μl 10%-ен натриев додецил сулфат (SDS). Разбърква се леко и се инкубира на 37^{o}C за цяла нощ или на 55^{o}C за 5 часа.

Утаяване на белтъците:

След протеолизата се добавят 1.4 ml преситен (6M) натриев хлорид (NaCl) и се разбърква на вортекс. Центрофугира се 15 min на 3000rpm при стайна температура, за да не преципитира SDS. Белтъците се утаяват на дъното.

Преципитация на ДНК:

Надсточщата течност, съдържаща ДНК, се отлива внимателно в нова 50 ml стерилна конична пластмасова епруветка и се добавят 2 обема ледено студен абсолютен етанол. При тези условия ДНК видимо преципитира и изплува на повърхността, обира се със стерилна (обгорена) пастьорка и се промива в 70%-тен етанол. Изсушава се на въздух и се разтваря в стерилен ТЕ буфер.

Буфери използвани за изолирането на ДНК:

Лизис буфер (pH=7.4): NH_4Cl - 155mM; $KHCO_3$ – 10mM; Na_2EDTA – 0.1mM

SE буфер (pH=8.0): NaCl – 75mM; Na_2EDTA – 25 mM

ТЕ буфер (pH=7.4): TRIS/HCl (pH=7.4) – 10mM; EDTA (pH=8.0) – 1mM

Апаратура:

Центрофуга Hermle, Germany, центрофуга MiniSpin Eppendorf ; вортекс Heidolph Reax Top; термостат Memmert, Germany

3.2.1.2. Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна, капилярна кръв или букална лигавица по фенол-хлороформен метод

Принцип:

- разрушаване на клетките и клетъчните ядра;
- екстрахиране на белтъците;
- преципитация на ДНК.

Процедура:

Разрушаване на клетките и клетъчните ядра:

Изходните клетки се поставят в епруветка тип Eppendorf от 1.5 ml и към тях се добавят 500µl SE-буфер, 25 µl 10%-ен натриев додецил сулфат (SDS) и 25 µl протеиназа К (10mg/ml). Разбърква се леко и се инкубира се на 55^{o}C за 3-4 часа.

Екстрахиране на белтъците:

След протеолизата в епруветката се добавят 300µl фенол (pH=8.0) и 300µl хлороформ/изоамилов алкохол в съотношение 24:1. Разбърква се интензивно на вортекс и се центрофугира 15 min на 12000rpm.

Преципитация на ДНК:

Горната фаза се прехвърля в нова Eppendorf-епруветка чрез внимателно отпипетиране без да се увлече интерфазата. Добавя се 1/10 от обема 3М натриев ацетат (CH_3COONa) и вниматекно се размесва. Добавят се 2 обема ледено студен абсолютен етанол и се инкубира 30 min на -70^{o}C. Центрофугира 15 min на 13000rpm. Надутаечната течност се отлива внимателно. Утайката се промива с 0.5 ml 70%-тен етанол, след което се центрофугира 10 min на 13000rpm. Надутаечната течност се отлива и утайката се суши на въздух. Утайката се разтваря в ТЕ буфер.

Буфери използвани за изолирането на ДНК:

SE буфер (pH=8.0): NaCl – 75mM; Na_2EDTA – 25 mM

ТЕ буфер (pH=7.4): TRIS/HCl (pH=7.4) – 10mM; EDTA (pH=8.0) – 1mM

Апаратура:

Центрофуга MiniSpin Eppendorf ; вортекс Heidolph Reax Top; термостат Memmert, Germany

3.2.1.3. Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв чрез кит Qiagen, Hilden, Germany

Принцип:

Изолиране на ДНК базирано на взаимодействието между силика-гел мембрана и ДНК.

Процедура: Следват се инструкциите на производителя (QIAmp DNA Blood Mini Kit)

Апаратура:

Центрофуга MiniSpin Eppendorf ; вортекс Heidolph Reax Top; Biore Thermo E термоблок

3.3. АНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА МАТЕРИАЛА

3.3.1. Полимеразна верижа реакция (ПВР; Polymerase chain Reaction; PCR)

● Протокол за намножаване на екзони от *MECP2* гена

Използваните праймери за амплификация на *MECP2* гена са публикувани [Amir et al.,1999]

Оптималната концентрации на компонентите в реакционната смес за ПВР са посочени по-долу (Таблица 2).

Таблица 2. Оптимална концентрация на компонентите участващи в полимеразната верижна реакция за намножаване на екзони от *MECP2* гена.

Компонент на реакционната смес	**Обем (µl)**
Високомолекулна ДНК	1-2
Праймер F (10pmol/µl)	1
Праймер R (10pmol/µl)	1
Разтвор на дезоксинуклеотидтрифосфати, дНТФ (5mM) (GENET BIO, Chungnam, Korea)	2
10x Prime Taq буфер (GENET BIO, Chungnam, Korea)	2.5
Термостабилна полимераза Prime Taq, (GENET BIO, Chungnam, Korea)	0.1
Дестилирана вода	До краен обем 25

Оптималната програма за провеждане на ПВР за получаване на специфичен продукт е представена на Таблица 3.

Таблица 3. Оптималната програма за провеждане на ПВР за получаване на специфични продукти на екзони от *MECP2* гена.

Етап	**Температура**	**Време**	**Брой цикли**
Начална денатурация	94^{o}C	5 min	1
Денатурация	94^{o}C	30 sec	35
Хибридизация на праймерите	59^{o}C	40 sec	
Синтез на нова верига	72^{o}C	1 min	
Краен синтез	72^{o}C	5 min	1

● Протокол за намножаване на екзони от *CDKL5* гена

В настоящото изследване за ензимното намножаване с ПВР на кодиращите райони на *CDKL5* гена и заграждащите ги интронни последователности бяха използвани праймери, подбрани след литературна справка [Тодоров Т, 2011, дисертационен труд].

За всеки фрагмент са оптимизирани условията за провеждане на ПВР, като са променяни следните параметри на полимеразната верижна реакция: концентрация на бетаин, температура и време за хибридизация на праймерите, време за синтез на желания продукт. Намерените оптимални концентрации на компонентите в реакционната смес за ПВР са посочени по-долу (Таблица 4).

Таблица 4. Оптимална концентрация на компонентите участващи в полимеразната верижна реакция за намножаване на изследваните екзони от *CDKL5* гена.

Компонент на реакционната смес	**Обем (µl)**
ДНК	1
Праймер F (10pmol/µl)	1
Праймер R (10pmol/µl)	1
Разтвор на дезоксинуклеотидтрифосфати, дНТФ (5mM) (GENET BIO, Chungnam, Korea)	2
Бетаин (5M)	4
10x Prime Taq буфер (GENET BIO, Chungnam, Korea)	2.5
Термостабилна полимераза Prime Taq, (GENET BIO, Chungnam, Korea)	0.1
Дестилирана вода	До краен обем 25

Оптималната програма за провеждане на ПВР за получаване на специфичен продукт е представена в Таблица 5.

Таблица 5. Оптималната програма за провеждане на ПВР на екзони от *CDKL5* гена.

Етап	**Температура**	**Време**	**Брой цикли**
Начална денатурация	94^{o}C	5 min	1
Денатурация	94^{o}C	45 sec	30
Хибридизация на праймерите	60 ^{o}C	45 sec	
Синтез на нова верига	72^{o}C	1 min	
Краен синтез	72^{o}C	5 min	1

● **Протокол за намножаване на екзони от *FOXG1* гена**

Използваните праймери за амплификация на *FOXG1* гена са публикувани от други автори [Kato et al.,2004].

Оптималната концентрации на компонентите в реакционната смес за ПВР са посочени по-долу (Таблица 6).

Таблица 6. Оптимална концентрация на компонентите участващи в полимеразната верижна реакция за намножаване на екзони от *FOXG1* гена.

Компонент на реакционната смес	**Обем (μl)**
Високомолекулна ДНК	1-2
Праймер F (10pmol/μl)	1
Праймер R (10pmol/μl)	1
Разтвор на дезоксинуклеотидтрифосфати, дНТФ (5mM) (GENET BIO, Chungnam, Korea)	2
10x Prime Taq буфер (GENET BIO, Chungnam, Korea)	2.5
Термостабилна полимераза Prime Taq, (GENET BIO, Chungnam, Korea)	0.1
Дестилирана вода	До краен обем 20

Оптималната програма за провеждане на ПВР за получаване на специфичен продукт е представена на Таблица 7.

Таблица 7. Оптималната програма за провеждане на ПВР за получаване на специфични продукти на екзони от *FOXG1* гена.

Етап	**Температура**	**Време**	**Брой цикли**
Начална денатурация	94^{o}C	5 min	1
Денатурация	94^{o}C	45 sec	35
Хибридизация на праймерите	60^{o}C	45 sec	
Синтез на нова верига	72^{o}C	1 min	
Краен синтез	72^{o}C	5 min	1

● **Протокол за намножаване на *PCDH19* гена**

Използваните праймери за амплификация на *PCDH19* гена са предоставени по линия на международно сътрудничество – Dr Christel Depienne, Université Pierre et Marie Curie, Centre de Recherche de l'institut du cerveau et de la moelle épinière, Paris, France.

Оптималната концентрации на компонентите в реакционната смес са посочени по-долу (Таблица 8).

Таблица 8. Оптимална концентрация на компонентите участващи в полимеразната верижна реакция за намножаване на екзони от *PCDH19* гена.

Компонент на реакционната смес	**Обем (µl)**
Високомолекулна ДНК	1-2
Праймер F (10pmol/µl)	0.5
Праймер R (10pmol/µl)	0.5
Разтвор на дезоксинуклеотидтрифосфати, дНТФ (5mM) (GENET BIO, Chungnam, Korea)	2
10x Prime Taq буфер (GENET BIO, Chungnam, Korea)	2.5
Термостабилна полимераза Prime Taq, (GENET BIO, Chungnam, Korea)	0.1
Дестилирана вода	До краен обем 25

Оптималната програма за провеждане на ПВР за получаване на специфичен продукт е представена на Таблица 9.

Таблица 9. Оптималната програма за провеждане на ПВР за получаване на специфични продукти от екзони от *PCDH19* гена.

Етап	**Температура**	**Време**	**Брой цикли**
Начална денатурация	96^{o}C	6 min	1
Денатурация	96^{o}C	40 sec	30
Хибридизация на праймерите	60^{o}C	1 min	
Синтез на нова верига	72^{o}C	1 min	
Краен синтез	72^{o}C	7 min	1

Апаратура:

За провеждане на ПВР са използвани апарати: GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, USA; Bioer XP cycler, Hangzhou, P.R. China.

3.3.2. ЕЛЕКТРОФОРЕЗА В АГАРОЗЕН ГЕЛ

Количеството и качеството на получените амплификационни продукти чрез ПВР се контролира посредством агарозна гел-електрофореза. Използва се 2-3% агарозен гел, хоризонтална електрофорезна система, като пробите се анализират в присъствието на молекулен маркер, спрямо който се отчита дължината на намножения фрагмент.

ДНК фрагментите се разделят в зависимост от молекулната им маса, а разтвореният в агарозата етидиев бромид позволява визуализирането на ДНК при облъчване с ултравиолетова светлина.

Използвани буфери:

1x TBE буфер: TRIS - 90mmol/l; Борна киселина – 90mmol/l; Na_2EDTA – 1mmol/l
Буфер за нанасяне на пробите: 0.25% бромфенол блу; 25% фикол

Апаратура:

За изливане на агарозния гел: Микровълнова фурна – SM 20MW, SOGO, China; нивелирна масичка; ваничка за изливане на агарозен гел (2500x1800mm); стартови гребени с размер 2x22 бр., размери на ямките 5x4x1mm;

За провеждане на електрофорезата: Апарат за хоризонтална подводна гел-електрофореза A. Hartenstein, Wuerzburg, Germany; токоизправител Consort EV222, Turnhout, Belgium;

За визуализиране на пробите: Трансилюминатор LKB Bromma 2011 Macrovue, LKB Vertriebs GmbH, Vienna, Austria.

За архивиране на получените резултати: Фотодокументационна система: Alpha DigiDoc Pro, Alpha Innotech, Cell Biosciences, Inc., Santa Clara, CA, USA

3.3.3. ЕЛЕКТРОФОРЕЗА ЗА ФРАГМЕНТЕН АНАЛИЗ НА АВТОМАТИЧЕН СЕКВЕНАТОР

За правилното оразмеряване на амплификационните продукти, съдържащи CGG повтора на FMR1 гена се налага използването на електрофореза на автоматичен секвенатор. Разделянето се извършва с помощта на фабричен акриламиден полимер

POP4 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), като пробите се анализират в присъствието на молекулен маркер (напр. ROX500 Size Standard, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), спрямо който се отчита дължината на намножения фрагмент.

Процедура:

Полимерът POP4 се поставя в стъклена спринцовка, която го подава равномерно за пълнене на капилярата. Използваният електрофоретичен буфер е 10xSequencing Buffer (предоставен от производителя) (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), който се разрежда до концентрация 1x за използване в хода на електрофорезата.

Електрофоретично разделяне на пробите

Условията на електрофореза са:

Module:	GS STR POP4 (1ml) D
Inj secs:	5.0
Inj kV:	15.0
Run kV:	15.0
Run T^{o}C:	60.0
Run time:	26-29 min

Приготвяне на пробите за електрофореза

Към 2.5 µl амплификационен продукт се прибавят 12 µl Hi-Di Formamide (Applied Biosystem, Foster City, USA) и 0.7 µl ROX500 Size Standard (Applied Biosystem, Foster City, USA). Така приготвените проби се денатурират на 95^{o}C в продължение на 5 мин и се охлаждат бързо на лед. Прехвърлят се в специални епруветки (Genetic Analyzer 0.5 ml Sample Tubes, Applied Biosystem, Foster City, USA) и се поставят за анализ в апарата.

Визуализиране на фрагментите

За визуализиране на фрагментите чрез този вид капилярна електрофореза един от използваните праймери за амплификация е белязан с флуоресцентно багрило 6-FAM (виж по-нагоре описанието на праймерите), което се детектира от лазера. Получените резултати се обработват с програмата GenScan v.3.4.1 (Applied Biosystem, Foster City, USA).

Апаратура

Използва се автоматичен капилярен секвенатор ABI 310 genetic analyzer (Applied Biosystem, Foster City, USA) и компютър McIntosh G3 (Apple Inc, Cupertino, CA, USA).

3.3.4. ДИРЕКТНО СЕКВЕНИРАНЕ ПО SANGER С ФЛУОРЕСЦЕНТНО БЕЛЯЗАНИ ДИДЕЗОКСИ НУКЛЕОТИДИ.

Принцип на метода на Sanger:

Секвенирането е ензимен метод за определяне на нуклеотидната последователност на участък от ДНК. Използва се реакция за синтез in vitro на ДНК вериги върху едноверижна матрица с участието на ДНК полимераза. Полимеразната реакция се инициира на точно определено място, където синтетични олигонуклеотидни зародиши (праймери) хибридизират с матрицата. Чрез случайно включване на нуклеотидни аналози, които не позволяват удължаване на растящата верига, реакцията се прекратява в различни места. Като такива аналози се използват 2', 3'-дидезоксинуклеозид 5'-трифосфати (ддНТФ). Те спират изграждането на ДНК веригата, тъй като нямат 3'-хидроксилна група. Ензимът Thermo Sequenase II ДНК-полимеразата е термостабилна ДНК-полимераза, толерантна към високи солеви концентрации и с висока процесивност. Това позволява използването й за ДНК синтезата in vitro, която се извършва чрез PCR реакция. В резултат на това се получават различни по дължина вериги с еднакво начало и различен край, определен от включването на един от четирите вида ддНТФ. Тези фрагменти се разделят електрофоретично. Визуализацията им може да се осъществи по различен начин в зависимост от това с какво са белязани терминиращите дидеоксинуклеотиди.

Принцип на работа на автоматичен секвенатор ABI310 Sequence Genetic Analyzer:

В настоящото изследване за разделянето на фрагментите е използван автоматичен секвенатор ABI310 Sequence Genetic Analyzer на фирмата Applied Biosystems.

Разделянето на фрагментите в автоматичния секвенатор ABI310 се извършва на принципа на капилярната гел-електрофореза. Използваните при секвенционната реакция терминиращи дидеоксинуклеотиди са флуоресцентно белязани, поради което се осъществява лазерна детекция. Всеки от четирите дидезоксинуклеотида (ddG, ddA,

ddT и ddC) е белязан с два флуорофора – флуоресцин и един от четирите типа родамин. Флуоресцинът има висок екстинкционен коефициент при λ = 488 nm. (това е и дължината на вълната, емитирана от аргоновия лазер, който се използва в автоматичните секвенатори). Играейки ролята на донор, флуоресцинът поглъща енергията на лазерния лъч и я прехвърля към акцепторния родамин върху същата молекула. Всеки от четирите акцептора емитира светлина с определена дължина на вълната, която се детектира от апарата и така се идентифицира съответният нуклеотид.

Процедура:

- Намножаване на желания ДНК фрагмента чрез ПВР;
- Пречистване на намножения продукт;
- Провеждане на секвенционна реакция;
- Преутаяване на секвенционния продукт;
- Разтваряне на секвенционния продукт и електрофоретично разделяне;
- Визуализиране на резултатите.

Намножаване на желания ДНК фрагмента чрез ПВР

Извършва се при споменатите по-горе условия за съответните участъци.

Пречистване на намножения продукт:

Пречистването на амплификационния продукт е необходимо за да бъдат премахнати останалите в пробата дезоксинуклеотидтрифосфати и праймери, които биха повлияли върху по-нататъшните реакции.

В настоящото изследване се използва ензимно пречистване на продукта с реагент ExoSAP-IT® на фирмата Amersham Biosciences Corp., основаващ се на метода описан от Werle и сътр. [1994]. Реагентът съдържа два хидролитични ензима - Екзонуклеаза I (Exo) и алкална фосфатаза, изолирана от скариди (Shrimp Alkaline Phosphatase - SAP), в буфер. Екзонуклеаза I разгражда едноверижни ДНК фрагменти (в случая това са неизползваните праймери след полимеразната верижна реакция), а алкалната фосфатаза пренахва 5’-фосфатния оттатък от дезоксинуклеотидтрифосфатите и така ги инактивира.

Предимство на ензимния метод на пречистване е, че няма никакви загуби на продукт при процедурата, използва се много малко количество матрица, процедурата е бърза и лесна за изпълнение.

Техника:

В епруветка тип Eppendorf от 0.5 ml се смесват 1.5 µl амплификационен продукт и 0.5 µl ExoSAP-IT®.

Инкубира се на 37^{o}C за 30 min, след което реакцията се спира чрез инактивиране на ензимите на 80^{o}C за 15 min.

Така пречистената матрица може да се съхранява на -20^{o}C.

Провеждане на секвенционна реакция:

За секвенционната реакция е използван кит за секвениране BigDye®Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) включващ Thermo Sequenase II ДНК-полимераза и флуоресцентно белязани нуклеотиди.

Техника:

Към пречистената матрица се добавят 0.3 µl праймер с концентация 10pM/µl, 2 µl 5x секвенционен буфер, 1 µl кит BigDye®Terminator v.3.1, бидестлирана вода до краен обем 10 µl.

Режимът за провеждане на секвенционната реакция е:

Денатутация – 95^{o}C – 20 sec;

Хибридизиране на праймера – 50^{o}C – 15 sec;

Синтез на верига – 60^{o}C – 3 min.

Този цикъл се повтаря 25 пъти.

На този етап не се накапва течен парафин върху пробата, а се използва нагряващ капак, за да се предотврати изпаряването й.

Преутаяване на секвенционния продукт:

Секвенционните продукти се преутаяват чрез преципитират с етанол с цел отстраняване на несвързаните нуклеотиди.

Техника:

Към секвенционната проба се добавят по 1/10 от обема 1.5M натриев ацетат с pH>8 / 250 mM EDTA буфер и се размесва добре чрез неколкократно пипетиране. Добавя се 80 µl студен абсолютен етанол и се вортексира. Центрофугира се на стайна температура за 15 мин при 12 000 rpm. Супернатантата се отстранява внимателно чрез изсмукване на вакуум.

Получената утайка се промива с 200 µl 80% етанол, вортексирт се и се центрофугирт за 10 мин на 12 000 rpm на стайна температура. Супернатантата се изсмукване на вакуум. Утайката се суши на стайна температура на тъмно за 12 часа.

Сухата утайка може да се съхранява на тъмно на стайа температура за няколко дни.

Разтваряне на секвенционния продукт:

Към сухите утайки се добавят 12 µl Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Пробата се вортексира, денатурира се за 5 min на94^{o}C и се прехвърля върху лед за 5 min. След това отново се вортексира и се центрофугира леко, за да се събере цялото количество на дъното.

Така приготвената проба е готова за анализ и се подава на апарата за електрофоретично разделяне.

Визуализиране и отчитане на пробите:

Секвенционните данни се обработват автоматично от програмата ABI310 Data Collection Software v2.1 и се анализират посредством програмата ABI310 Sequencing Analyzer v5.1.1, при което се получават в готов вид под формата на електрофореграма.

Апаратура:

За провеждането на полимеразната верижна реакция, ензимното пречистване на получения продукт и последващата секвензионна реакция са използвани апарати GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, USA; Bioer XP cycler, Hangzhou, P.R. China

Електрофоретичното разделяне на секвенционните продукти се извършва на автоматичен секвенатор ABI Prism 310 Genetic Analyzer.

3.3.5. МУЛТИПЛЕКСНА ЛИГАЗНО ЗАВИСИМА АМПЛИФИКАЦИЯ (MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION, MLPA).

Принцип на MLPA анализа:

Това е метод за геномно профилиране Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) [Schouten et al., 2002; www.mlpa.com].

Фрагментите се сравняват като площ на получените пикове, както в рамките на една проба, така и спрямо контролни проби, анализирани едновременно с изследвания пациент. Когато анализът касае Х свързани гени, пациентите от мъжки пол се анализират спрямо контроли от мъжки пол, а пациентите от женски пол – спрямо контроли от женски пол.

Процедура за MLPA анализ:

Приготвяне на разредки от изходните ДНК проби с концентрация около 100 ng в 1xTE буфер. Разредените проби се денатурират 10 мин на 98^{o}C, след което се охлаждат до 25^{o}C.

ДНК	2.0µl	98°C – 10`
TE buffer	3.0 µl	25°C – 5`
	5.0 µl	

Хибридизация със специфични за отделните генни фрагменти сонди. Към денатурираните проби се добавят по 1.5 µl от сондите и 1.5 µl буфер за хибридизация. Пробите се размесват добре, денатурират се 1 мин на 95^{o}C и се инкубират за хибридизация на 60^{o}C най-малко 16 часа.

Salsa probe black	1.5 µl
Buffer yellow	1.5 µl
	по 3.0 µl на проба

Реакция на лигиране: Пробите се охлаждат до 54^{o}C и се добавят 32 µl Лигаза-65 микс (Лигаза-65 буфер А – 3 µl; Лигаза-65 буфер В – 3 µl; бидестилирана вода – 25 µl; Лигаза-65 – 1 µl). Размесва се добре и се инкубира на 54^{o}C 10-15 мин, след което пробите се денатурират на 98^{o}C за 5 мин и се охлаждат на 4^{o}C.

Ligase 65 buffer A (transparent)	3.0 µl
Ligase 65 buffer B (white)	3.0 µl
Вода	25.0 µl
Ligase (green)	1.0 µl
	по 32 µl на проба

PCR: Компонентите на амплификационната реакция са: SALSA PCR праймер – 2 µl; SALSA Enzyme dilution buffer – 2 µl; вода – 5.5 µl и SALSA полимераза – 0.5 µl. По 10 µl от този амплификационен микс се добавя към всяка проба.

Salsa PCR buffer (red)	4.0 µl
Вода	26.0 µl
MLPA ligation reaction	10.0 µl

PCR апарата се загрява до 60 ^{o} C, след което добавяме следния микс:

Salsa PCR-primer (brown)	2.0 µl
Salsa Enz.Dil. Buffer (blue)	2.0 µl
Water	5.5 µl
Salsa Polymerase (orange)	0.5 µl
	10 µl на проба

Условия на амплификационната реакция: 95^{o}C – 30 сек.; 60^{o}C – 30 сек.; 72^{o}C – 60 сек. (33 цикъла). Следва инкубиране на пробите на 72^{o}C – 20 мин.

Приготвяне на пробите за електрофоретично разделяне: По 2.5 µl от всяка амплифицирана проба се смесват с 12 µl Hi-Di формамид (Applied Biosystems) и 0.6 µl ROX 500 size standard (Applied Biosystems). Така приготвените проби се денатурират на 95^{o}C – 5 мин и се поставят в лед.

Капилярна електрофореза: Електрофорезата се провежда на къса капиляра 47 см (Applied Biosystems) в полимер POP4 (Applied Biosystems).

Визуализиране и отчитане на пробите:

Електрофоретичния профил се обработва и анализира с посредством програмата ABI310 GeneScan v3.1.2, при което се получават в готов вид под формата на електрофореграма.

Апаратура:

За провеждането на MLPA анализа се използва PCR апарат GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, USA; Bioer XP cycler, Hangzhou, P.R. China

Електрофоретичното разделяне на секвенционните продукти се извършва на автоматичен секвенатор ABI Prism 310 Sequence Genetic Analyzer.

● 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

4. 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

Високата честота на идиопатичните генерализирани епилепсии (20-30% от епилепсията в общата популация) с комплексно унаследяване и непълни данни относно генотип-фенотип корелация правят тази група интересен обект в настоящия дисертационен труд.

От друга страна, синдромът на Rett се среща със значително по-ниска честота от ИГЕ, но е отправна диагностична точка за голям брой заболявания с интелектуален дефицит при момичета. Натрупването на голям брой литературни и експериментални данни и обновяване на клиничните критерии за RTT показва нуждата от допълнителна интерпретация на клиничните случаи.

За по-прецизна интерпретация на генотип-фенотип корелациите на 37$^{-те}$ пациента със синдром на Rett, обект на настоящия дисертационен труд бяха обединени с 39 пациента, обект на проучване по отношение на интелектуалния дефицит в предходен дисертационен труд [Тодоров Т, 2011, дисертационен труд]. Цялата група от общо 76 RTT пациента беше прекласифицирана в съответствие с най-новите критерии за синдром на Rett [Neul et al., 2010] и заедно с новополучените данни от настоящия труд са интерпретирани по отношение на генотип-фенотип корелации.

Пациенти с атипичен RTT и епилепсия показват комплексна клинична картина, която се припокрива с епилептична енцефалопатия с ранно начало. Петнадесет пациента, бяха клинично диагностицирани и обособени като EIEE.

4.1. 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].

4.1.1. 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)

Честота на отделните ИГЕ синдроми

Разпределението на пациентите според честотата на отделните ИГЕ синдроми в проучената кохорта от 100 пациенти е представено в Таблица 10 и Фигура 17 по-долу.

Таблица 10. 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 17. 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.

Наследственост за епилепсия сред изследваната популация

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 11.

Таблица 11. 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 12 по-долу представя в обобщен вид тези данни.

Таблица 12. 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 13 по-долу.

Таблица 13. 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 14.

Таблица 14. 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).

4.1.2. 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

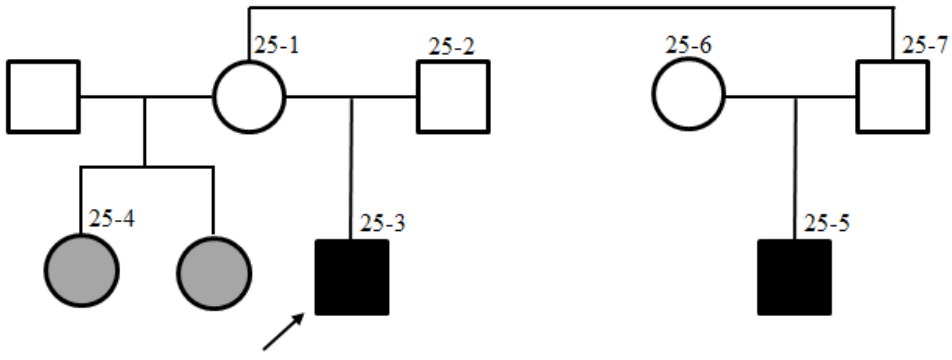
Клинични данни

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.

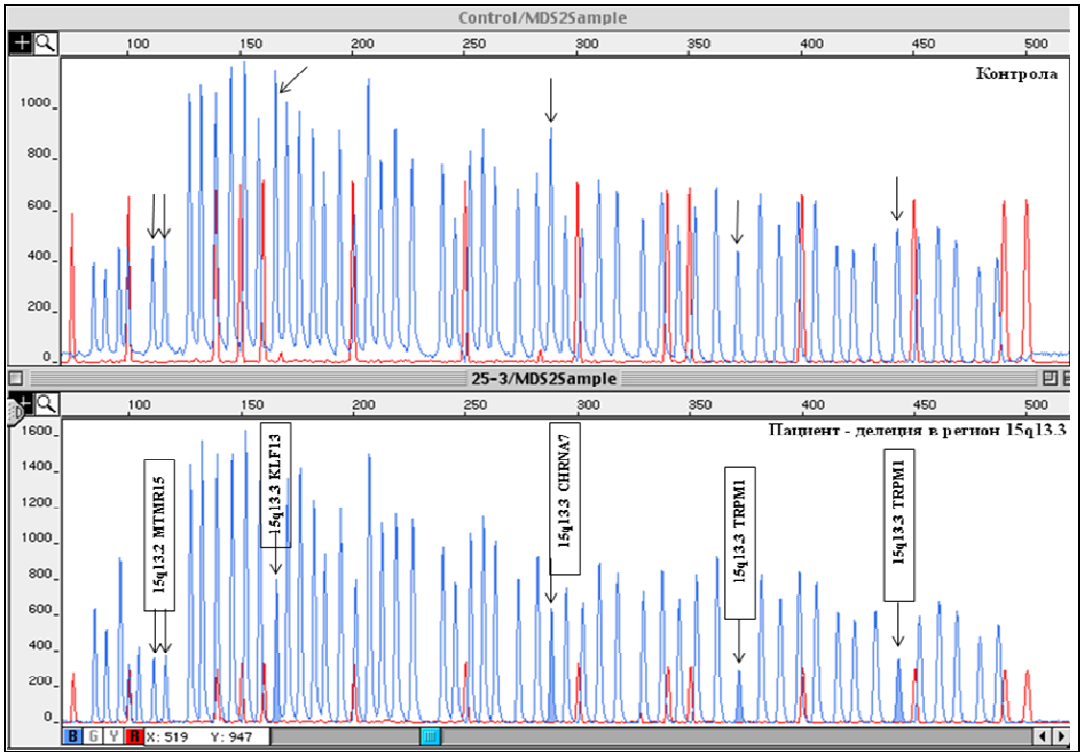
2) Майката има две по-големи дъщери от предишен брак (родословно дърво – Фигура 18), които, по думи на майката, са лекувани за епилепсия в детска възраст. Пристъпите не приличат на тези на пробанда - най-вероятно са имали големи припадъци (*т.е. ГТКП*) или фебрилни гърчове. Едната полусестра към момента отказва генетично изследване. Вуйчото на пациента има син с епилептични пристъпи, които също са различни от тези на пробанда (Фигура 18).



Фигура 18. Родословно дърво при пациент с ИГЕ.

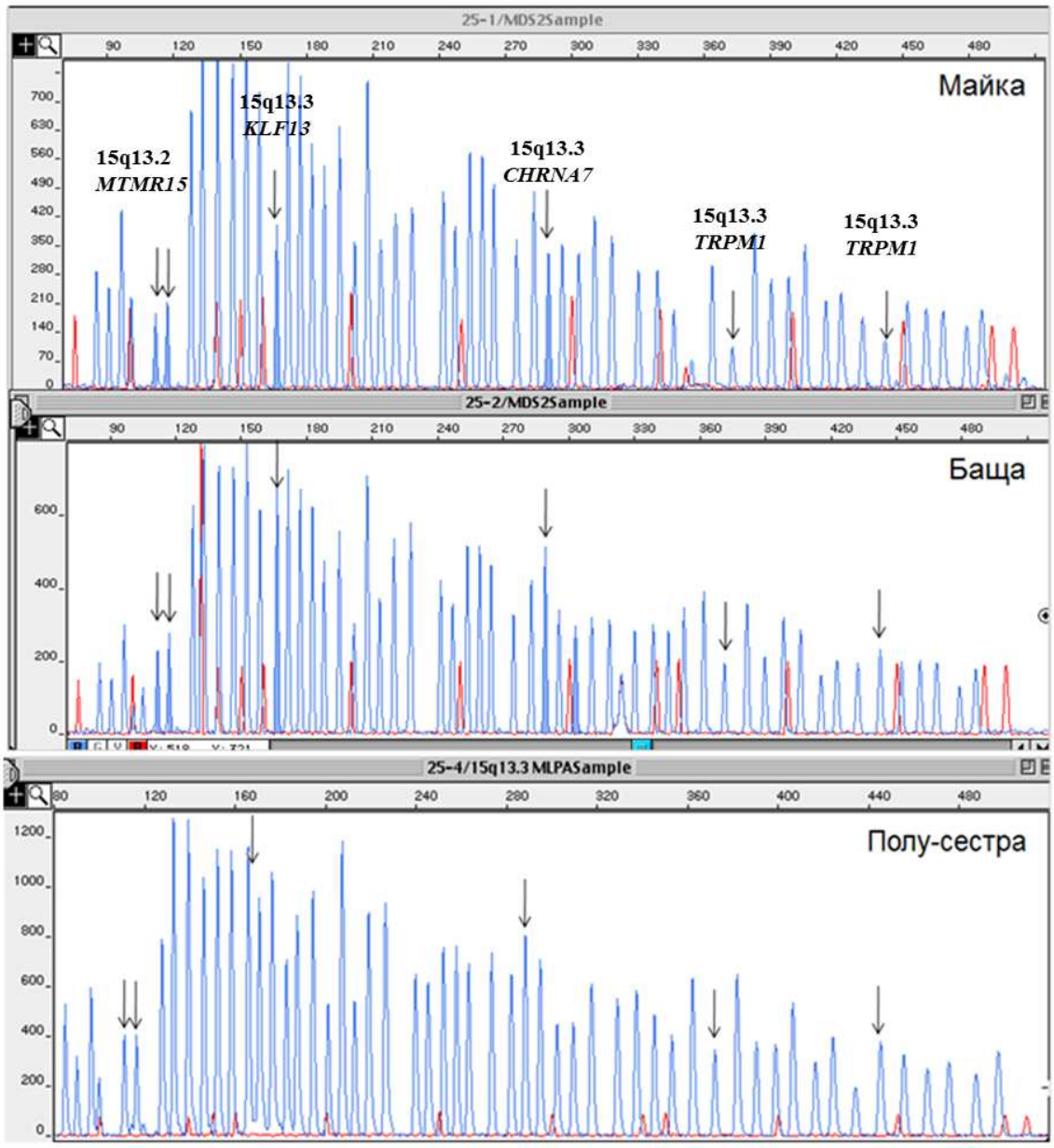
Молекулярно-генетичен анализ

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 19.



Фигура 19. 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 20.



Фигура 2
пациент
обозначе
Съответс

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 15.

Таблица 15. 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:

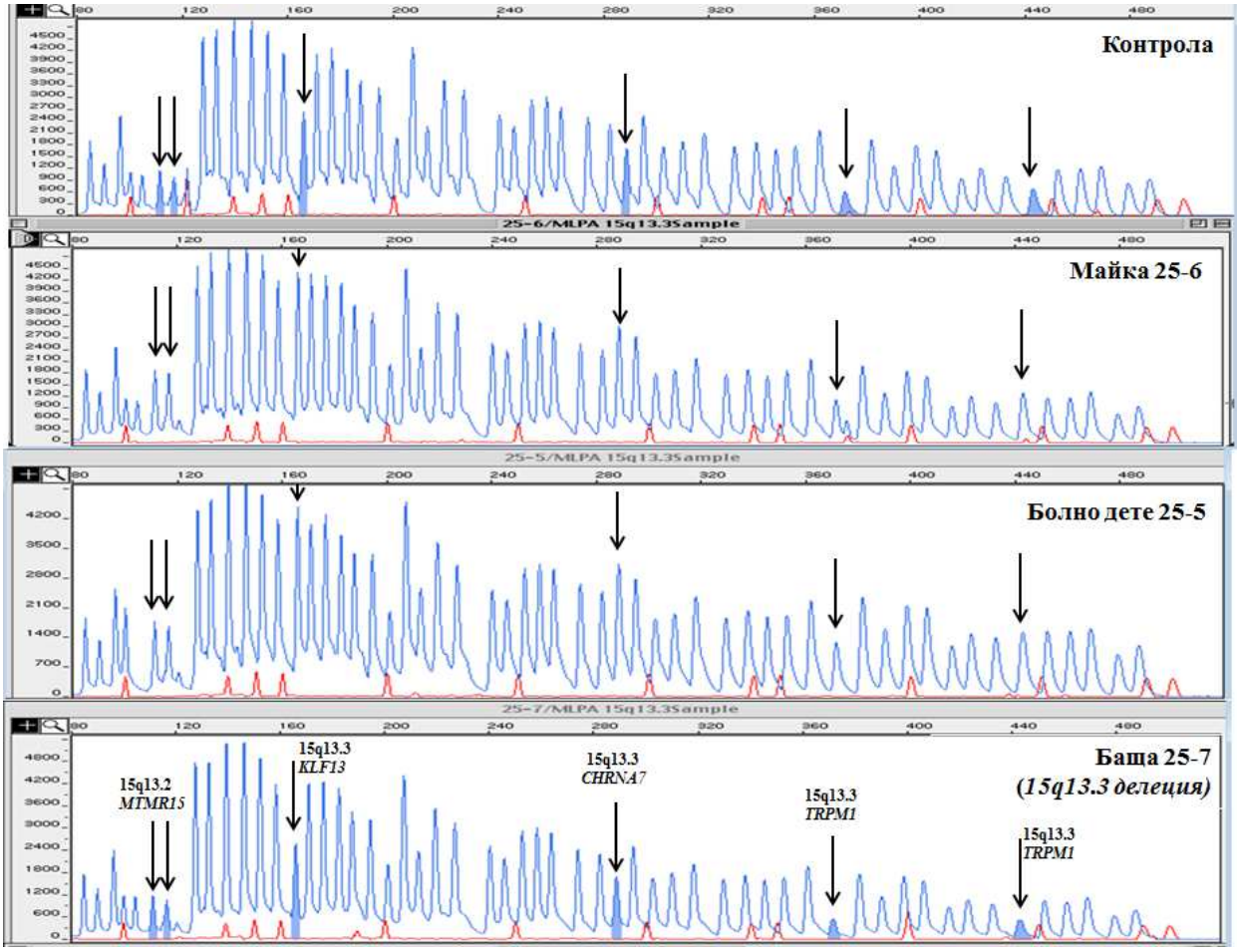
съотношение около 1 – нормален резултат

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 излседвания обхванаха и пациенти 25-5, 25-6 и 25-7 (виж родословното дърво на Фигура 18). Резултатите от MLPA анализа са показани на Фигура 21.

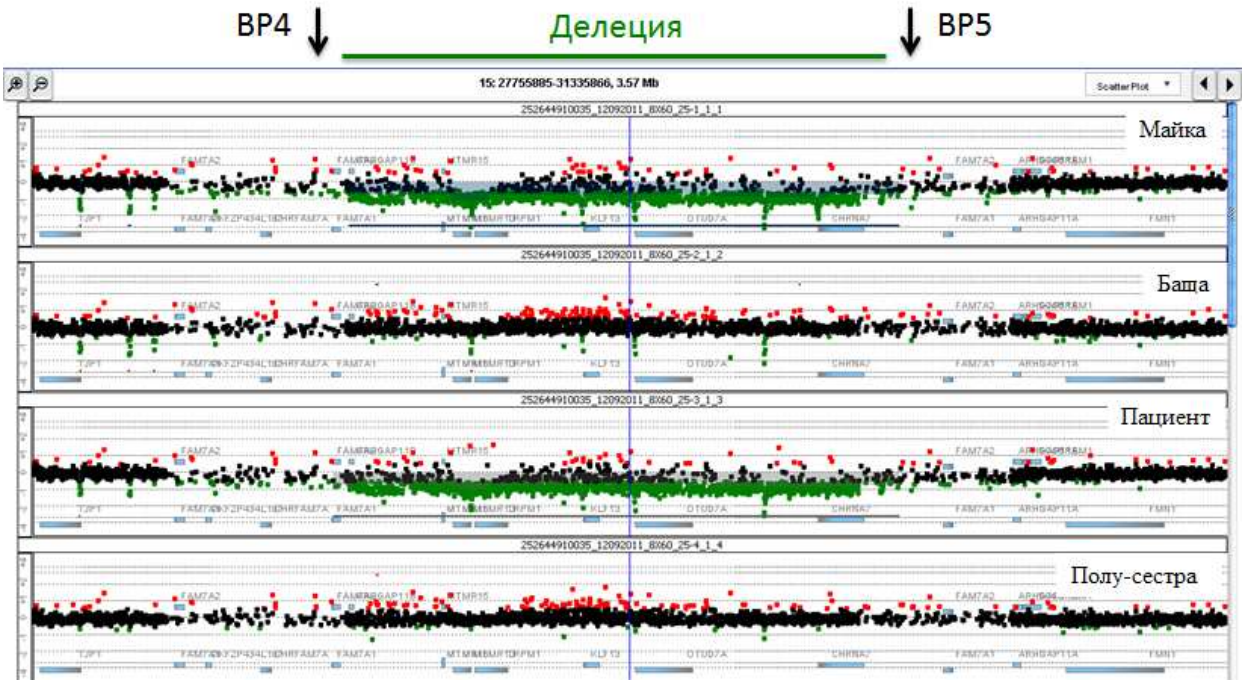
Бащата от този клон също се оказа асимптоматичен по отношение на епилепсия носител на делецията, открита в другия клон на родословието: при неговата асимптоматична сестра и племенник с епилепсия. Тук обаче, болното дете с епилепсия и интелектуален дефицит не е унаследило делецията. Епилепсията при пациент 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 21. 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 22.



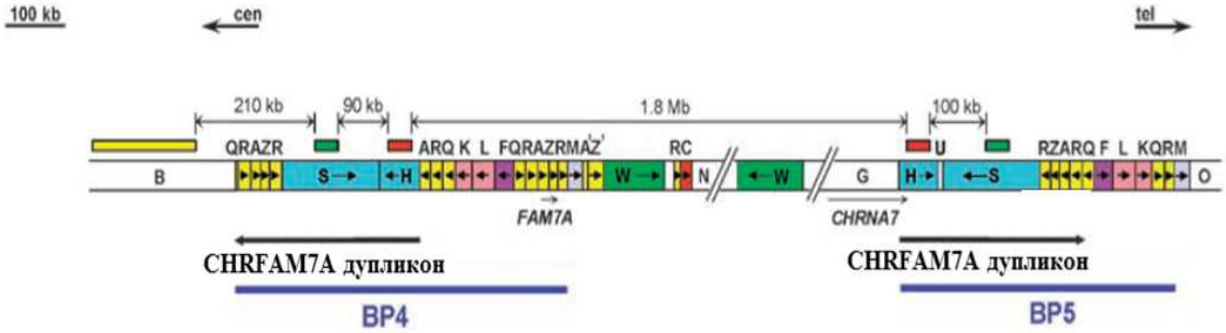
Фигура 22. Сравнителна геномна хибридизация (array CGH) при семейството на пациент с делеция в хромозомен регион 15q13.3. На абсцисата е изобразен хромозомният регион 15q13.3. На ординатата са отбелязани броят копия в сравнение с нормална контрола (от -4 до +4). Всички региони с нормален брой копия са 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.

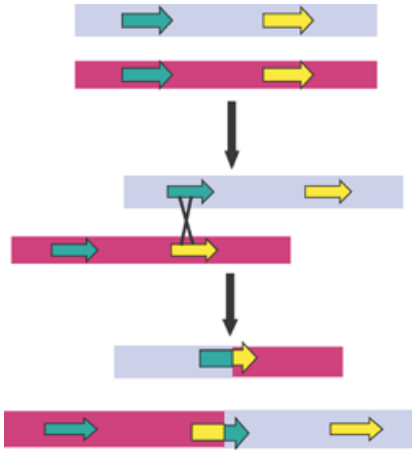
Дългото рамо на 15-та хромозома се характеризира с наличието на т.нар. точки на счупване (break point - BP), които представляват „горещи“ места за хромозомни реаранжировки. Към момента са известни 6 BP в региона 15q11-q14 [Riley et al., 2002]. Регионът 15q13.3 се характеризира с наличието на дипликация 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 23.



Фигура 23. Модел разположение на дупликон, съдържащ *CHRFAM7A* [Flomen et al., 2008].

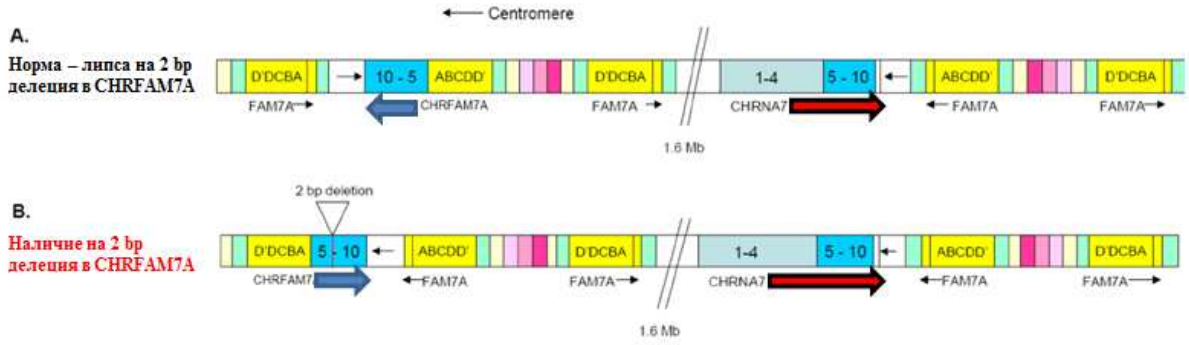
Тези дуплицирани региони са с обратна посока (виж Фигура 23, стрелките на дупликоните) и са основен компонент на BP4 и BP5. Тези региони с висока степен на хомоложност създават вероятност за протичане на неалелна хомоложна рекомбинация (Non allelic homologous recombination - NAHR). NAHR е форма на хомоложна 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 24).



Фигура 24. 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 25).

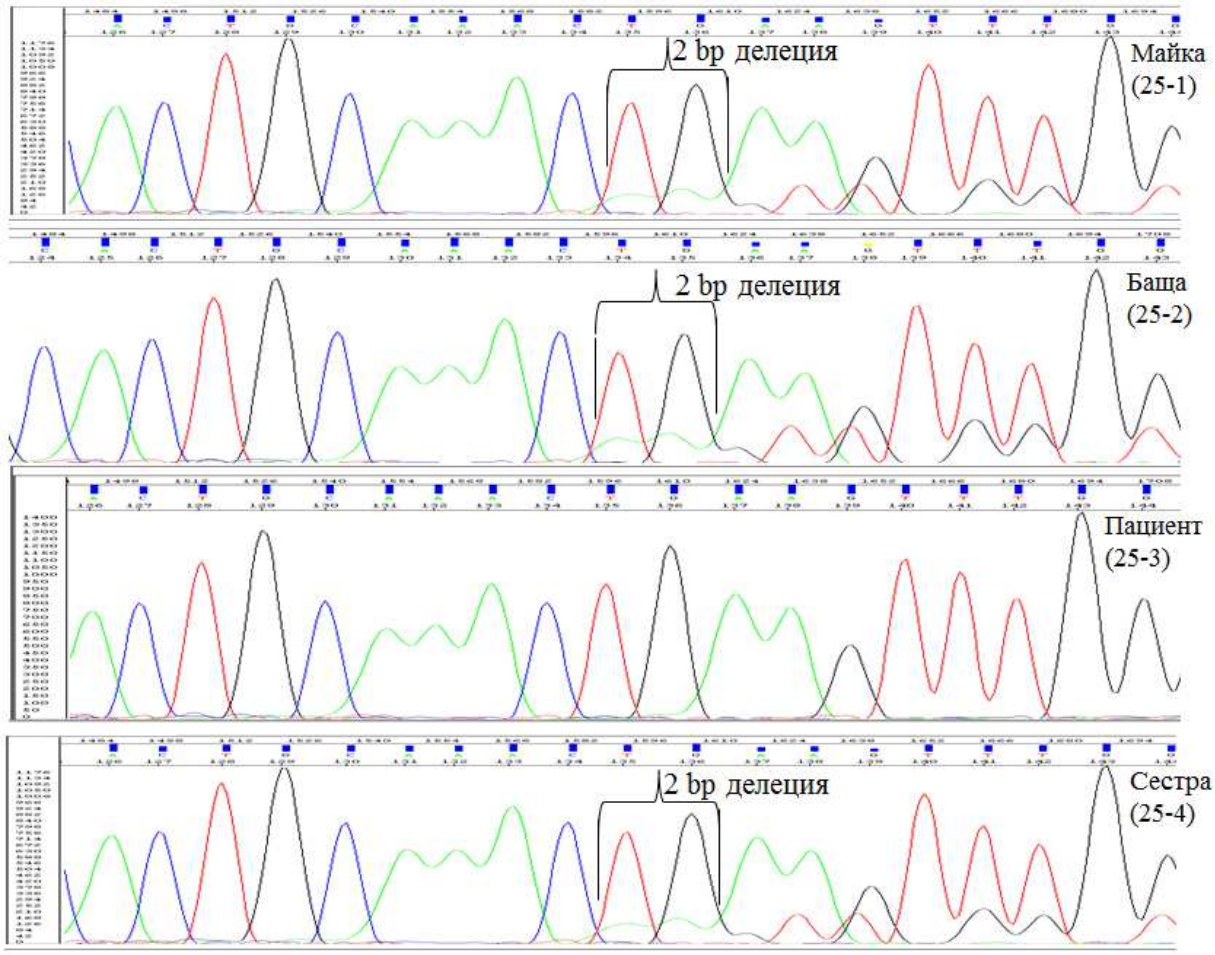


Фигура 25. Схематична карта на *CHRNA7* гена и частичната му дупликация в *CHRFAM7A*.
(А) Див тип *CHRFAM7A* – липса на 2 bp делеция. Наблюдава се противоположна посока на *CHRFAM7A* (синя стрелка) спрямо *CHRNA7* гена (червена стрелка).
(В) Делеция на 2 bp в екзон 6 на *CHRFAM7A* и свързаната с него 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].

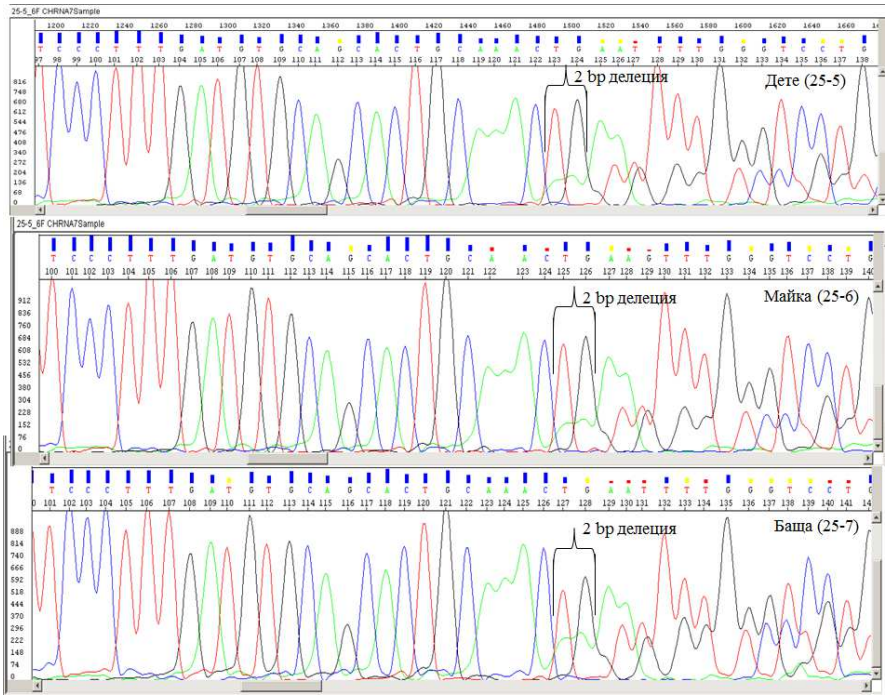
Интересно е предположението, че микроделецията в 15q13.3 може би е по-вероятно да възникне, когато псевдогенът е с права ориентация спрямо *CHRNA7* гена в дуплицирания сегмент [Makoff & Flomen, 2008]. Предполага се, че еднаквата ориентация на елементи с близка секвенция улеснява протичането на неалелна 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 й при пациента (Фигура 26).



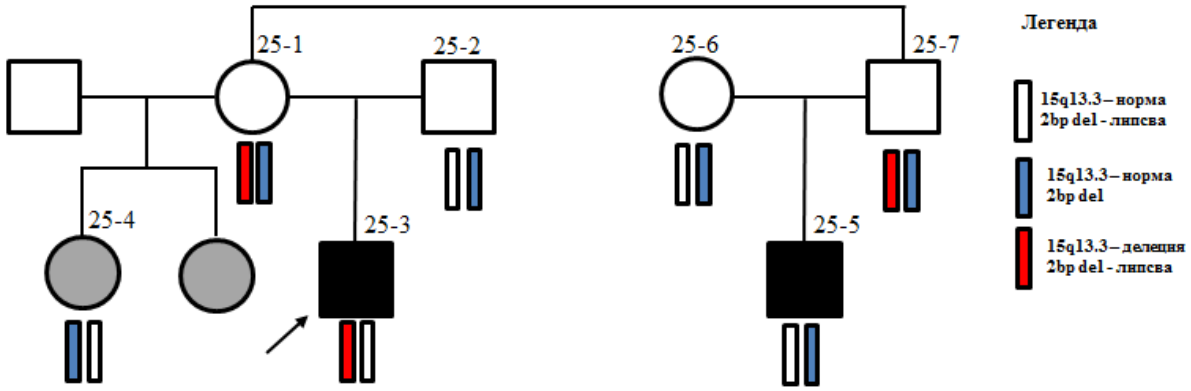
Фигура 26. Секвенционен профил на част от екзон 6 на *CHRFAM7*A в региона на прицелния 2bp делеционен полиморфизъм.

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. (Фигура 27).



Фигура 27. Секвенционен профил на част от екзон 6 на *CHRFAM7*A в региона на прицелния 2bp делеционен полиморфизъм.

Обобщените резултати относно 15q13.3 делецията и 2 bp полиморфизма са представени върху родословното дърво (Фигура 28).



Фигура 28. 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 (виж Фигура 25b) [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.

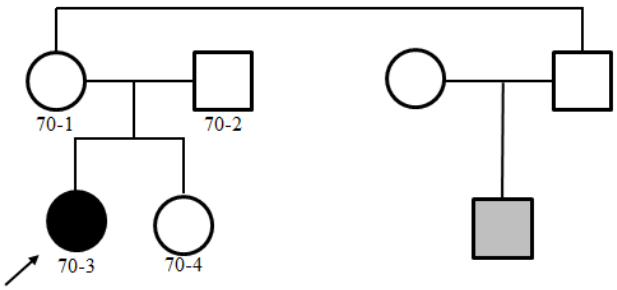
Случай II – дупликация на *CHRNA7* гена

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

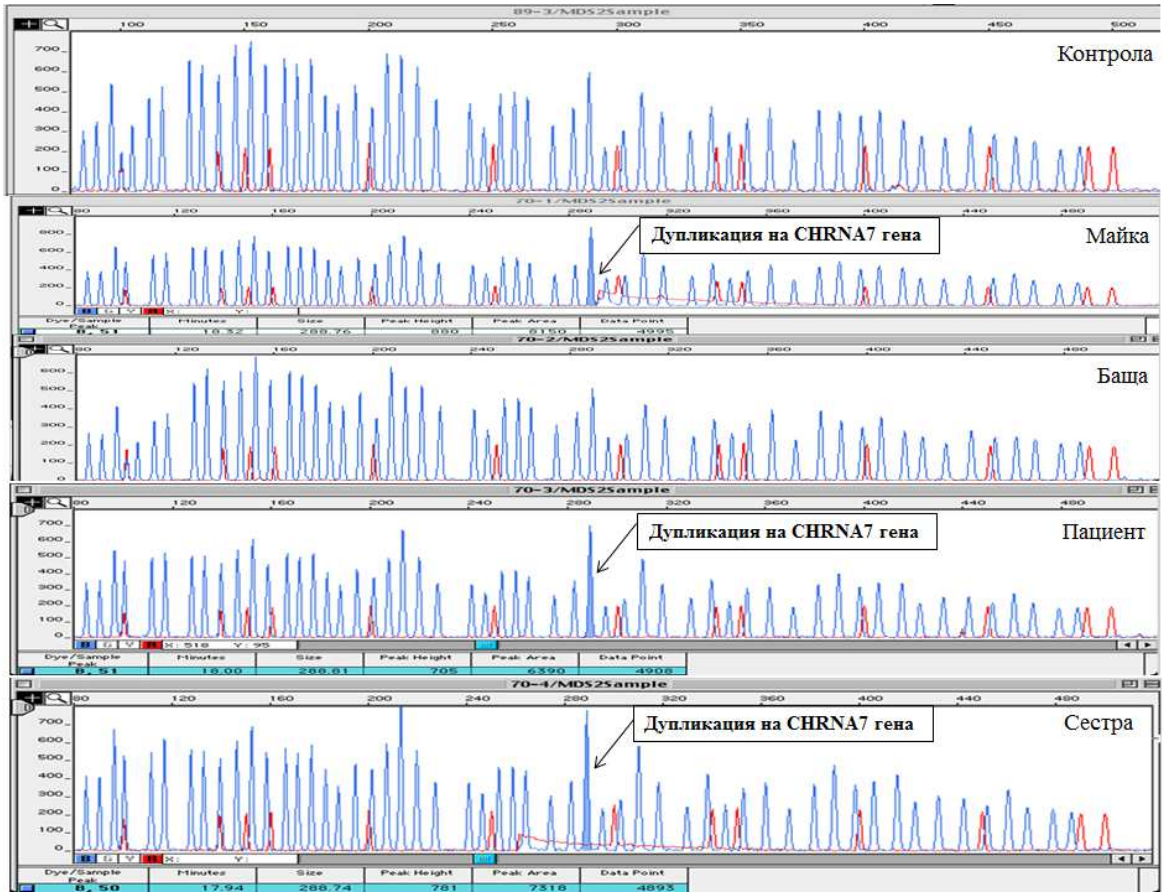
Детето има по-голяма здрава сестра. Съобщава се обаче, за братовчед по майчина линия с неясен единичен пристъп на 27 г. възраст. Родословното дърво е показано на Фигура 28.



Фигура 28. 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 29.



Фигура 29. 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 16.

Таблица 16. 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

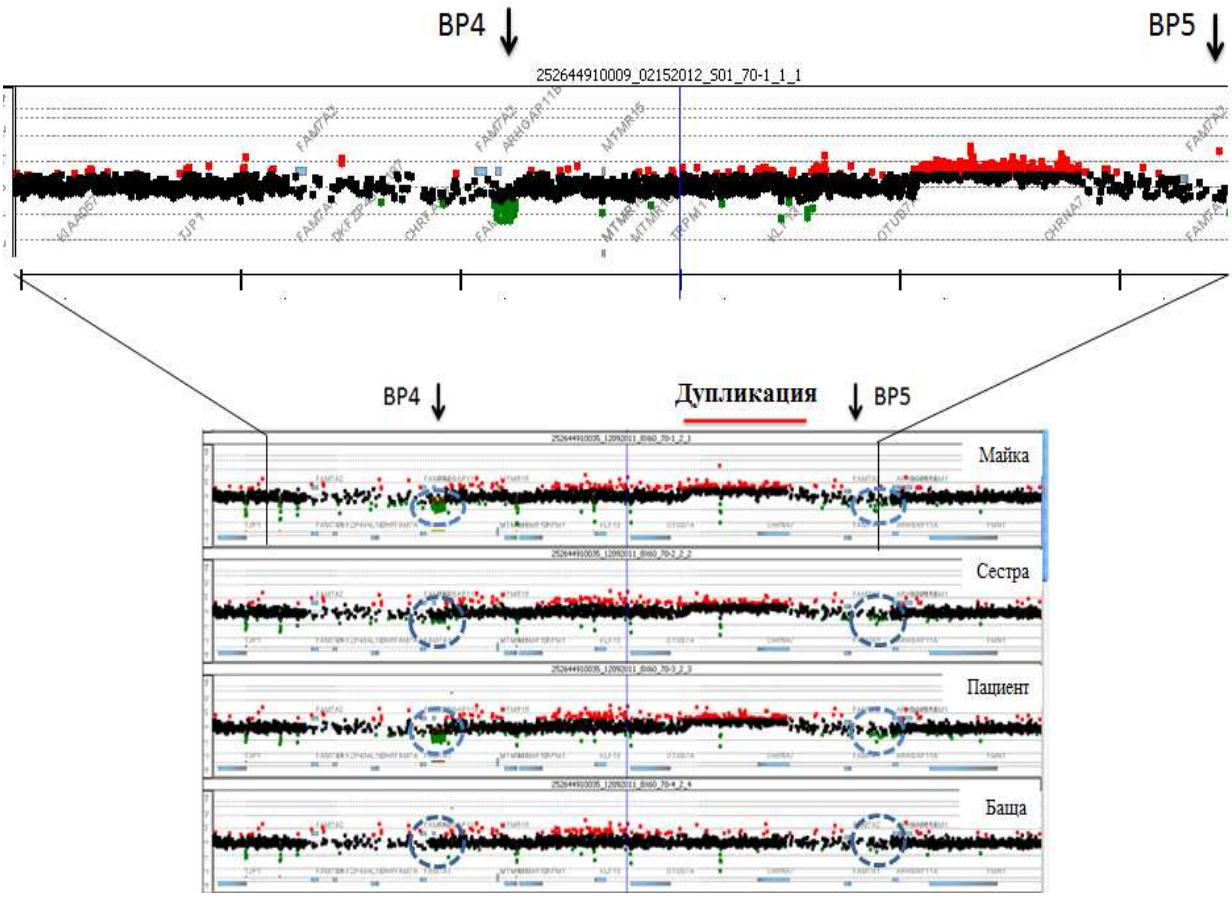
съотношение >1.6 – дупликация

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 29. 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).

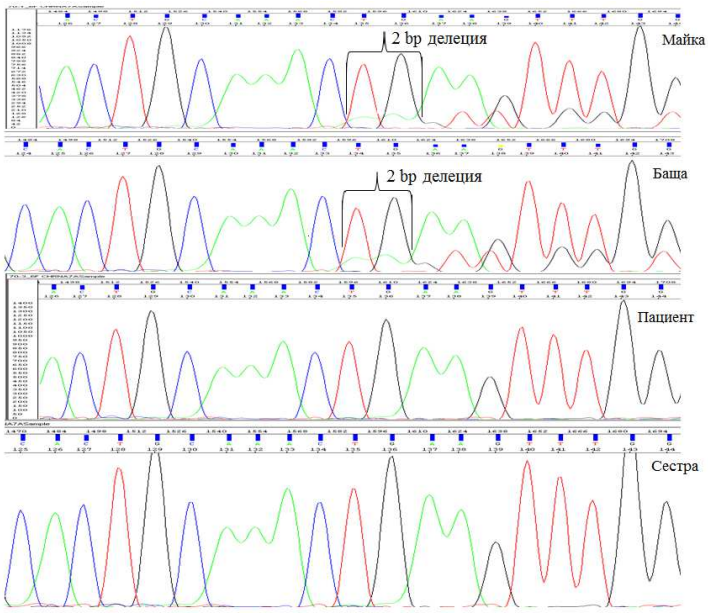
Сравнителната геномна хибридизация в допълнение показа наличието на 2 малки делеции попадащи точно в горещите точки на разкъсване BP4 и BP5 (оградени с пунктирана окръжност). При бащата, единственият който не носи дупликация, не се откриват тези делеции (регионите също са оградени за сравнение). Делециите 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 29. 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.

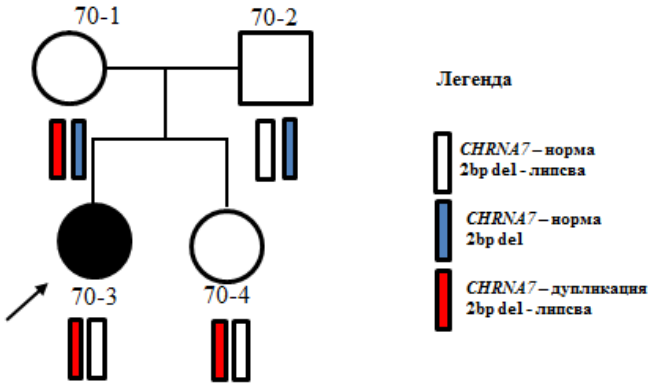
На база на получените резултати и познанията ни относно архитектурата на 15q13.3 региона беше предположено, че най-вероятно делециите са възникнали заедно с дупликацията при протичане на хромозомните реаранжировки в региона. Най-вероятно се касае за първоначално възникване на голяма дупликация в региона 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. Резултатите са представени на Фигура 30.



Фигура 30. Секвенционен профил на част от екзон 6 на *CHRFAM7*A в региона на прицелния 2 bp делеционен полиморфизъм.

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 31).



Фигура 31. 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 няма 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.

4.1.3. 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.

4.2.1. 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 (виж литературен обзор, стр. 20 Таблица 1).

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], който е представен в литературния обзор, стр. 29, Фигура 13.

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 16, като пациентите са

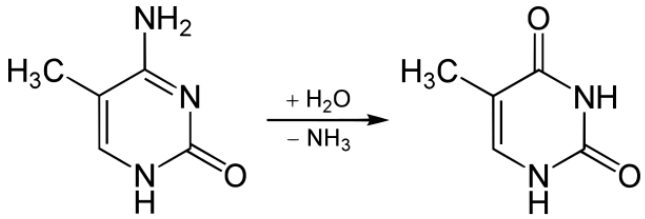
групирани на базата на клиничните симптоми с акцент върху наличие или отсъствие на епилепсия.

В хода на проведените молекулярно-биологични изследвания бяха открити мутации в *MECP2* гена при 28 пациента (28/70=40%) (Таблица 16). Това са всички пациенти в България с доказана мутация в *MECP2* гена. Точковите мутации засягат 11 различни нуклеотидни/аминокиселинни позиции.

Таблица 16. 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

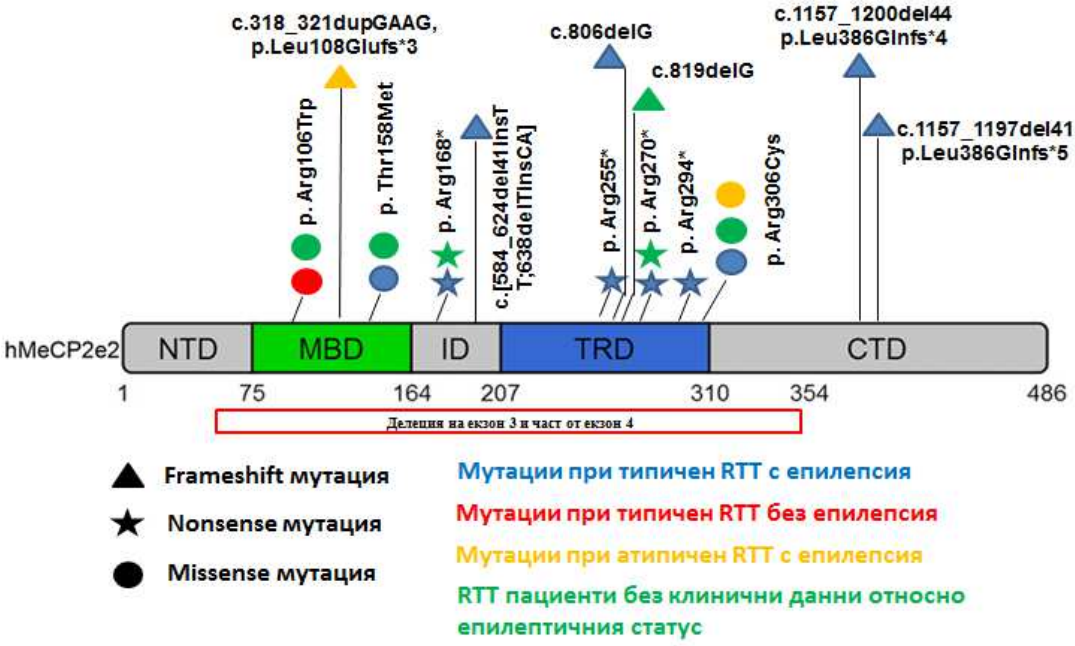
Всички точкови мутации в изследваната група представляват транзиции на С към Т. Всички тези транзиции засягат CpG динуклеотид, където 5-метилцитозин лесно се деаминира и преминава в тимин, пропуска се от поправящите системи и остава фиксиран в генома като патологична мутация (model of mutagenesis by methylation-mediated deamination in CpGs) [Kunkel and Alexander, 1986] (Фигура 32).



Фигура 32. Мутагенеза чрез дезаминиране на 5-метил цитозин до тимин.

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 33.



Фигура 33. 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 срешат 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 C-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.

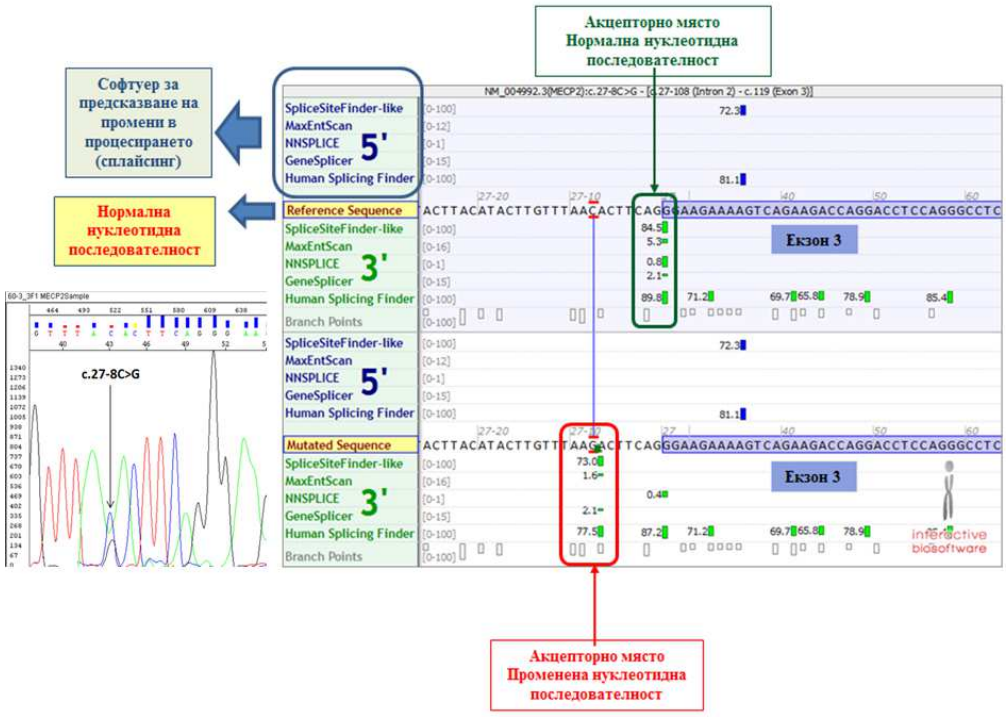
1. Сплайс мутации

1.1. **c.27-8C>G** (Фигура 34)

Нуклеотидна замяна в интрон 2

cDNA:	**NM_004992.3:c.27-8C>G**
DNA Level (genomic):	**ChrX(GRCh37):g.153298016G>C**
Protein Level:	**p.?**
Splicing predictions at nearest natural jonction	**8 bps downstream: -49.9%**

Очаква се нормалното акцепторно място на 8 bp downstream да се разпознава с 49.9% по-рядко. Това води до намаляване количеството на нормално процесирания продукт и произвеждане на алтернативно процесиран продукт с изместена рамка на четене (frameshift), Фигура 34.

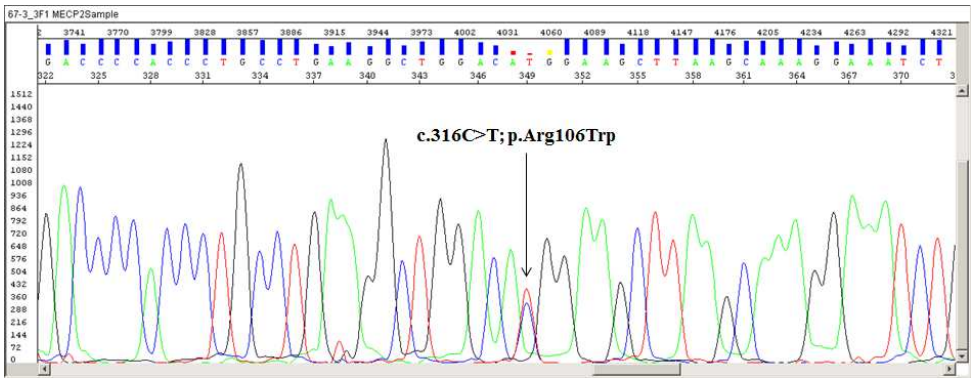


Фигура 34. Резултати от софтуерна обработка за предсказване ефект на нуклеотидните промени - Interactive Biosoftware - Created by Alamut version 2.2e on 3/5/2013.

2. Missense мутации

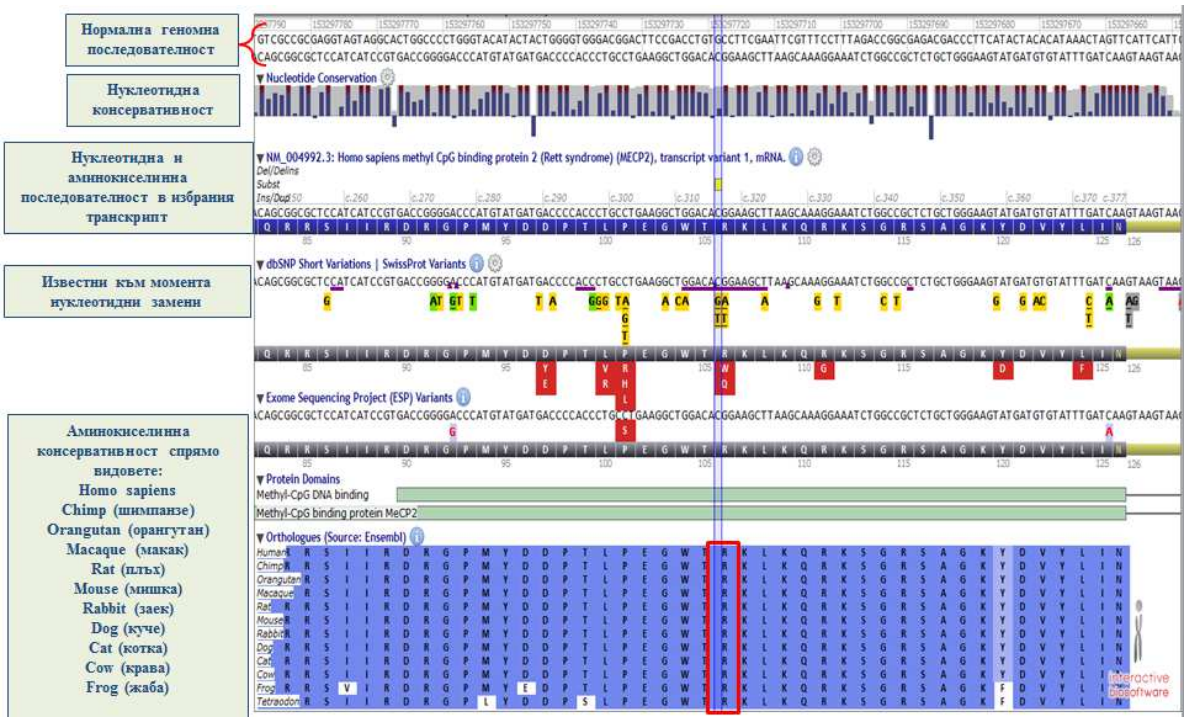
2.1. c.316C>T; p.Arg106Trp (Фигура 35)

DNA Level (cDNA):	**NM_004992.3:c.316C>T**
DNA Level (genomic):	**ChrX(GRCh37):g.153297719G>A**
Protein Level:	**p.Arg106Trp**
dbSNP:	**rs28934907**
Тип мутация	**Missense**



Фигура 35. Секвенционен профил на част от екзон 4 на *MECP2* гена.

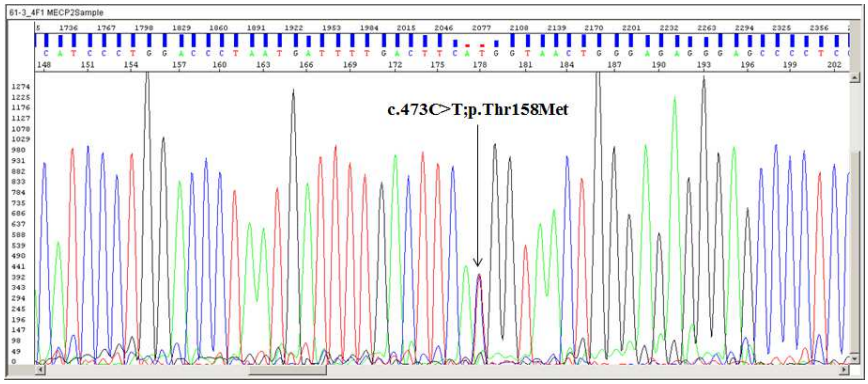
Замяната засяга слабо консервативен нуклеотид, но води до промяна във високо консервативна аминокиселина в протеиновия домен за свързване с метилирана ДНК (Methyl-CpG DNA binding domain) (Фигура 36). Мутацията е съобщавана като патогенна в базата данни Uniprot - Swiss-Prot variant: VAR_010275 in UniProtKB/Swiss-Prot **P51608 (**VAR_010272). Софтуерната обработка показва максимална вероятност за патогенност (MutationTaster: disease causing (p-value: 1.0).



Фигура 36. Резултати от софтуерна обработка на нуклеотидните промени - Interactive Biosoftware - Created by Alamut version 2.2e on 3/5/2013.

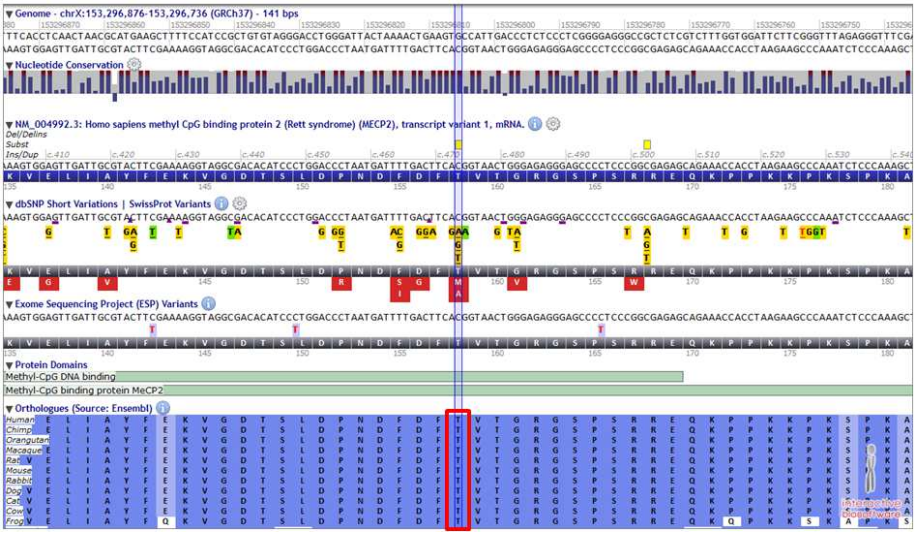
2.2. **c.473C>T; p.Thr158Met** (Фигура 37)

DNA Level (cDNA):	**NM_004992.3:c.473C>T**
DNA Level (genomic):	**ChrX(GRCh37):g.153296806G>A**
Protein Level:	**p.Thr158Met**
dbSNP:	**rs28934906**
Тип мутация	**Missense**



Фигура 37. Секвенционен профил на част от екзон 4 на *MECP2* гена.

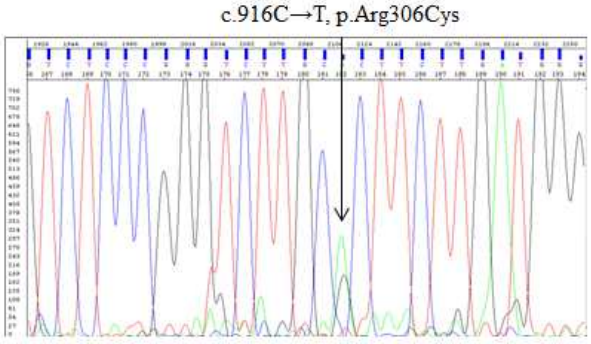
Замяната засяга силно консервативен нуклеотид и аминокиселина в протеинов домен за свързване с метилирана ДНК (Methyl-CpG DNA binding domain). Мутацията е съобщавана като патогенна в базата данни Uniprot - Swiss-Prot variant: VAR_010275 in UniProtKB/Swiss-Prot **P51608 (**VAR_010275). Софтуерната обработка показва максимална вероятност за патогенност (MutationTaster: disease causing (p-value: 1.0)



Фигура 38. Резултати от софтуерна обработка на нуклеотидните промени - Interactive Biosoftware - Created by Alamut version 2.2e on 3/5/2013.

2.3. **c.916C>T** (Фигура 39)

DNA Level (cDNA):	**NM_004992.3:c.916C>T**
DNA Level (genomic):	**ChrX(GRCh37):g.153296363G>A**
Protein Level:	**p.Arg306Cys**
dbSNP	**rs28935468**
Тип мутация	**Missense**

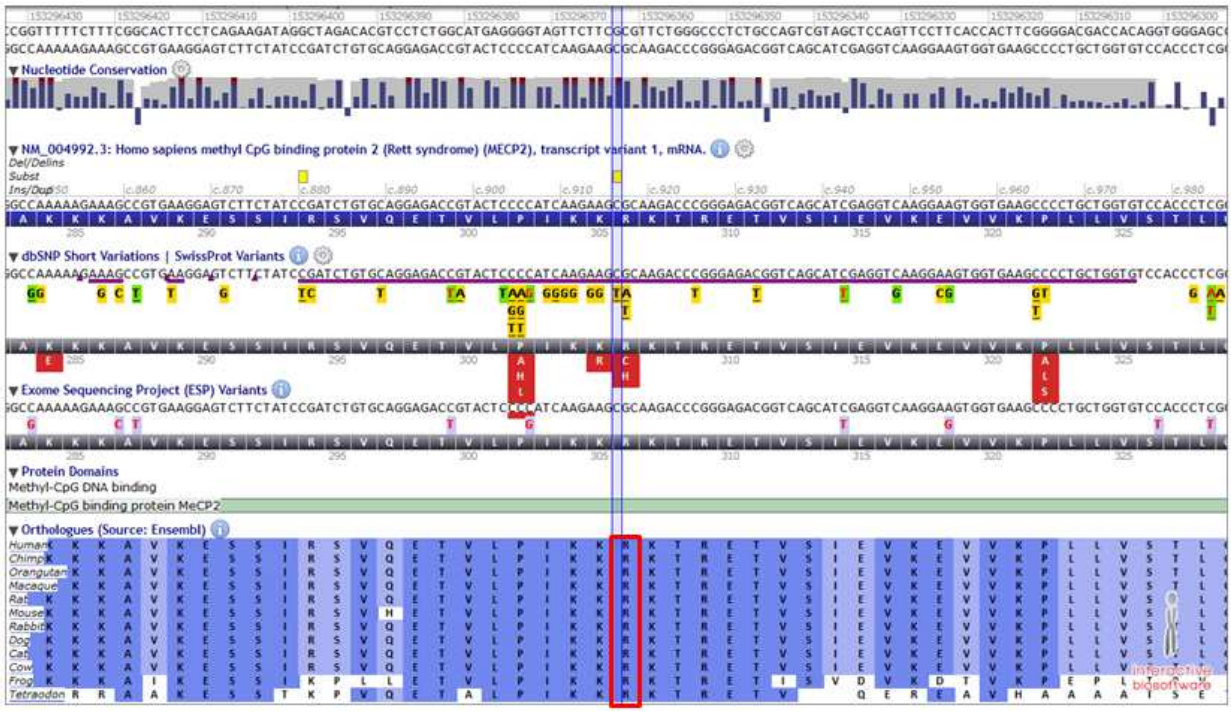


Фигура 39. Секвенционен профил на част от екзон 4 на *MECP2* гена.

Замяната не засяга високо консервативен нуклеотид, но води до промяна във високо консервативна аминокиселина в протеиновия домен за свързване с метилирана ДНК (Methyl-CpG DNA binding domein) (Фигура 40).

Мутацията е съобщавана като патогенна в базата данни Uniprot - Swiss-Prot variant: VAR_010275 in UniProtKB/Swiss-Prot **P51608** VAR_010282).

Софтуерната обработка показва максимална вероятност за патогенност (MutationTaster: disease causing (p-value: 1.0)).



Фигура 40. Резултати от софтуерна обработка на нуклеотидните промени - Interactive Biosoftware - Created by Alamut version 2.2e on 3/5/2013.

Обобщение на получените данни при missense мутации

Може да се направи заключение, че 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.

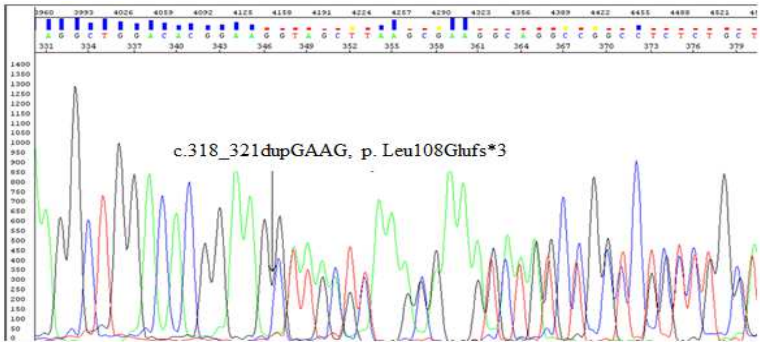
BDNF, подобно на другите невротрофини е полипептиден фактор, отговорен за пролиферация, диференциация и преживяване на неврона като по този начин всъщност повлиява невронната морфология и синаптогенеза [Barde, 1989]. BDNF се синтезира от неврони в гръбначния мозък, хипокампуса и кортекса, след което 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.

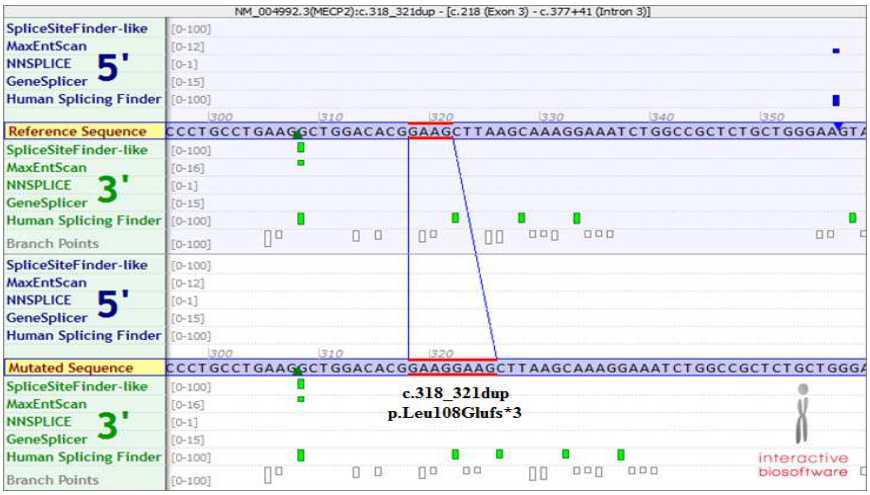
Малки делеции / дупликации / инсерции

1. **c.318_321dupGAAG, p. Leu108Glufs*3** (Фигура 41)

DNA Level (cDNA): **NM_004992.3:c.318_321dup**
DNA Level (genomic): **ChrX(GRCh37):g.153297714_153297717dup**
Protein Level: **p.Leu108Glufs*3**
Тип мутация **дупликация**



Фигура 41. Секвенционен профил на част от *MECP2* гена.



Фигура 42. Резултати от софтуерна обработка на нуклеотидните промени - Interactive Biosoftware - Created by Alamut version 2.2e on 3/5/2013.

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

Това е една от малкия брой мутации, попадащи в екзон 3 и до момента не е публикувана в световната литература. Мутацията е открита при пациент с атипичен RTT и

епилепсия, което показва тежка клинична картина, характерна за мутации, водещи до изместване рамката на четене. Това показва че локализацията на мутациите в *MECP2* гена не се асоциира с различна фенотипна изява.

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

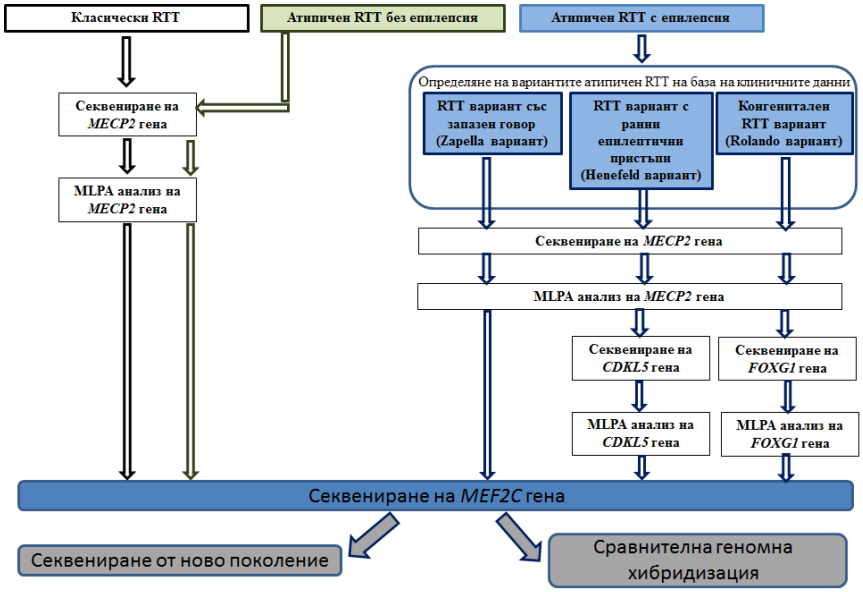
Епилепсия се наблюдава при 70% до 90% от пациентите с класически синдром на Rett [Cooper at al.,1998a,b; Nagie & Witt, 1989; Steffenbutg et al., 2001]. Въпреки това към момента според последната ревизия на критериите за RTT (Фигура 5), епилепсията не участва в основните критерии.

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 16). 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 43).



Фигура 43. 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

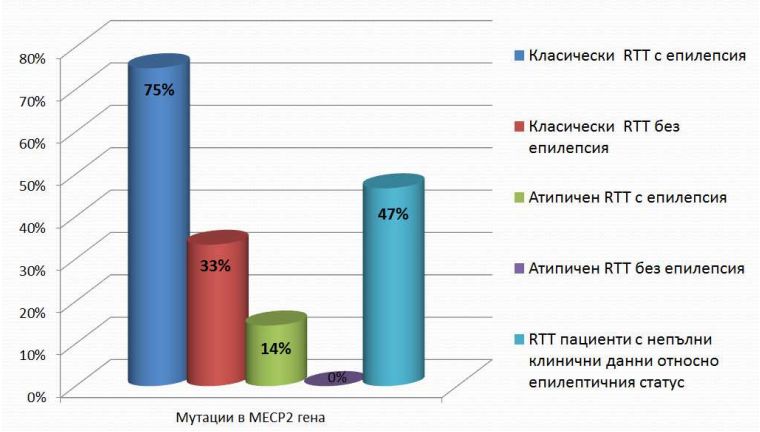
Всички открити мутации в изследваната група пациенти бяха проверени при техните родители. Резултатите показаха, че всички мутации са нововъзникнали при болното дете и не са унаследени от родителите. Тези резултати потвърждават патологичния характер на откритите генни изменения и появата им като повтарящи 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 44. 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.

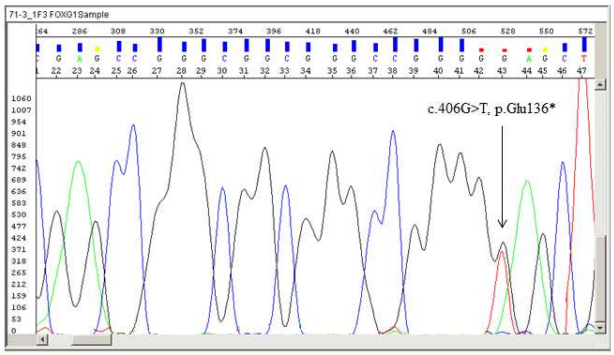
Пациентката е 4 годишно момиче с клинична диагноза RTT. Тя е с нормален радиус на главата (occipitofrontal head circumference - OFC) при раждане. След това се наблюдава изоставане в растежа на главата (OFC - 45 cm), микроцефалия (standard deviation score, SDS - 3,43). При пациентката се наблюдава нарушен 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.

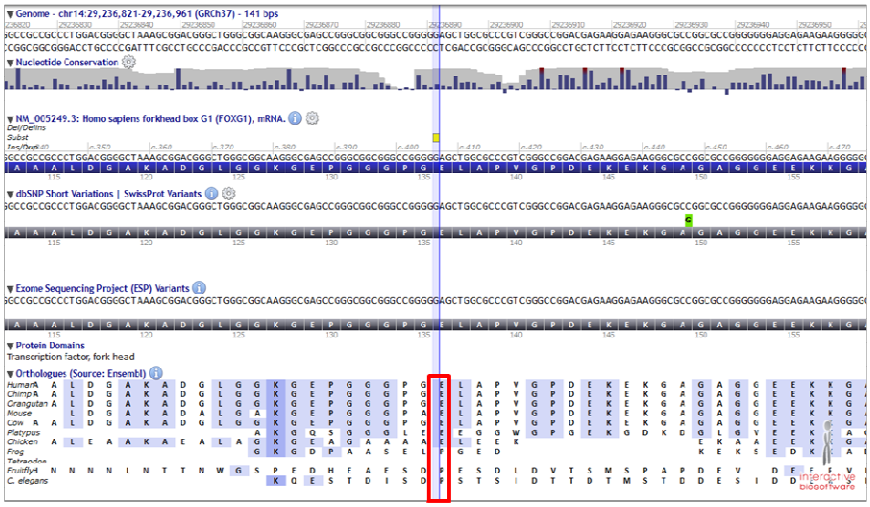
Като следваща стъпка в алгоритъма, съгласно международните препоръки [Neul et al., 2010] беше проведен секвенционен анализ на *FOXG1* гена. Молекулярно-генетичният резултат показва непубликувана до момента мутация в хетерозиготно състояние. Мутацията

генерира стоп кодон и се намира в екзон 1 на *FOXG1* гена: c.406G>T; p.Glu136* (Фигура 45).

DNA Level (cDNA):	**NM_005249.3:c.406G>T**
DNA Level (genomic):	**Chr14(GRCh37):g.29236891G>T**
Protein Level:	**p.Glu136***
Тип мутация	**Nonsense**



Фигура 45. Секвенционен профил на част от *FOXG1* гена.

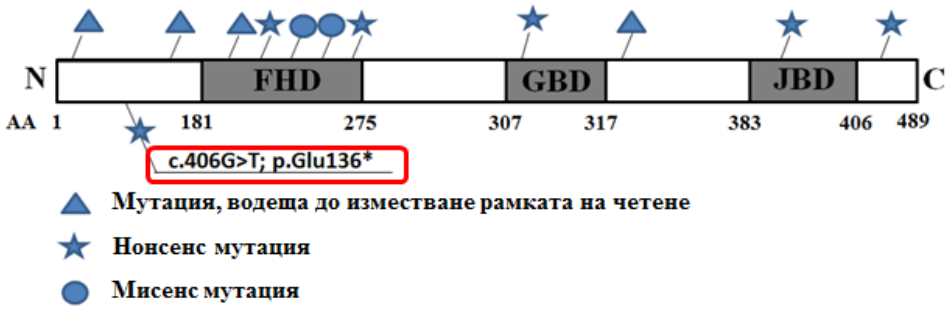


Фигура 46. Резултати от софтуерна обработка на нуклеотидните промени - Interactive Biosoftware - Created by Alamut version 2.2e.

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 (Фигура 46). 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 47).



Фигура 47. 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.

4.3. 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].

4.3.1. 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 изследване 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 17 са показани проведените молекулярно-генетични анализи при подбраната група пациенти .

Таблица 17. 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)

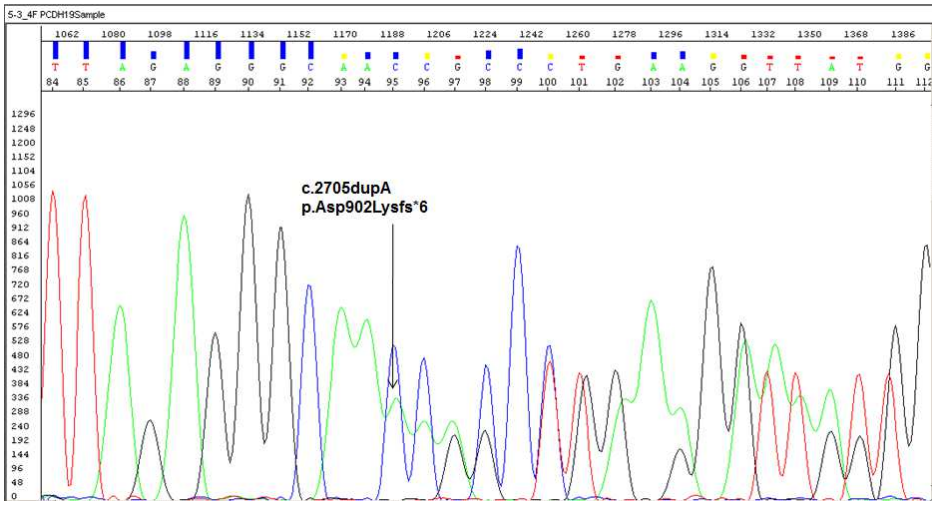
Момиче на 13 годишна възраст, родено от първа, нормално протекла бременност и неродствени родители. Семейството е от български произход и няма данни за фамилна обремененост. Момичето показва първоначално нормално постнатално развитие. На 5 месечна възраст започва поява на фебрилни тонични пристъпи. Продължителността 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.

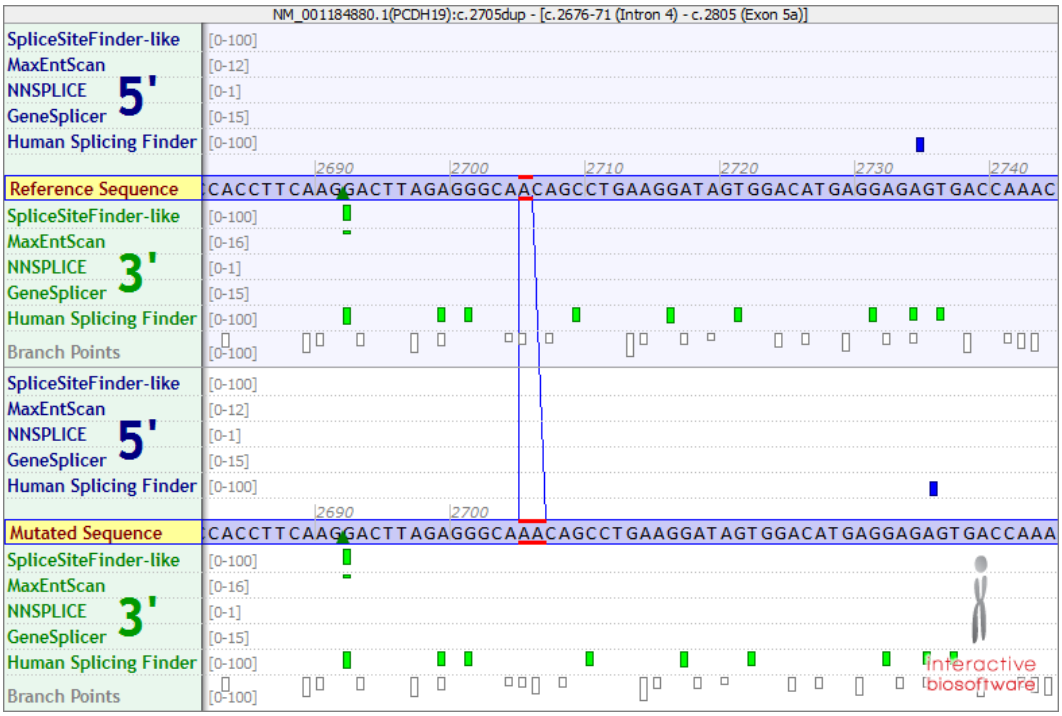
Описаната клинична картина показва прилика с ранна инфантилна епилептична енцефалопатия 9 (Epileptic Encephalopathy, Early Infantile 9 – EIEE9) и пациентката е насочена за молекулярно генетичен анализ на *PCDH19* гена. Молекулярно-генетичният анализ доведе до откриване на непубликувана до момента дупликация в изследвания ген - c.2705dupA; p.Asp902Lysfs*6 (Фигура 48).

DNA Level (cDNA):	**NM_001184880.1:c.2705dupA**
DNA Level (genomic):	**ChrX(GRCh37):g.99597044dup**
Protein Level:	**p.Asn902Lysfs*6**
Тип мутация	**дупликация**

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



Фигура 48. Генетична последователност на част от *PCDH19* гена в региона на мутацията.



Фигура 49. Резултати от софтуерна обработка на нуклеотидните промени - Interactive Biosoftware - Created by Alamut version 2.2e.

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.

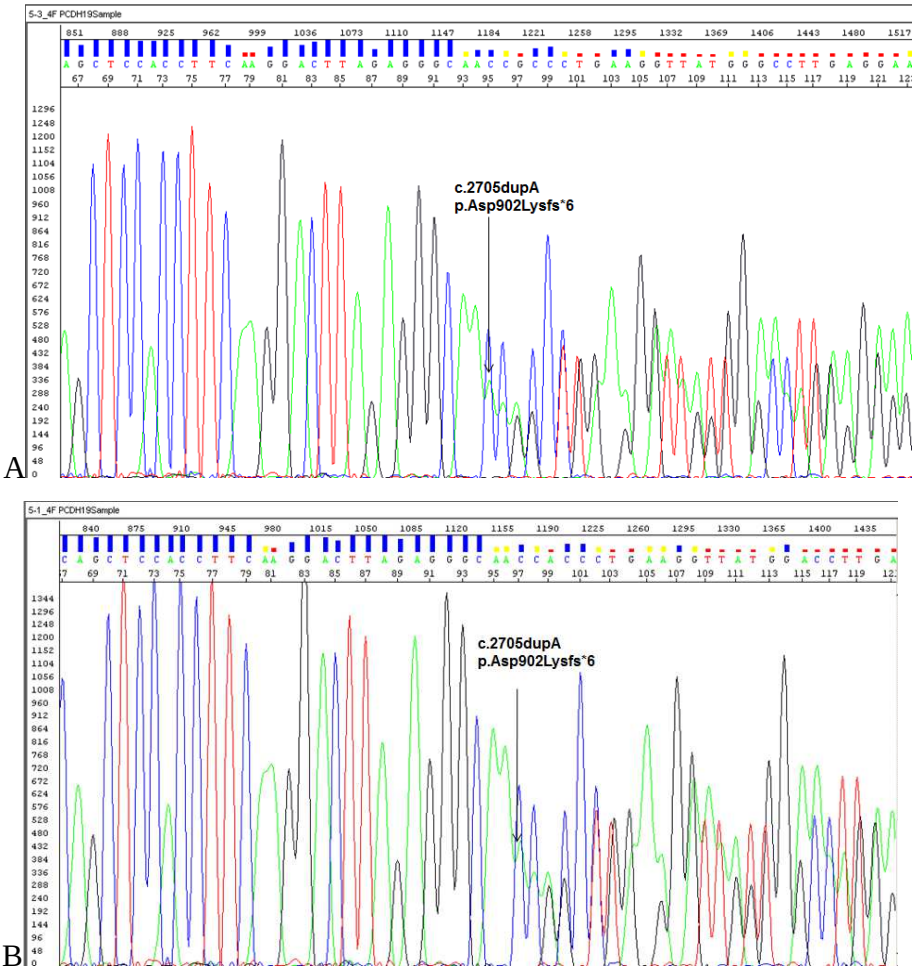
Типичната фенотипна проява на мутации в *PCDH19* гена е описана в редица проучвания през последните години [Marini et al., 2010; Depienne et al., 2011; Hirugashi et al., 2011; Specchio et al., 2011]. Генерализираните гърчове с ранно начало са първоначално провокирани от фебрилитет, честотата им нараства 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 53). 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 (виж. литературен обзор, стр. 34).

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 50).

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 50. 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 обясниии 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.

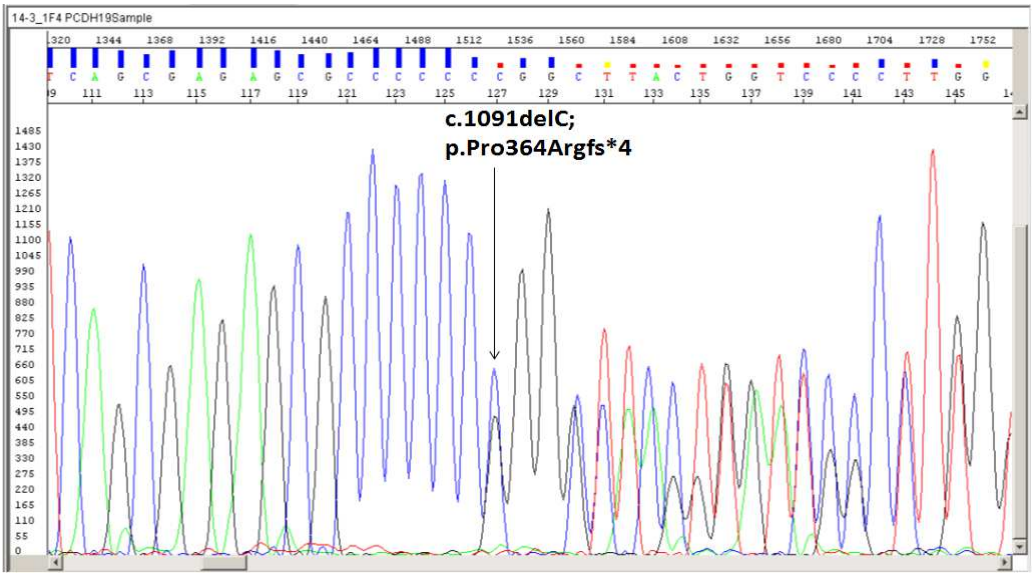
Случай II (пациент 11)

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 (Фигура 51).

DNA Level (cDNA):	**NM_001184880.1:c.1091delC**
DNA Level (genomic):	**ChrX(GRCh37):g.99662505del**
Protein Level:	**p.Pro364Argfs*4**
Тип мутация	**делеция**

Секвенционният профил на генетичния дефект и софтуерната обработка са показани на Фигури 51 и 52.



Фигура 51. Генетична последователност на част от екзон 1 на *PCDH19* гена в региона на мутацията.



Фигура 52. Резултати от софтуерна обработка на нуклеотидните промени - Interactive Biosoftware - Created by Alamut version 2.2e.

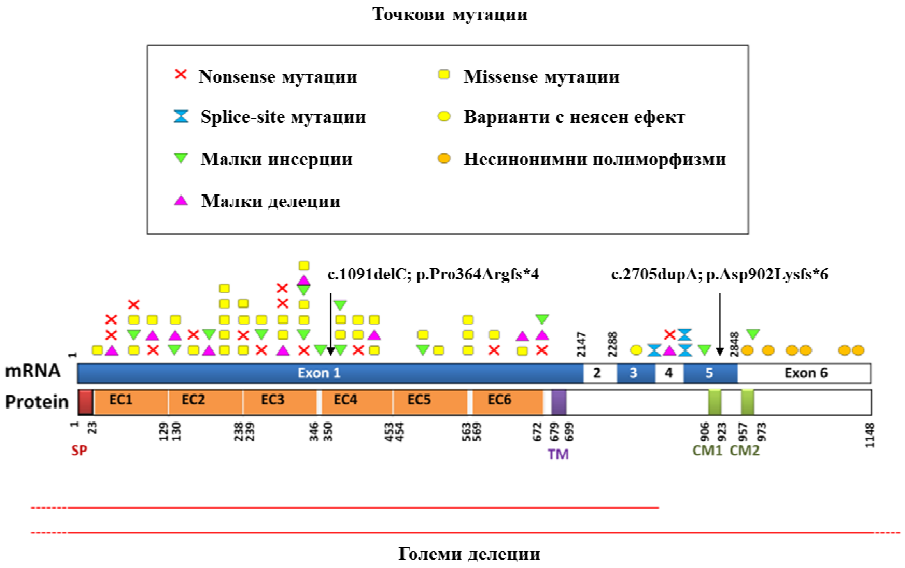
Дупликацията води до изместване рамката на четене – изместването започва от 108$^{-ма}$ аминокиселина (Leu). Новата рамка на четене генерира стоп сигнал 2 кодона downsream. Полученият РНК продукт с преждевременен стоп кодон се разгражда чрез нонсенс-опосредствано РНК разграждане.

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 53.



Фигура 53. 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 52 CM1) и е сред малкото дефекти, които са откривани в този домен.

Цитоплазматичните домени CM1 и CM2 като цяло са рядко засегнати от мутации и са разгледани подробно като генотип-фенотипни корелации (Таблица 18).

Всички описани в Таблица 18 мутации 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.

Таблица 18. Обобщени клинични данни на пациенти с доказана мутация в региона на цитоплазмените домени (CM1и CM2) на PCDH19 протеина.

Мутация в PCDH19 гена	**Възраст по време на проучването**	**Начало и тип на пристъпите**	**Последващи гърчове – тип и време на първа поява**	**Честота на пристъпите**	**Епилептичен изход**	**Когниция и поведение**	**Епилептичен синдром**	**Литературен източник**
c.2617-1G>Ap.?	2.5г	11м; фокална епилепсия	12м; SE, фокални пристъпи	Клъстери, дневни до месечни	Клъсетери, месечни	Лек ID, аутистично поведение	Фокална епилепсия	Marini et al., 2010
c.2675-6A>G; p.?	8г	6м; фокална епилепсия	5,5г; афебрилни, фокални пристъпи SE	Месечни клъстери – SE	Клъстери – годишни - SE	Среден ID, аутистично поведение	Фокална епилепсия	Marini et al., 2010
c.2697dupA; p.Glu900Argfs*8	11 mo	7м; фокална епилепсия	-	Отделни клъстери	Периоди свободни от пристъпи с продължителност 4м	Гранично	Фокална епилепсия	Marini et al., 2010
c.2705dupA; p.Asp902Lysfs*6	13г	5м: генерализирани тонично-клонични пристъпи	2г-генерализирани TS, TC; 6г - генерализирани TS, TC, AS;	Месечни клъстери 6-15 пристъпа на ден за период 2-4 дни (↑ fever)	Постепенно увеличаване на свободните от пристъпи дни (от 50-60дни на 6г.в. дп 6м на 8г.в.	Среден ID, аутистично и агресивно поведение		Настоящо проучване
c.2903dupA; p.Asp968Glufs*18	8г	19м; фебрилни пристъпи	20м: TC; фокална епилепсия	Клъстери, фебрилни гърчове	Свободен от пристъпи период – 4г	Пристъпи в клъстери, съпроводени с безпокойство и объркване	Фокална епилепсия	Marini et al., 2010
c.2656C>T; p.Arg886*	6г	11м фебрилни генерализирани тонично-клонични пристъпи	Фебрилни и афебрилни CTGS	Клъстери, фебрилни гърчове	Овладени пристъпи по време на лечение с фенобарбитал	Няма дефицит на внимание		Depienne et al., 2011

Съкращение: FS – фебрилни гърчове; AS – афебрилни гърчове; ID – интелектуален дефицит; SE - status epilepticus; TC – тонично-клонични гърчове; TS – тонични гърчове; GTCS – генерализирани тонично-клонични гърчове;

Мутацията, открита при пациент 11 – c.1091delC; p.Pro364Argfs*4 е разположена в екзон 1, кодиращ извънклтъчен домен 4 (Фигура 52, 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.

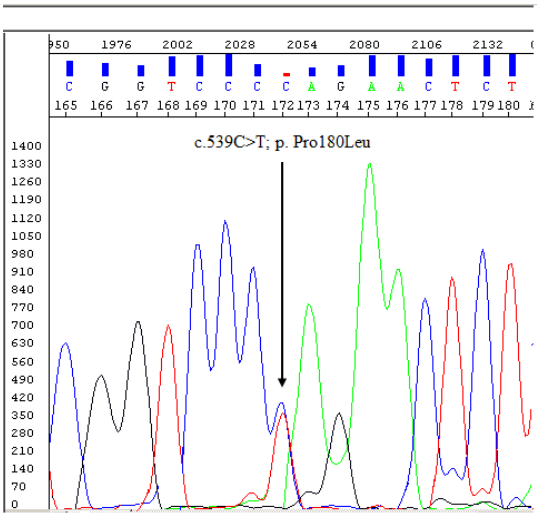
Случай III (пациент 14)

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 54).

DNA Level (cDNA):	**NM_003159.2:c.539C>T**
DNA Level (genomic):	**ChrX(GRCh37):g.18602458C>T**
Protein Level:	**p.Pro180Leu**
dbSNP:	**rs61749704**
Тип мутация	**Missense**

Секвенционният профил на генетичния дефект и софтуерната обработка са показани на Фигури 54.

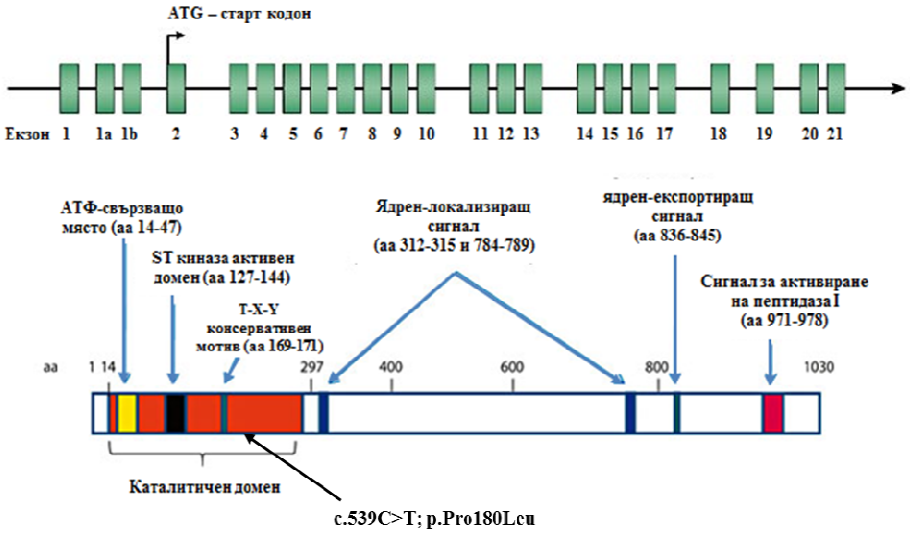


Фигура 54. Генетична последователност на част от *CDKL5* гена в региона на мутацията.



Фигура 55. Резултати от софтуерна обработка на мутацията c.539C>T; p.Pro180Leu в *CDKL5* гена - Interactive Biosoftware - Created by Alamut version 2.2e.

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 56).



Фигура 56. 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.

Получените резултати при изследваната група с EIEE бяха публикувани в международно списание – Pediatric Neurology, 2012 46(6):397-400.

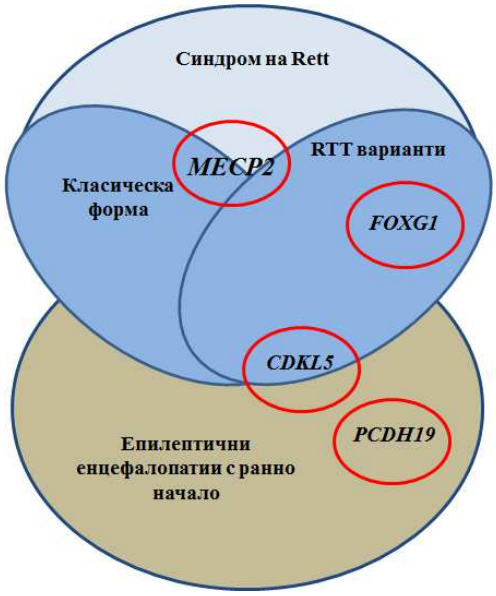
4.4. ОБОБЩЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Идиопатичната генерализирана епилепсия и синдромните епилепсии с ранно начало са изключително хетерогенни клинично и генетично. Клиничните симптоми често са трудни за обединяване в категории, като от една страна отделните заболявания имат сходна клиника, а от друга един и същи синдром може да се проявява в различни клинични варианти. Клиничната интерпретация често е затруднена и се налага провеждането на генетични изследвания с оглед прецизиране на диагнозата, подбор на правилна терапия и адекватна медико-генетична консултация на семейството.

От генетична гледна точка проблемът също не е лесен за решаване. Огромен (непрекъснато нарастващ) брой гени се асоциират с тези синдроми. Мутации в един и същи ген може да са свързани с различни заболявания с припокриваща се, но и специфична

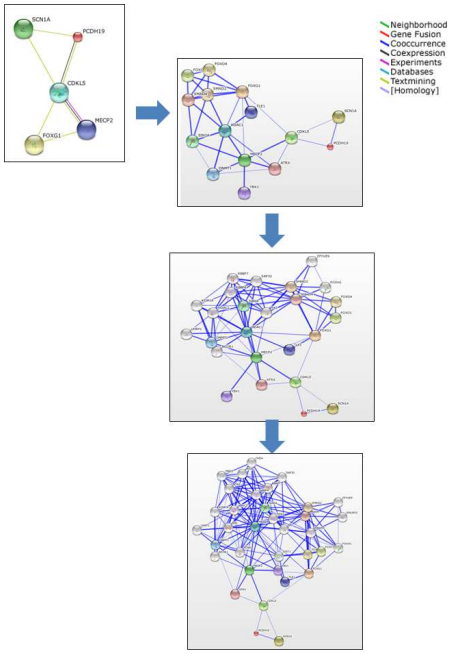
симптоматика (Фигура 57). Молекулярно-генетичните изследвания често са скъпи, трудоемки и нерядко се налага изследването на повече от един ген при конкретен пациент. Като цяло процентът на клинично верифицираните случаи с IGE и синдромни епилепсии с ранно начало е нисък. В нашето проучване успяхме да изясним 1% идиопатична генерализирана епилепсия чрез анализ на делеции в 15q13.3 хромозомен регион; 40% синдром на Rett чрез анализ на *MECP2* гена и 20% конгенитален RTT вариант чрез анализ на *FOXG1* гена; 20% епилептични енцефалопатии с ранно начало чрез анализ на гените *PCDH19* и *CDKL5*.

Останалите пациенти с неясна генетична причина подлежат на бъдещи клинични прекласификации съгласно непрекъснато променящите се критерии и представляват подходящ обект за допълнителни генетични изследвания. Комплексният подход към тази група заболявания е наложителен, като непрекъснато се ревизира и прецизира клиничната диагноза. Клиничната хетерогенност е пряко свързана с генетична хетерогенност като в допълнение се намесват епигенетични фактори. Натрупаните познания за взаимодействието на гените, както помежду им, така и с други гени, непрекъснато нарастват (Фигура 58).



Фигура 57. Клинично и генетично припокриване на изследваните клинични диагнози.

Това налага непрекъснато адаптиране на системния подход за молекулярно-генетични изследвания при дадена патология съгласно новите познания за генотип-фенотипните корелации.



Фигура 58. Схематично представяне на нарастващите познания за взаимодействията между гени свързани с епилепсия.

В настоящия дисертационен труд бяха проведени задълбочени молекулярно-генетични изследвания на редица гени и 15q13.3 хромозомен регион, бяха открити нови мутации и бяха разширени познанията ни върху генотип-фенотипни корелации, следвайки стриктно последните клинични класификации. Подробно бяха описани новоизяснените на молекулно ниво случаи, което даде ценни насоки за клиницистите при разпознаването на тези синдромни епилепсии, някои от които диагностицирани за пръв път в България. За генетиците бяха разработени алгоритми за системен подход на молекулярно-генетична диагностика с цел намаляване продължителността на изследванията до изясняване на молекулярно-генетичната причина. Охарактеризираните на молекулно ниво семейства получиха шанс за адекватна медико-генетична консултация и семейно планиране.

Получените резултати в настоящия дисертационен труд имат своя съществен принос за изясняване молекулните характеристики на някои синдромни епилепсии с ранно начало, както и ролята на микроделеции в хромозомен регион 15q13.3 за фенотипна изява на идиопатична генерализирана епилепсия.

5. 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 Х-инактивация при формиране на фенотипната изява.

6. БИБЛИОГРАФИЯ

6.1. БЪЛГАРСКА ЛИТЕРАТУРА:

1. Ив. Иванов, Ив. Литвиненко, Д. Христова, Л. Клаес, К. Клейс, А. Сулс, Л. Депре, Д. Ауденаерт, П. Юнг, А. Йорданова (2005) Първите български деца с GEFS+ синдром и синдром на Dravet с мутации в ген SCN1A (SCN1A мутации при GEFS+ и синдром на Dravet). Българска неврология 5(5): 311-316.

2. П. Димова, И. Йорданова, В. Божинова, А. Йорданова (2008) GEFS+: нова SCN1A мутация при двама братя с различна клинична картина. Българска неврология 8(3): 125-128.

3. П. Димова. (2010a) Синдром на Rett – клинични характеристики и диагностични критерии. Педиатрия 50(3): 6-10.

4. П. Димова. (2010b) Синдром на Rett – генетични характеристики и принципи на генетично изследване. Педиатрия 50(3): 11-13.

5. Сарайлиева Г., В. Божинова, Т. Тодоров, А. Тодорова, Д. Денева, В. Митев, П. Димова. Синдром на Rett – три случая с генетично потвърдена диагноза в България. Педиатрия 2010; 50 (3) 39-42.

6. Тодоров Т. (2011) Молекулни основи на синдроми с умствено изоставане в България, дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”.

6.2. ЧУЖДОЕЗИЧНА ЛИТЕРАТУРА (по азбучен ред):

1.Adler DA, Quaderi NA, Brown SD, Chapman VM, Moore J, Tate P. (1995) Disteche CM.The X-linked methylated DNA binding protein, Mecp2, is subject to X inactivation in the mouse. Mamm Genome 6(8):491-2.

2.Amir RE, Van den Veyver IB, Schultz R, Malicki DM, Tran CQ, Dahle EJ, Philippi A, Timar L, Percy AK, Motil KJ, Lichtarge O, Smith EO, Glaze DG, Zoghbi HY. (2000) Influence of mutation type and X chromosome inactivation on Rett syndrome phenotypes. Ann Neurol 47:670–679.

3.Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. Nat Genet. 23:185–188.

4.Appleton R. (2003) Aetiology of epilepsy and learning disorders: specific epilepsy syndromes; genetic chromosomal and sporadic syndromes. In: Trimble M, editor. Learning disability and epilepsy: an integrative approach. Guildford, UK: Clarius Press Ltd. p. 47–64.

5.Araud T, Graw S, Berger R, Lee M, Neveu E, Bertrand D, Leonard S. (2011) The chimeric gene CHRFAM7A, a partial duplication of the CHRNA7 gene, is a dominant negative regulator of α7*nAChR function. Biochem Pharmacol. 82(8):904-14.

6.Archer HL, Evans J, Edwards S, Colley J, Newbury-Ecob R, O'Callaghan F, Huyton M, O'Regan M, Tolmie J, Sampson J, Clarke A, Osborne J. (2006) CDKL5 mutations cause infantile spasms, early onset seizures, and severe mental retardation in female patients. J Med Genet 43:729-734.

7.Ariani F, Hayek G, Rondinella D, Artuso R, Mencarelli MA, Spanhol-Rosseto A, Pollazzon M, Buoni S, Spiga O, Ricciardi S, Meloni I, Longo I, Mari F, Broccoli V, Zappella M, Renieri A. (2008) FOXG1 is responsible for the congenital variant of Rett syndrome. Am J Hum Genet 83:89-93.

8.Artuso R, Mencarelli MA, Polli R, Sartori S, Ariani F, Pollazzon M, Marozza A, Cilio MR, Specchio N, Vigevano F, Vecchi M, Boniver C, Dalla Bernardina B, Parmeggiani A, Buoni S, Hayek G, Mari F, Renieri A, Murgia A. (2010) Earlyonset seizure variant of Rett syndrome: definition of the clinical diagnostic criteria. Brain Dev 32(1):17–24.

9. Bahi-Buisson N, Guellec I, Nabbout R, Guet A, Nguyen G, Dulac O, Chiron C. (2008a) Parental view of epilepsy in Rett syndrome. Brain Dev 30(2):126–30.

10. Bahi-Buisson N, Nectoux J, Rosas-Vargas H et al. (2008b) Key clinical features to identify girls with CDKL5 mutations. Brain 131(10):2647-61.

11. Barde, Y.A. (1989) Trophic factors and neuronal survival. Neuron 2, 1525–1534

12. Bebbington A, Anderson A, Ravine D, Fyfe S, Pineda M, de Klerk N, Ben-Zeev B, Yatawara N, Percy A, Kaufmann WE, Leonard H. (2008) Investigating genotype–phenotype relationships in Rett syndrome using an international data set. Neurology 70(11):868–75.

13. Bebbington A, Downs J, Percy A, Pineda M, Zeev BB, Bahi-Buisson N, Leonard H. (2012) The phenotype associated with a large deletion on MECP2. Eur J Hum Genet. 20(9):921-7.

14. Benbadis SR, Luders HO. (1996) Epileptic syndromes: an underutilized concept. Epilepsia 37:1029-1034.

15. Benbadis SR. (1999) Observations on the misdiagnosis of generalized epilepsy as partial epilepsy: causes and consequences. Seizure 8:140-145.

16. Benbadis SR. (2001) Epileptic seizures and syndromes. Neurologic Clinics 19:251-270.

17. Berkovic S, Benbadis SR. (2001) Childhood absence epilepsy and juvenile absence epilepsy. In: Wyllie E (ed). The treatment of epilepsy: Principles and practice. 3rd edition. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, pp. 485-490.

18. Bianchi A, Viaggi S, Chiossi E. (2003) Family study of epilepsy in first degree relatives: data from the Italian Episcreen Study. Seizures 12:203-10.

19. Binder DK, Croll SD, Gall CM, Scharfman HE. (2001) BDNF and epilepsy: too much of a good thing? Trends Neurosci. 24(1):47-53.

20. Biswas S, Emond MR, Jontes JD. (2010) Protocadherin-19 and N-cadherin interact to control cell movements during anterior neurulation. J Cell Biol 191(5):1029-41.

21. Buoni S, Zannolli R, Felice CD, Saponari S, Strambi M, Dotti MT, Castrucci E, Corbini L, Orsi A, Hayek J. (2008) Drugresistant epilepsy and epileptic phenotype-EEG association in MECP2 mutated Rett syndrome. Clin Neurophysiol 119(11):2455–8.

22. Carney RM, Wolpert CM, Ravan SA, Shahbazian M, Ashley-Koch A, Cuccaro ML, Vance JM, Pericak-Vance MA. (2003) Identification of MeCP2 mutations in a series of females with autistic disorder. Pediatr Neurol. 28:205–211.

23.Cheadle JP, Gill H, Fleming N, Maynard J, Kerr A, Leonard H, Krawczak M, Cooper DN, Lynch S, Thomas N, Hughes H, Hulten M, Ravine D, Sampson JR, Clarke A. (2000) Long-read sequence analysis of the MECP2 gene in Rett syndrome patients: correlation of disease severity with mutation type and location. Hum. Molec. Genet. 9: 1119-1129.

24.Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. (1989) Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Epilepsia 30(4):389-99.

25.Cooper RA, Kerr AM, Amos PM. (1998) Rett syndrome: critical examination of clinical features, serial EEG and video-monitoring in understanding and management. Eur J Paediatr Neurol 2(3):127–35.

26.Coppola G, Plouin P, Chiron C, Robain O, Dulac O. (1995) Migrating partial seizures in infancy: a malignant disorder with developmental arrest. Epilepsia 36(10):1017-24.

27.Coy JF, Sedlacek Z, Bächner D, Delius H, Poustka A. (1999) A complex pattern of evolutionary conservation and alternative polyadenylation within the long 3"-untranslated region of the methyl-CpG-binding protein 2 gene (MeCP2) suggests a regulatory role in gene expression. Hum Mol Genet 8(7):1253-62.

28.d'Orsi G, DemaioV. Minervini MG. (2009) Myoclonic status misdiagnosed as movement disorders in Rett syndrome: a video-polygraphic study. Epilepsy Behav 15(2):260–2.

29. Depienne C, Bouteiller D, Keren B, Cheuret E, Poirier K, Trouillard O, Benyahia B, Quelin C, Carpentier W, Julia S, Afenjar A, Gautier A, Rivier F, Meyer S, Berquin P, Hélias M, Py I,

Rivera S, Bahi-Buisson N, Gourfinkel-An I, Cazeneuve C, Ruberg M, Brice A, Nabbout R, Leguern E. (2009) Sporadic infantile epileptic encephalopathy caused by mutations in PCDH19 resembles Dravet syndrome but mainly affects females. PLoS Genet 5 e1000381.

30. Depienne C, Trouillard O, Bouteiller D, Gourfinkel-An I, Poirier K, Rivier F, Berquin P, Nabbout R, Chaigne D, Steschenko D, Gautier A, Hoffman-Zacharska D, Lannuzel A, Lackmy-Port-Lis M, Maurey H, Dusser A, Bru M, Gilbert-Dussardier B, Roubertie A, Kaminska A, Whalen S, Mignot C, Baulac S, Lesca G, Arzimanoglou A, LeGuern E. (2011) Mutations and deletions in PCDH19 account for various familial or isolated epilepsies in females. Hum Mutat 32:E1959-75.

31. DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, Trent JM. (1996) Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. Nature Genetics 14, 457–460.

32. D'Esposito M, Ciccodicola A, Gianfrancesco F, Esposito T, Flagiello L, Mazzarella R, Schlessinger D, D'Urso M. (1996) A synaptobrevin-like gene in the Xq28 pseudoautosomal region undergoes X inactivation. Nat Genet 13(2):227-9.

33. Dibbens LM, Kneen R, Bayly MA, Heron SE, Arsov T, Damiano JA, Desai T, Gibbs J, McKenzie F, Mulley JC, Ronan A, Scheffer IE. (2011) Recurrence risk of epilepsy and mental retardation in females due to parental mosaicism of PCDH19 mutations. Neurology 76:1514-9.

34. Dibbens LM, Tarpey PS, Hynes K, Bayly MA, Scheffer IE, Smith R, Bomar J, Sutton E, Vandeleur L, Shoubridge C, Edkins S, Turner SJ, Stevens C, O'Meara S, Tofts C, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Halliday K, Jones D, Lee R, Madison M, Mironenko T, Varian J, West S, Widaa S, Wray P, Teague J, Dicks E, Butler A, Menzies A, Jenkinson A, Shepherd R, Gusella JF, Afawi Z, Mazarib A, Neufeld MY, Kivity S, Lev D, Lerman-Sagie T, Korczyn AD, Derry CP, Sutherland GR, Friend K, Shaw M, Corbett M, Kim HG, Geschwind DH, Thomas P, Haan E, Ryan S, McKee S, Berkovic SF, Futreal PA, Stratton MR, Mulley JC, Gécz J. (2008) X-linked protocadherin 19 mutations cause female-limited epilepsy and cognitive impairment. Nat Genet 40:776–81.

35. Dimova PS, Yordanova I, Bojinova V, Jordanova A, Kremenski I (2010) Generalized epilepsy with febrile seizures plus: novel SCN1A mutation. Pediatr Neurol. 42(2):137-40.

36. Elia M, Falco M, Ferri R, Spalletta A, Bottitta M, Calabrese G, Carotenuto M, Musumeci SA, Lo Giudice M, Fichera M (2008) CDKL5 mutations in boys with severe encephalopathy and early-onset intractable epilepsy. Neurology 71(13):997-9.

37. Elmslie FV, Rees M, Williamson MP, Kerr M, Kjeldsen MJ, Pang KA, Sundqvist A, Friis ML, Chadwick D, Richens A, Covanis A, Santos M, Arzimanoglou A, Panayiotopoulos CP, Curtis D, Whitehouse WP, Gardiner RM. (1997) Genetic mapping of a major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q. Hum Mol Genet 6: 1329– 1334.

38.Emond MR, Biswas S, Jontes JD. (2009) Protocadherin-19 is essential for early steps in brain morphogenesis. Dev Biol 334(1):72-83.

39.Engel J Jr. (2001) A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. Epilepsia. Jun 42(6):796-803.

40.Engel J Jr; International League Against Epilepsy (ILAE). (2001) A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. Epilepsia 42(6):796-803.

41.Fabisiak K, Erickson RP. (1990) A familial form of convulsive disorder with or without mental retardation limited to females: extension of a pedigree limits possible genetic mechanisms. Clin Genet 38:353–8.

42.Flomen RH, Breen G, Collier D, St Clair D, Makoff AJ. (2006) Association study of CHRFAM7A copy number and 2 bp deletion polymorphisms with schizophrenia and bipolar affective disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 141: 571– 575.

43.Flomen RH, Davies AF, Di Forti M, Cascia CL, Mackie-Ogilvie C, Murray R, Makoff AJ. (2008) The copy number variant involving part of the alpha7 nicotinic receptor gene contains a polymorphic inversion. Eur J Hum Genet. 16, 1364–1371.

44.Frank M, Kemler R. (2002) Protocadherins. Curr Opin Cell Biol 14(5):557-62.

45.Gaitan Y, Bouchard M. (2006) Expression of the delta-protocadherin gene Pcdh19 in the developing mouse embryo. Gene Expr Patterns 6(8):893-9.

46. Glaze DG, Percy AK, Skinner S, Motil KJ, Neul JL, Barrish JO, Lane JB, Geerts SP, Annese F, Graham J, McNair L, Lee HS. (2010) Epilepsy and the natural history of Rett syndrome. Neurology 74(11):909–12.

47.Guideri F, Acampa M, Hayek G, Zappella M, Di Perri T. (1999) Reduced heart rate variability in patients affected with Rett syndrome. A possible explanation for sudden death. Neuropediatrics 30(3):146-8.

48.Hagberg B and Hadberg G. (1997) Rett syndrome: epidemiology and geographical variability. Eur Child Adolesc Psych 1:5-7.

49.Hagne I, Witt Engerstrom I, Hagberg B. (1989) EEG development in Rett syndrome. A study of 30 cases. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 72:1–6.

50.Hardwick SA, Reuter K, Williamson SL, Vasudevan V, Donald J, Slater K, Bennetts, B Bebbington A, Leonard H, Williams SR, Smith RL, Cloosterman D, Christodoulou J. (2007) Delineation of large deletions of the MECP2 gene in Rett syndrome patients, including a familial case with a male proband. Eur J Hum Genet 15:1218-1229.

51.Hauser WA, Annegers JF, Kurland LT. (1993) Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester,Minnesota: 1935:1984. Epilepsy 34: 453-68.

52. Helbig I, Mefford HC, Sharp AJ, Guipponi M, Fichera M, Franke A, Muhle H, de Kovel C, Baker C, von Spiczak S, Kron KL, Steinich I, Kleefuss-Lie AA, Leu C, Gaus V, Schmitz B, Klein KM, Reif PS, Rosenow F, Weber Y, Lerche H, Zimprich F, Urak L, Fuchs K, Feucht M, Genton P, Thomas P, Visscher F, de Haan GJ, Møller RS, Hjalgrim H, Luciano D, Wittig M, Nothnagel M, Elger CE, Nürnberg P, Romano C, Malafosse A, Koeleman BP, Lindhout D, Stephani U, Schreiber S, Eichler EE, Sander T. (2009) 15q13.3 microdeletion increase risk of idiopathic generalized epilepsy. Nat Genet 41(2):160-2.

53.Helbig I, Scheffer IE, Mulley JC, Berkovic SF. (2008) Navigating the channels and beyond: unraveling the genetics of the epilepsies. Lancet Neurol. 7, 231–245.

54.Hertel N, Redies C. (2011) Absence of layer-specific cadherin expression profiles in the neocortex of the reeler mutant mouse. Cereb Cortex 21(5):1105-17.

55.Hurles and Matthew. (2006) Recombination Hotspots in Nonallelic Homologous Recombination, Genomic Disorders: The Genomic Basis of Disease, pp. 341–355.

56.International Schizophrenia Consortium. (2008) Nature 455:237–241.

57.Juberg RC, Hellman CD. (1971) A new familial form of convulsive disorder and mental retardation limited to females. J Pediatr 79:726–32.

58.Junghans D, Haas IG, Kemler R. (2005) Mammalian cadherins and protocadherins: about cell death, synapses and processing. Curr Opin Cell Biol 17(5):446-52.

59.Kallioniemi A et al. (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science 258, 818–821.

60.Kankirawatana P, Leonard H, Ellaway C et al. (2006) Early progressive encephalopathy in boys and MECP2 mutations. Neurology 67:164–166.

61.Kerr AM, Armstrong DD, Prescott RJ, Doyle D, Kearney DL. (1997) Rett syndrome: analysis of deaths in the British survey. Europ Child Adolesc Psychiat 6 (suppl. 1): 71-74.

62.Kim SY, Chung HS, Sun W, Kim H. (2007) Spatiotemporal expression pattern of non-clustered protocadherin family members in the developing rat brain. Neuroscience 147(4):996-1021.

63.Kim SY, Mo JW, Han S, Choi SY, Han SB, Moon BH, Rhyu IJ, Sun W, Kim H. (2010) The expression of non-clustered protocadherins in adult rat hippocampal formation and the connecting brain regions. Neuroscience 170(1):189-99.

64.Kirchhoff M et al. (1998) Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals. Cytometry 31, 163–173.

65.Kleefstra T, Yntema HG, Oudakker AR, Romein T, Sistermans E, Nillessen W,van Bokhoven H, de Vries BBA, Hamel BCJ. (2002) De novo MECP2 frameshift mutations in a boy with moderate mental retardation, obesity and gynaecomastia. Clin Genet 61:359-362.

66.Krishna KK, Hertel N, Redies C. (2011) Cadherin expression in the somatosensory cortex: evidence for a combinatorial molecular code at the single-cell level. Neuroscience 175:37-48.

67.Lancman ME, Asconapé JJ, Penry JK. (1995) Juvenile myoclonic epilepsy: an underdiagnosed syndrome. J Epilepsy 8:215-218.

68.Laviolette S, van der Kooy D. (2004) The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour. Nature Reviews Neuroscience 5:55-65.

69. Lichter P, Joos S, Bentz M, Lampel S. (2000) Comparative genomic hybridization: Uses and limitations. Seminars in Hematology 37, 348–357.

70. Locke DP, Archidiacono N, Misceo D, Cardone MF, Deschamps S, Roe B, Rocchi M, Eichler EE.. (2003) Refinement of a chimpanzee pericentric inversion breakpoint to a segmental duplication cluster. Genome Biol 4: R50.1 – R50.9.

71.Lugtenberg D, Kleefstra T, Oudakker AR, Nillesen WM, Yntema HG, Tzschach A, Raynaud M, Rating D, Journel H, Chelly J, Goizet C, Lacombe D, Pedespan JM, Echenne B, Tariverdian G, O'Rourke D, King MD, Green A, van Kogelenberg M, Van Esch H, Gecz J, Hamel BC, van Bokhoven H, de Brouwer AP. (2009) Structural variation in Xq28: MECP2 duplications in 1% of patients with unexplained XLMR and in 2% of male patients with severe encephalopathy. Eur J Hum Genet 17(4):444-53. Erratum in: Eur J Hum Genet. 17(5):697.

72.Marini C, Mei D, Parmeggiani L, Norci V, Calado E, Ferrari A, Moreira A, Pisano T, Specchio N, Vigevano F, Battaglia D, Guerrini R. (2010) Protocadherin 19 mutations in girls with infantile-onset epilepsy. Neurology 75(7):646-53.

73.Meehan RR, Lewis JD, Bird A. (1992) Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. Nucleic Acids Res 20:5085-5092.

74.Melani F, Mei D, Pisano T, Savasta S, Franzoni E, Ferrari AR, Marini C, Guerrini R (2011) CDKL5 gene-related epileptic encephalopathy: elec- troclinical findings in the first year of life. Dev Med Child Neurol 53:354–360.

75.Morishita H, Yagi T. (2007) Protocadherin family: diversity, structure, and function. Curr Opin Cell Biol 19(5):584-92.

76.Moser SJ, Weber P, Lütschg J. (2007) Rett syndrome: clinical and electrophysiologic aspects. Pediatr Neurol 36(2):95–100.

77.Nabbout R, Dulac O. (2003) Epileptic encephalopathies: a brief overview. J Clin Neurophysiol. 20(6):393-7.

78.Neubauer BA, Fiedler B, Himmelein B, Kämpfer F, Lässker U, Schwabe G, Spanier I, Tams D, Bretscher C, Moldenhauer K, Kurlemann G, Weise S, Tedroff K, Eeg-Olofsson O, Wadelius C, Stephani U. (1998) Centrotemporal spikes in families with rolandic epilepsy: linkage to chromosome 15q14. Neurology 51: 1608– 1612.

79.Neul JL, Fang P, Barrish J, Lane J, Caeg EB, Smith EO, Zoghbi H, Percy A, Glaze DG. (2008) Specific mutations in methyl-CpG-binding protein 2 confer different severity in Rett syndrome. Neurology. 70:1313–1321.

80.Neul JL, Kaufmann WE, Glaze DG, Christodoulou J, Clarke AJ, Bahi-Buisson N, Leonard H, Bailey ME, Schanen NC, Zappella M, Renieri A, Huppke P, Percy AK; RettSearch Consortium. (2010) Rett syndrome: revised diagnostic criteria and nomenclature. Ann Neurol. 68(6):944-50.

81.Nissenkorn A, Gak E, Vecsler M, Reznik H, Menascu S, Ben Zeev B. (2010) Epilepsy in Rett syndrome - the experience of a National Rett Center. Epilepsia 51(7):1252–8.

82.Ottman R. (2005) Epilepsia 46(10):7–14.

83.Patel SD, Chen CP, Bahna F, Honig B, Shapiro L. (2003) Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family. Curr Opin Struct Biol 13(6):690-8.

84.Patel SD, Ciatto C, Chen CP, Bahna F, Rajebhosale M, Arkus N, Schieren I, Jessell TM, Honig B, Price SR, Shapiro L. (2006) Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity. Cell 124(6):1255-68.

85.Percy AK, Lane JB, Childers J, Skinner S, Annese F, Barrish J, Caeg E, Glaze DG, MacLeod P. (2007) Rett syndrome: North American database. J Child Neurol. 22:1338–1341.

86.Petrovsky N, Schmechtig A, Flomen RH, Kumari V, Collier D, Makoff A, Wagner M, Ettinger U. (2009) CHRFAM7A copy number and 2-bp deletion polymorphisms and antisaccade performance. Int J Neuropsychopharmacol. 12(2):267-73.

87.Philippe C, Villard L, De Roux N, Raynaud M, Bonnefond JP, Pasquier L, Lesca G, Mancini J, Jonveaux P, Moncla A, Chelly J, Bienvenu T. (2006) Spectrum and distribution of MECP2 mutations in 424 Rett syndrome patients: a molecular update. Eur J Med Genet 49(1):9-18.

88.Pintaudi M, Calevo MG, Vignoli A, Parodi E, Aiello F, Baglietto MG, Hayek Y, Buoni S, Renieri A, Russo S, Cogliati F, Giordano L, Canevini M, Veneselli E. (2010) Epilepsy in Rett syndrome: Clinical and genetic features. Epilepsy Behav 19(3):296– 300.

89.Rang HP. (2003) Pharmacology (5th ed.). Edinburgh: Churchill Livingstone

90.Ravn K, Nielsen JB, Skjeldal OH, Kerr A, Hulten M, Schwartz M. (2005) Large genomic rearrangements in MECP2. Hum Mut 25(3):324-329.

91.Redies C, Vanhalst K, Roy F. (2005) delta-Protocadherins: unique structures and functions. Cell Mol Life Sci 62(23):2840-52.

92.Reutens DC, Berkovic SF. (1995) Idiopathic generalized epilepsy of adolescence: are the syndromes clinically distinct? Neurology 45:1469- 1476.

93.Riley BP, Williamson M, Collier DA, Wilkie H, Makoff AJ. (2002) A 3Mb map of a large segmental duplication overlapping a7 nicotinic acetylcholine receptor gene (CHRNA7) at human 15q13– q14. Genomics 79: 197– 209.

94.Ryan SG, Chance PF, Zou CH, Spinner NB, Golden JA, Smietana S. (1997) Epilepsy and mental retardation limited to females: an X-linked dominant disorder with male sparing. Nat Genet 17(1):92-5.

95.Scala E, Ariani F, Mari F, Caselli R, Pescucci C, Longo I, Meloni I, Giachino D, Bruttini M, Hayek G, Zappella M, Renieri A. (2005) CDKL5/STK9 is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms. J Med Genet 42:103-107.

96. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science 270, 467–470.

97.Shaffer LG, Lupski JR. (2000) Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. Annual Review of Genetics 34, 297–329.

98.Sharp AJ, Mefford HC, Li K, Baker C, Skinner C, Stevenson RE, Schroer RJ, Novara F, De Gregori M, Ciccone R, Broomer A, Casuga I, Wang Y, Xiao C, Barbacioru C, Gimelli G, Bernardina BD, Torniero C, Giorda R, Regan R, Murday V, Mansour S, Fichera M, Castiglia L, Failla P, Ventura M, Jiang Z, Cooper GM, Knight SJ, Romano C, Zuffardi O, Chen C, Schwartz CE, Eichler EE. (2008) A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures.Nat Genet 40:322–328.

99.Sinkus M, Lee M, Gault J, Logel J, Short M, Freedman R, Christian S, Lyon J, Leonarda S. (2009) A 2-Base Pair Deletion Polymorphism in the Partial Duplication of the α7 Nicotinic Acetylcholine Gene (CHRFAM7A) on Chromosome 15q14 is Associated with Schizophrenia. Brain Res. 29; 1291: 1–11.

100.Stassen HH, Bridler R, Hägele S, Hergersberg M, Mehmann B, Schinzel A, Weisbrod M, Scharfetter C. (2000) Schizophrenia and smoking: evidence for a common neurobiological basis? Am J Med Genet; 96: 173– 177.

101. Stefansson H, Rujescu D, Cichon S, Pietiläinen OP, Ingason A, Steinberg S, Fossdal R, Sigurdsson E, Sigmundsson T, Buizer-Voskamp JE, Hansen T, Jakobsen KD, Muglia P, Francks C, Matthews PM, Gylfason A, Halldorsson BV, Gudbjartsson D, Thorgeirsson TE, Sigurdsson A, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Bjornsson A, Mattiasdottir S, Blondal T, Haraldsson M, Magnusdottir BB, Giegling I, Möller HJ, Hartmann A, Shianna KV, Ge D, Need AC, Crombie C, Fraser G, Walker N, Lonnqvist J, Suvisaari J, Tuulio-Henriksson A, Paunio T, Toulopoulou T, Bramon E, Di Forti M, Murray R, Ruggeri M, Vassos E, Tosato S, Walshe M, Li T, Vasilescu C, Mühleisen TW, Wang AG, Ullum H, Djurovic S, Melle I, Olesen J, Kiemeney LA, Franke B; GROUP, Sabatti C, Freimer NB, Gulcher JR, Thorsteinsdottir U, Kong A, Andreassen OA, Ophoff RA, Georgi A, Rietschel M, Werge T, Petursson H, Goldstein DB, Nöthen MM, Peltonen L, Collier DA, St Clair D, Stefansson K. (2008) Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. Nature 455:232–236.

102. Steffenburg U, Hagberg G, Hagberg B. (2001) Epilepsy in a representative series of Rett syndrome. Acta Paediatr 90:34–9.

103. Stein RA. (2009) An important risk factor in idiopathic generalized epilepsies. Clin Genet 76: 21-23.

104. Steven R. Laviolette & Derek van der Kooy. (2004) The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour. Nature Reviews Neuroscience 5:55-65.

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

106. Szafranski P, Schaaf CP, Person RE, Gibson IB, Xia Z, Mahadevan S, Wiszniewska J, Bacino CA, Lalani S, Potocki L, Kang SH, Patel A, Cheung SW, Probst FJ, Graham BH, Shinawi M, Beaudet AL, Stankiewicz P (2010). Structures and molecular mechanisms for common 15q13.3 microduplications involving CHRNA7: benign or pathological? Hum Mutat, 31(7):840-50.

107.Tai K, Kubota M, Shiono K, Tokutsu H, Suzuki ST. (2010) Adhesion properties and retinofugal expression of chicken protocadherin-19. Brain Res 1344:13-24.

108.Theisen, A. (2008) Microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH). Nature Education 1(1).

109.Todorov T, Todorova A, Avdjieva D, Dimova P, Angelova L, Tincheva R and Mitev V (2010) Clinical and molecular data on mental retardation in Bulgaria. Balkan Journal of Medical Genetics 13(2):11-25.

110.Todorov T, Todorova A, Motoescu C, Dimova P, Iancu D, Craiu D, Stoian D, Barbarii L, Bojinova V, Mitev V. (2012) Spontaneous recurrent mutations and a complex rearrangement in the MECP2 gene in the light of current models of mutagenesis. Mutat Res. 734(1-2):69-72.

111.Turecki G, Grof P, Grof E, D'Souza V, Lebuis L, Marineau C, Cavazzoni P, Duffy A, Bétard C, Zvolský P, Robertson C, Brewer C, Hudson TJ, Rouleau GA, Alda M. (2001) Mapping susceptibility genes for bipolar disorder: a pharmacogenetic approach based on excellent response to lithium. Mol Psychiatry 6: 570–578.

112.Vanhalst K, Kools P, Staes K, van Roy F, Redies C. (2005) delta-Protocadherins: a gene family expressed differentially in the mouse brain. Cell Mol Life Sci 62(11):1247-59.

113.Vilain A, Apiou F, Vogt N, Dutrillaux B, Malfoy B. (1996) Assignment of the gene for methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2) to human chromosome band Xq28 by in situ hybridization. Cytogenet Cell Genet 74(4):293-4.

114.Wan M, Lee SS, Zhang X, Houwink-Manville I, Song HR, Amir RE, Budden S, Naidu S, Pereira JL, Lo IF, Zoghbi HY, Schanen NC, Francke U. (1999) Rett syndrome and beyond: recurrent spontaneous and familial MECP2 mutations at CpG hotspots. Am J Hum Genet. 65:1520–1529.

115.Watson P, Black G, Ramsden S, Barrow M, Super M, Kerr B, Clayton-Smith J. (2001)Angelman syndrome phenotype associated with mutations in MECP2, a gene encoding a methyl CpG binding protein. J Med Genet. 38:224–228.

116. Wieland I, Jakubiczka S, Muschke P, Cohen M, Thiele H, Gerlach KL, Adams RH, Wieacker P. (2004) Mutations of the ephrin-B1 gene cause craniofrontonasal syndrome. Am J Hum Genet 74(6):1209-15.

117. Wolverton T, Lalande M. (2001) Identification and characterization of three members of a novel subclass of protocadherins. Genomics 76(1-3):66-72.

118. Yagi T, Takeichi M. (2000) Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. Genes Dev 14(10):1169-80.

119. Yordanova I, Todorov T, Dimova P, Hristova D, Tincheva R, Litvinenko I, Yotovska O, Kremensky I, Todorova A (2011) One novel Dravet syndrome causing mutation and one recurrent MAE causing mutation in SCN1A gene. Neurosci Lett. 494(2):180-3.

6.3. ИНТЕРНЕТ САЙТОВЕ:

1. http://genome.ucsc.edu

2. International Rett Syndrome Foundation (IRSF) MECP2 Variation Database: 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. International Rett Syndrome Foundation database - www.mecp2.chw.edu.au

8. The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff - http://www.hgmd.org/

9. Leiden Open Variation Database - http://www.lovd.nl

10. World Health Organization - Atlas: Epilepsy care in the world, 2005 - http://www.who.int/mental_health/neurology/Epilepsy_atlas_r1.pdf

7. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

● Публикации във връзка с дисертационния труд

1. 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

2. 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

3. 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.

4. А. Киров, Т. Тодоров, П. Димова2, Д. Авджиева, Р. Тинчева, И. Литвиненко, Г. Сарайлиева2, Д. Денева2, В. Божинова2, А. Тодорова, В. Митев. 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 P33; 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.

8. 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.

Приложение 1. Клинични и молекулярно-генетични данни за пациенти с RTT.

ID	Покрити критерии за типичен RTT	Критерии за атипичен RTT	MECP2	CDKL5	FOXG1	MLPA	Клинични данни
1-3	Не покрива критериите за RTT		✓	✓	✓	✓	Не говори, не може да се изправи сама, ЕЕГ без отклонения. Атаксична походка, Хипервентилация. Забавено НПР, без регрес до 1г.8м., когато прекарва остър ларингит и спира да говори. Следва леко подобрение, стереотипни движения на ръцете.
2-3	✓		c.473C>T				Изоставане в НПР още от кърмаческа възраст, не ходи, не говори, стереотипни движения на ръцете, атаксична походка (след 1г.) и гърчов синдром, хипервентилация.
3-3	НД	НД	✓	✓		✓	Регрес започва на 1г.8м. след имунизация. Микрогнатия, долихоцефалия. Няма епилепсия
4-3		✓	✓	✓		✓	Изоставане в ПМР, огнищна епилепсия от комплексни пристъпи в ЕЕГ. На 5 г. се проявява стереотипия на пръстите на ръцете
5-3	НД	НД	✓			✓	НД за епилепсия
6-3	Не покрива критериите за RTT		✓	✓		Xp-del (ARX, CDKL5-	Дискретен лицев дисморфизъм, хипоплазия на средната част на лицето, прогнатия, монголоидни

						del)	очни цепки, бегъл очен контакт. Няма епилепсия.
7-3	✓		c.808C>T				Чести парциални пристъпи с терапевтична резистентност, прогресиращ квадрипаретичен и церебеларен синдром, арахноидна киста в ляво, темпорално.
8-3	Не покрива критериите за RTT		✓			✓	1г.8м. говори си само, автоагресия, ЕЕГ-излишък на β-ритмика дифузно Няма епилепсия Посещава масово училище с ресурсен учител. Атипичен аутизъм.
9-3		✓	✓	✓		✓	На 10м. инфантилни спазми , след поставена имунизация, дифузна хипсаритмия в ЕЕГ, стереотипни движения на ръцете, регрес в развитието.
10-3	✓		✓	✓		✓	След овладяване на гърчовете се спира медикаментът и се проявява клиника типична за RTT, подновяване на приема на медикамента не помага.
11-3	НД	НД	✓			✓	НД за епилепсия
12-3	✓		✓			✓	НД за епилепсия
13-3	✓		c.1157_1200 del44				Изоставане в НПР. Малформативни стигми – високо готическо небце, лек двустранен епикант. Хипотония, чести стереотипии, хипервентилация Епилепсия
14-3		✓	✓	✓		✓	До 2 г. нормално ПМР, след това

							започват автоматизми на ръцете, агресия, дисморфичен фациес, високо небце, осъществява очен контакт.
15-3	✓		✓			✓	3м. гърчове – губи съзнание, свива ръце към тялото, вдига ръце и върти очи; ЕЕГ – генерализирана пероксизомална активност. Регрес в НПР, загуба на речеви речник.
16-3	✓		✓			✓	Няма епилепсия
17-3	✓		c.808C>T				Епилепсия
18-3	✓		c.880C>T				Симптоматична епилепсия
19-3		✓	✓			✓	Казва отделни думи, стереотипни движения на ръцете, дисморфични стигми, аутистично поведение, ЕЕГ – дифузни неспецифични промени в умерена до силна степен.
20-3	Не отговаря на критериите за RTT		✓			del 1p36	Аутизъм
21-3		✓	✓			✓	Аутизъм, Няма епилепсия
22-3		✓	✓			✓	На 6г. – ЯМР – промени в базални ганглии. На 10г. КТ-мозъчна атрофия, хипоинтензни лезии в базалните ядра. Екстрапирамидален синдром с непрестанни хореични и балистични хиперкинези на ръце и крака, които се засилват при възбуда и липса на сън. Особености: силно абнормално начално развитие; тежка постнатална

							микроцефалия преди 4м.;специфични двигателни абнормалности – резки движения на ръцете, дискинезии; на 9 м. фебрилен пристъп с втренчен поглед, стегната челюст и изпънати крайници, 1г.3м. втори непровокиран пристъп със същата клиника; кифосколиоза в тораколумбалния отдел; изразена мускулна атрофия.
23-3	✓		✓			Делеция на екзон 3 и част от екзон 4	Няма епилепсия
24-3		✓	✓			✓	Изоставане в ПМР, хипотония, атаксия, стереотипни движения на ръцете. Липсват данни за миогенна увреда, ЕЕГ – непрекъснато доминиране на алфа с честота 8,5 Hz при отворени очи.
25-3	✓		c.916C>T				НД за епилепсия
26-3 ✝		✓	✓	✓		✓	Автохипервентилация, полиморфни епилептични припадъци – абсансни, тонично-клонични
27-3		✓	✓			✓	Дисморфичен фациес-малформативни стигми, микроретрогнатия, високо небце, големи ушни миди. ЕЕГ-генерализирана пароксизомална активност от комплекси острие-бавна вълна с честота 2/сек.

							Родителите съобщават пристъпи – „обръщане на очите“, клюмване на главата напред за няколко сек., по това време пациентката е неконтактна.
28-3		✓	✓	✓	✓	✓	Няма епилепсия
29-3		✓	✓			✓	Изоставане в НПР след 2 г., намален речников запас, няма гърчове.
30-3	✓		✓	✓		✓	НД за епилепсия
31-3			✓			✓	Аутистично поведение, няма гърчове
32-3	✓		c.763C>T				Епилепсия
33-3	Покрива частично критериите за RTT, не покрива критерии за атипичен RTT		✓			✓	Вътремозъчни кръвоизливи двустранно, глава с правилна конфигурация, неврологичен статус в норма. ЕЕГ-силно неритмична, лошо диференцирана по корови области основна активност.
34-3	✓		✓	✓		✓	НД за епилепсия
35-3	✓		✓			✓	НД за епилепсия
36-3	✓		✓			Делеция на екзон 3 и част от екзон 4	НД за епилепсия
37-3	Не покрива критериите за RTT		✓			✓	Аутизъм, справя се добре в училище, но с помощта на родителите. Общува, но избягва очен контакт. ЕЕГ – силно дизритмична активност. Малки групи от относително ритмична алфа. Пръснати нискоамплитудни остри вълни без оформяне на определено огнище.

38-3	✓		c.[584_624del 41ins TT;638delTins CA]				Няма епилепсия
39-3		✓	✓				Епилепсия
40-3	✓		c.763 C>T				Епилепсия
41-3		✓	✓			✓	Епилепсия
42-3	✓		✓			✓	Епилепсия
43-3	✓		c.808C>T				НД за епилепсия
44-3		✓	✓			✓	Забавяне в развитието, не говори; на 10м. епизоди по време на следобеден сън, съпроводени с отваряне на очи, втренчване, потреперване на ръцете. След тази възраст, зачестяват пристъпите. ЕЕГ-високоволтажна бавна артефактна активност в задните области, по-често симетрично, отговарящи на ритмично движение на тялото нагоре и надолу. Не са наблюдавани пристъпи в будно състояние. ЕЕГ в норма, без данни за интериктални/иктални епилептиформени прояви
PWS14-3		✓	c.318_321dup GAAG				Епилепсия
45-3		✓	✓			✓	На 3 г. епилептични спазми, фокални пристъпи, изоставане в развитието, генерализирана хипотония, микроцефалия, липса на контакт
46-3		✓	✓		✓	✓	Изоставане в психомоторно развитие от 5 м., пристъпи от 3 м.,

							микроцефалия, няма целево използване на ръцете.
47-3	✓		✓			✓	На 13г. епилепсия, микроцефалия, тежък интелектуален дефицит, спастични тетрапарези. Няма данни за ранното развитие
48-3		✓	✓			✓	1г.2м. - стереотипни фрази и движение на ръцете, автоагресия, генерализирани тонично-клонични пристъпи по време на сън, ЕЕГ за Роландово огнище в дясно.
49-3		✓	✓	✓		✓	1г.2м. – изоставане в НПР, пароксизомална активност, пристъпи от 7м., епилептични спазми, липса на очен контакт, стереотипни движения на ръцете, няма данни за микроцефалия
50-3		✓	c.473C>T				НД за епилепсия
51-3	✓		c.880C>T				Епилепсия
52-3	✓		c.763C>T				Епилепсия
53-3		✓	✓		✓	✓	НД за епилепсия
54-3		✓	c.916C>T				Епилепсия
55-3	✓		✓			✓	Няма епилепсия
56-3	✓		c.502C>T				Епилепсия
57-3		✓	✓			✓	Отговаря на клиничните симптоми на RTT със запазена реч.
58-3	✓		✓			✓	Няма епилепсия
59-3	✓		c.473C>T				Епилепсия
60-3	✓		c.27- 8C>G				Епилепсия
61-3	✓		c.473C-T				Епилепсия
62-3	✓		c.806del G				Епилепсия
63-3		✓	✓			✓	Пристъпи от 5г., микроцефалия,

							интелектуален дефицит, спастичност, прохожда на 5г., не говори, стереотипни движения на ръцете, амиотрофичност на долни крайници, закъснение в миелинизацията на бялото мозъчно вещество.
64-3	✓		c.502C>T				Епилепсия
65-3	✓		c.808C>T				Епилепсия
66-3	✓		✓ .			✓	Няма епилепсия
67-3	✓		c.316C-T				НД за епилепсия
68-3	НД	НД	✓ .			✓	НД за епилепсия
69-3	✓		c.502C>T				НД за епилепсия
70-3	НД	НД	c.1157_1197del41				НД за епилепсия
71-3		✓ Конгенитален RTT вариант	✓		c.406G>T		Подробна клиника е поместена в глава резултати и обсъждане (стр. 103).
72-3	НД	НД	c.819del G				НД за епилепсия
73-3	НД	НД	✓		✓	✓	НД за епилепсия
74-3	НД	НД	✓			✓	НД за епилепсия
75-3	✓		c.316C>T				Няма епилепсия
75-6	✓		✓				Няма епилепсия

Използвани съкращения и знаци: НПР – нервно-психично развитие; НД – няма данни; ✝ - пациентката е починала

Приложение 2. Клинични и молекулярно-генетични данни за пациенти с EEIE.

Пациент	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Пол	ж	ж	ж	ж	ж	ж	ж	ж	ж	ж
Възраст	14 г	10г	7г 6м	4г	12г	12г	11г	5г	4г	12г
Начало на епилептичните пристъпи	5м	8м	3г	50 дни	3м	7г	5г	13м	11м	3г
Фебрилна провокация	✓	✓	×	×	✓	×	✓	✓	✓	✓
Генерализирани тонично-клонични пристъпи	✓	✓	✓	×	✓	✓	✓			✓
Унилатерални пристъпи		✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	
Други пристъпи:										
- Прости фокални моторни				✓		✓		✓	✓	
- Епилептични спазми			✓	✓						✓
- Комплексни парциални			✓			✓	✓			
- Миоклонични						✓				✓
- Тонични	✓	✓	✓			✓				✓
- Абсансни (вкл. Атипични)			✓			✓		✓	✓	✓
Пристъпи в клъстери	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓
Status epilepticus	✓			✓		✓	✓	✓	✓	✓
Photosensitivity	×	×	×	×	×	×	×	×	×	✓
Интелектуален дефицит	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	×	×	✓
Изоставане в говорното развитие	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Аутистично поведение	✓	×	✓	×	×	✓	×	×	×	×
Изоставане в моторното развитие	×	✓	×	✓	✓	×	×	×	×	×
Атаксия	×	✓	×	✓	✓	✓	×	×	×	✓
Дисморфизъм	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
Микроцефалия	×	✓	×	✓	×	×	×	×	×	
МРТ	негативен	атрофия	негативен	FCD	негативен	атрофия	×	×	×	
Фамилност	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

Пациент	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**
Пол	ж	ж	ж	ж	ж
Възраст	3г 6м	4г 6м	19г	12г 10м	4г
Начало на епилептичните пристъпи	от раждането	10м	16м	2г	13м
Фебрилна провокация	не	✓	✓	✓	✓
Генерализирани тонично-клонични пристъпи	не	✓	✓	✓	✓
Унилатерални пристъпи	✓	✓		✓	✓
Други пристъпи:					
- Прости фокални моторни		✓			
- Епилептични спазми					
- Комплексни парциални		✓			
- Миоклонични			✓	✓	✓
- Тонични			✓	✓	✓
- Абсансни (вкл. Атипични)			✓		
Пристъпи в клъстери		✓	✓	✓	✓
Status epilepticus	✓	✓		✓	✓
Photosensitivity	×	×	✓	×	×
Интелектуален дефицит	✓	✓	✓	✓	✓
Изоставане в говорното развитие	✓	✓	×	✓	✓
Аутистично поведение		×	×	×	×
Изоставане в моторното развитие	✓	✓	×	✓	✓
Атаксия	✓	×	×	✓	✓
Дисморфизъм	✓	×	×	✓	✓
Микроцефалия	✓	✓	×	✓	✓
МРТ	атрофия	негативен	негативен	негативен	негативен
Фамилност	×	×	×	×	×