

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

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

ВАЛЕНТИНА ЛЮБЕНОВА ПЕЙЧЕВА

**ДИСЕРТАЦИЯ ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И
НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“**

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

ДОКТОРСКА ПРОГРАМА: „МОЛЕКУЛЯРНА БИОЛОГИЯ”

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:

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

София, 2019 г.

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

Цитирани са 393 литературни източника и 19 интернет сайта.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от катедра Медицинска Химия и Биохимия към Медицински факултет на Медицински университет – София съгласно правилника за условията и реда на придобиване на придобиване на научни степени в МУ - София на 13.12.2018г.

Публичната защита на дисертационният труд ще се проведе на 25.03.2019г.

Всички изследвания по дисертационния труд са извършени в Центъра по Молекулна Медицина, Катедра Медицинска Химия и Биохимия, МФ, МУ – София.

Благодарности

Изказвам благодарности на научните си ръководители акад. проф. Ваньо Митев и проф. д-р Радка Кънева за предоставената ми възможност и условия за изработване на дисертационния ми труд. Благодаря им за доверието и напътствията, които получих.

Бих искала да изкажа сърдечни благодарности на д-р Невяна Иванова и д-р Кунка Каменарова, както и на всички колеги от Центъра по Молекулна Медицина, чийто съвети, морална подкрепа и помощ бяха изключително ценни за мен.

Благодарна съм на всички насочващи лекари-колаборатори – на проф. д-р В. Божинова от Клиника по Детска Неврология „Св.Наум“, на проф. д-р И. Търнев от Университетска болница „Александровска“, на проф. д-р И. Иванов и доц. д-р И. Пачева от Клиника по педиатрия и генетични болести, УМБАЛ „Св.Георги“ в Пловдив, на екипа на проф. д-р И. Литвиненко от Детска неврологична клиника СБАЛДБ „Проф.Иван Митев“ и другите лекари, без които изработването на този труд не би бил възможен.

Благодаря на семейството си - на съпруга ми, на майка ми и брат ми за подкрепата, за непрекъснатата вяра в мен, за търпението, насърченията и любовта.

Използвани съкращения на кирилица:

АД	Автозомно - Доминантен
АЕМ	АнтиЕпилептични Медикаменти
АР	Автозомно - Рецесивен
АК	АминоКиселина
ЕЕ	Епилептична Енцефалопатия
ЕЕГ	ЕлектроЕнцефалоГрафия
ГГЕ	Генетична Генерализирана Епилепсия
ГТКП	Генерализирани Тонично – Клонични Пристъпи
ГФЕ	Генетични Фокални Епилепсии
ДНК	ДезоксиРибонуклеинова Киселина
ИД	Интелектуален Дефицит
КТ	Компютърна Томография
МОН	Министерство на Образованието и Науката
НПР	Невро-Психологическо Развитие
РНК	Рибонуклеинова Киселина
кДНК	комплементарна ДНК
ЦММ	Център по Молекулна Медицина
ЦНС	Централна Нервна Система
ЯМР	Ядрено-Магнитен Резонанс

Използвани съкращения на латиница:

aCGH	array Comparative Genomic Hybridization – микрочипова Сравнителна Геномна Хибридизация
ACMG	American College of Medical Genetics - Американски Колеж по Медицинска Генетика
ADHD	Attention Deficit Hyperactivity Disorder- Синдром на дефицит на вниманието с хиперактивност
ADNFLE	Autosomal Dominant Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy - автозомно-доминантна нощна фронтално- дялова епилепсия
ASD	Autism Spetrum Disorders – болести от аутистичния спектър
BACs	Bacterial Artificial Chromosomes – Бактериални изкуствени хромозоми
BECTS	Benign Epilepsy with Cetro- Temporal Spikes – Бенигнена детска епилепсия с центро темпорални пики
BFIC	Benign Familial Infantile Convulsions – Бенигнени Фамилни Инфантилни Конвулсии
BFNC	Benign Familial Neonatal Convulsions - Бенигнени Фамилни Неонатални Конвулсии
BFNIC	Benign Familial Neonatal Infantile Convulsions - Бенигнени Фамилни Неонатално- Инфантилни Конвулсии
BP	BreakPoints – точки на счупване
bp	base pairs – базови двойки
CES	Clinical Exome Sequencing – Клинично Екзомно Секвениране
FS+	Febrile Seizures +; Фебрилни Гърчове плюс
GEFS+	Generalized Epilepsy with Febrile Seizures +, Генерализирана Епилепсия с Фебрилни Гърчове плюс
DS	Dravet Syndrome - Синдром на Драве
GLUT1	GLUT1 Deficiency Syndrome - Синдром на Дефицит на глюкозния транспортер GLUT1
DS	
MAE	Myoclonic Astatic Epilepsy - Миоклонично-Астатична Епилепсия
CAE	Childhood Absence Epilepsy- Детска абсансна епилепсия
CNVs	Copy Number Variations – Промени в броя копия
DLR	Derivative Log Ratio
DMSO	DiMethyl SulfOxide - Диметил сулфоксид
dNTPs	deoxyriboNucleotide TriPhosphates – Дезоксирибонуклеотид трифосфати
ddNTP	DideoxyNucleotide TriPhosphates - Дидезоксинуклеотид трифосфати
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid – Етилен диамин тетраоцетна киселина
EEI7	Epileptic Encephalopathy Early Infantile 7 – Ранна детска епилептична енцефаопатия 7
EOAE	Early Onset Absence Epilepsy – Детска абсансна епилепсия с ранно начало
FISH	Fluorescent in situ Hybridization – Флуоресцентна ин ситу Хибридизация

FoSTeS	Fork Stalling and Template Switching - прекъсване на репликационната вилка и смяна на матрицата
GABA	Gamma-Aminobutyric Acid – гама аминомаслена киселина
NEE	Neonatal Epileptic Encephalopathy - Неонатална епилептична енцефалопатия
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction - Количествена Полимеразна Верижна Реакция в реално време
MLPA	Multiplex Ligation- dependent Probe Amplification - Мултиплексен амплификационен анализ на лигирани проби
ILAE	International League Against Epilepsy - Международна лига за борба с епилепсията
ISCA	International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium - Международен Консорциум за Стандартизиране на Цитогеномни Данни
IQ	Intelligence Quotient – Коефициент на Интелигентност
JAE	Juvenile Absence Epilepsy – Ювенилна абсансна епилепсия
JME	Juvenile Myoclonic Epilepsy – Ювенилна миоклонична епилепсия
Kb	Kilobase - Килобаза
LCRs	Low Copy Repeats - нискокопийни повторени последователности
LOH	Loss of Heterozygosity – загуба на хетерозиготност
Mb	Megabase - Мерабаза
MELAS	Myoclonic Epilepsy with Lactic Acidosis and Stroke-like episodes – Миоклонична епилепсия с лактатна ацидоза и подобни на инсулт епизоди
MMBIR	Microhomology-Mediated Break-Induced Replication - микрохомология- медирана индуцирана от прекъсвания репликация
NAHR	Nonallelic Homologous Recombination – неалелна хомоложна рекомбинация
NHEJ	NonHomologous End Joining – нехомоложно снаждане на краища
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PACs	P1 artificial chromosomes – Бактериофаг P1 изкуствени хромозоми
PED	Paroxysmal Exertion-induced Dyskinesia – Пароксизмална дискинезия, индуцирана от физически упражнения
RQ	Relative Quantification – Относително количествено определяне
SA	Specific Activity – Специфична активност на белязване
SE	Status Epilepticus – статус епилептикус
SKY	Spectral karyotyping – Спектрално кариотипиране
SMEB	Severe Myoclonic Epilepsy of infancy, Borderline – Тежка миоклонична епилепсия в детството, гранично състояние
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms – еднуклеотидни полиморфизми
SNR	Signal to Noise Ratio
SNVs	Single Nucleotide Variants – еднуклеотидни варианти
UCS	Unknown Clinical Significance – неясно клинично значение
UCSC	University of California Santa Cruz – Университет Санта Круз в Калифорния
UPD	UniParental disomy - унипарентна дизомия
WES	Whole Exome Sequencing – Цялостно Екзомно Секвениране
WGS	Whole Genome Sequencing- Цялостно Геномно Секвениране

Съдържание:

1. Литературен обзор	1
1.1. Класификация на епилепсиите според етиологията им	2
1.1.1. Генетична епилепсия	2
1.1.2. Структурно–метаболитна епилепсия	2
1.1.3. Епилепсия с неизяснена причина	2
1.2. Класификация на епилептичните пристъпи	3
1.2.1. Фокални пристъпи	3
1.2.2. Генерализирани пристъпи	4
1.2.2.1. Генерализирани пристъпи с моторно начало	4
1.2.2.2. Генерализирани пристъпи без моторно начало	4
1.2.3. Епилептичен статус (Status epilepticus, SE)	5
1.2. Генетична (идиопатична) генерализирана и фокална епилепсия	5
1.3. Фебрилно – провокирани пристъпи и епилептични синдроми	7
1.3.1. Фебрилни гърчове и фебрилни гърчове плюс (FS/FS+)	7
1.3.2. Синдром на генерализирана епилепсия с фебрилни гърчове плюс (Generalized Epilepsy with Febrile Seizures +, GEFS+)	7
1.3.3. Тежка миоклонична епилепсия в детството (Dravet syndrome, DS)	8
1.3.4. Миоклонично – астатична епилепсия (Myoclonic Astatic Epilepsy, MAE, синдром на Doose)...	8
1.3.5. Молекулни дефекти в ген <i>SCN1A</i>	9
1.4. Бенигнени фамилни неонатални, неонатално–инфантилни и инфантилни конвулсии	12
1.4.1. Молекулни дефекти в ген <i>KCNQ2</i>	13
1.5. Абсансни епилепсии	15
1.5.1. Синдром на GLUT1 дефицит (GLUT1 deficiency syndrome, GLUT1-DS)	16
1.5.2. Молекулни дефекти в ген <i>SLC2A1</i>	17
1.6. Комплексни форми на епилепсия	18
1.6.1. Епилептични енцефалопатии (EE)	18
1.6.2. Промени в броя копия като причина за изява на ГГЕ/ЕЕ. Микроделеционни и микродупликационни синдроми	19
1.6.3. Фенотипна хетерогенност (плейотропия)	21
1.7. Механизми на възникване на промените в броя копия (Copy Number Variations, CNVs)	23
1.7.1. Неалелна хомоложна рекомбинация (Nonallelic Homologous Recombination, NAHR)	24
1.7.2. Нехомоложно снаждане на краища (NonHomologous End Joining, NHEJ)	24
1.7.3. Прекъсване на репликационната вилка и смяна на матрицата (Fork Stalling and Template Switching, FoSTeS) и микрохомология - медирана индуцирана от прекъсване репликация (Microhomology - Mediated Break - Induced Replication, MMBIR)	25
1.8. Ефект на вариациите в броя копия върху фенотипа	26
1.9. Методи за идентифициране на CNVs	28
1.9.1. Флуоресцентна ин ситу хибризация (Fluorescence In Situ Hybridization, FISH)	28
1.9.2. Количествен PCR в реално време (qPCR)	29
1.9.3. Мултиплексен амплификационен анализ на лигирани проби (Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification, MLPA)	29
1.9.4. Микрочипова сравнителна геномна хибризация (array Comparative Genomic Hybridization, aCGH)	30
1.9.5. Секвениране от ново поколение (Next Generation Sequencing, NGS)	33
1.10. Критерии за оценка и класификация на откритите варианти в генома	35
1.10.1. Оценка на патогенността и класификация на откритите еднуклеотидни варианти	35
1.10.2. Критерии за оценка и класификация на вариациите в броя копия	39
2. Цел и задачи	43
2.1. Цел	43
2.2. Задачи	43
3. Материали и методи	44
3.1. Клиничен материал	44
3.2. Биологични проби	45
3.3. Преданалитична обработка на пробите	45
3.3.1. Изолване на ДНК чрез полуавтоматична система CHEMAGEN® Magnetic Separation Station (Perkin Elmer)	45
3.3.2. Проверка на качеството на ДНК	47

3.3.2.1. Агарозна електрофореза.....	47
3.3.2.2. Спектрофотометрично определяне на количеството и качеството на ДНК с помощта на NanoDrop (Thermo Scientific).....	47
3.4. Аналитична обработка на биологичния материал.....	47
3.4.1. Намножаване на фрагменти ДНК чрез полимеразна верижна реакция (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	47
3.4.2. Качествен контрол на PCR реакцията.....	50
3.4.2.1. Хоризонтална агарозна електрофореза.....	50
3.4.3. Директно секвениране (Секвениране по Sanger).....	51
3.4.4. Мултиплексен амплификационен анализ на лигирани проби (MLPA).....	53
3.4.5. Микрочипов анализ чрез метода на сравнителна геномна хибризация (aCGH).....	57
3.4.6. Потвърдителен и сегрегационен PCR в реално време (qPCR) на откритите чрез aCGH аберации.....	63
3.4.7. Биоинформатичен анализ на получените резултати.....	66
3.4.7.1. Биоинформатичен анализ на резултатите от директното секвениране.....	66
3.4.7.2. Биоинформатичен анализ на резултатите, получени от MLPA анализа.....	68
3.4.7.3. Биоинформатичен анализ на резултатите, получени от микрочиповия анализ.....	68
4. Резултати.....	71
4.1. Резултати от секвенционния анализ на <i>SCN1A</i> гена.....	71
4.1.1. Клиничен материал.....	71
4.1.2. Молекулярно – генетично изследване.....	72
4.1.3. Патогенни варианти в <i>SCN1A</i> гена.....	75
4.1.3.1. Патогенни варианти, докладвани в литературните източници и бази-данни.....	75
4.1.3.2. Патогенни варианти, несъобщени в литературните източници.....	79
4.1.4. Варианти с вероятно патогенен ефект.....	82
4.1.5. Варианти с вероятно непатогенен ефект.....	85
4.1.5.1. Рекурентни варианти с вероятно непатогенен ефект.....	86
4.1.5.2. Нерекурентни варианти с вероятно непатогенен ефект.....	89
4.2. Резултати от MLPA анализа на <i>SCN1A</i> гена.....	91
4.3. Резултати от секвенционния анализ на <i>SLC2A1</i> гена.....	91
4.3.1. Клиничен материал.....	91
4.3.2. Молекулярно-генетично изследване.....	92
4.4. Резултати от MLPA анализа на <i>SLC2A1</i> гена.....	94
4.5. Резултати от секвенционния анализ на <i>KCNQ2</i> гена.....	94
4.5.1. Клиничен материал.....	94
4.5.2. Молекулярно – генетично изследване.....	95
4.6. Резултати от MLPA анализа на <i>KCNQ2</i> гена.....	97
4.7. Резултати от микрочиповия анализ.....	98
4.7.1. Подбор на пациенти.....	98
4.7.2. Молекулярно-генетично изследване.....	100
4.7.2.1. Патогенни хромозомни микроаберации.....	102
4.7.2.2. Аберации с неясно клинично значение и вероятно патогенен ефект.....	109
5. Обсъждане.....	116
5.1. Обсъждане на резултатите от секвенционния анализ на <i>SCN1A</i> гена.....	116
5.1.1. Патогенни варианти, докладвани в литературните източници и бази-данни.....	117
5.1.2. Нови варианти, с очакван патогенен ефект, недокладвани в литературните източници и бази-данни.....	122
5.1.3. Варианти с вероятно патогенен ефект.....	125
5.1.4. Варианти с вероятно непатогенен ефект.....	130
5.1.4.1. Рекурентни варианти с вероятно непатогенен ефект.....	131
5.1.4.2. Нерекурентни варианти с вероятно непатогенен ефект.....	133
5.2. Обсъждане на резултатите от секвенционния анализ на <i>SLC2A1</i> гена.....	135
5.3. Обсъждане на резултатите от секвенционния анализ на <i>KCNQ2</i> гена.....	137
5.4. Обсъждане на резултатите от MLPA анализа на <i>SCN1A</i> , <i>SLC2A1</i> и <i>KCNQ2</i> гените.....	141
5.4.1. Обсъждане на резултатите от MLPA анализа на <i>SCN1A</i> гена.....	141
5.4.2. Обсъждане на резултатите от MLPA анализа на <i>SLC2A1</i> гена.....	141

5.4.3. Обсъждане на резултатите от MLPA анализа на <i>KCNQ2</i> гена.....	141
5.5. Обсъждане на резултатите от микрочиповия анализ.....	143
5.5.1. Патогенни хромозомни микроаберации.....	147
5.5.2. Аберации с неясно клинично значение и вероятно патогенен ефект.....	159
6. Изграждане на диагностичен алгоритъм при пациенти с различни форми на епилепсия, или неизяснена диагноза, включваща епилепсия в комбинация с интелектуален дефицит и други вродени аномалии.....	167
7. Обобщение.....	169
8. Изводи.....	171
9. Приноси.....	172
9.1. Приноси с научно - фундаментален характер.....	172
9.2. Приноси с научно - приложен характер.....	172
10. Публикации във връзка с дисертационния труд.....	173
11. Научни прояви във връзка с дисертационния труд.....	174
12. Участия в проекти.....	176
Библиография.....	177
Приложения.....	203

1. Литературен обзор

Епилепсията е най-честото неврологично заболяване, засягащо приблизително 3% от популацията в световен мащаб. Характеризира се с наличие на рекурентни непровокирани пристъпи, които са резултат от хипервъзбудимост на невроните и нарушена синхронизация на предаването на нервния импулс. При епилепсията е нарушен баланса между възбудните и подтискащи процеси в невронни популации в различни мозъчни райони. Епилептичните пристъпи настъпват поради свръхмерна и асинхронна невронна активност, която се разпространява в невронни мрежи, обхваща различни участъци от мозъчната кора и/или подлежащите структури и определя характеристиката на пристъпите.

Заболяването представлява изключително значим здравен и социален проблем в световен мащаб, тъй като повлиява както здравето, така и качеството на живот в засегнатите индивиди и техните семейства. Епилепсията е най - честа сред децата със заболяемост в световната популация около 70/100 000 деца на възраст под 2 години (1,2). Средната заболяемост е 45 на 100 000 население за високодоходните държави и 81,7/100 000 в останалите държави. У нас болните с епилепсия са около 50 000 (3). Общата смъртност от епилепсия при хората в развитите страни е от два до пет пъти по – висока, отколкото в общата популация (4), но в нискодоходните страни може да бъде с до 37 пъти по - висока, особено при децата (5).

Честотата на детската епилепсия е най - висока през първата година от живота, като най - често е резултат от метаболитни или структурни дефекти в мозъка. Част от новородените обаче имат ясно очертани епилептични синдроми, за които няма друга причина освен възможно генетично предразположение. При 50-60% от болните епилепсията започва преди 16-годишна възраст. Фебрилни гърчове получават 2 - 5% от децата до 5-годишна възраст (3). Епилепсията и свързаните с нея електрофизиологични синдроми в детската възраст налагат ранна и своевременно диагностика и правилно лечение, тъй като това до голяма степен определя прогнозата за невропсихическото развитие и социалната адаптация на болните деца.

Епилепсията е заболяване на мозъка, обуславящо се от следните необходими условия (6):

- Поне два последователни непровокирани (или рефлексни) пристъпа в период, по-голям от 24 часа;
- Един непровокиран (или рефлексен) епилептичен пристъп и повишена вероятност за поява на последващи пристъпи, сходна с общия рекурентен риск (поне 60%) след наличие на два непровокирани пристъпи през следващите 10 години;
- Поставена диагноза епилептичен синдром.

1.1. Класификация на епилепсиите според етиологията им

През 2010 г. Международната лига за борба с епилепсията (International League Against Epilepsy- ILAE) предложи нова терминология за класификация на епилепсията в зависимост от етиологията ѝ (7):

1.1.1. Генетична епилепсия (старо название: идиопатична) – резултат е от известен или предполагаем молекулен дефект, като основните клинични симптоми са епилептичните пристъпи. Външни фактори на средата играят отключваща роля, например висока температура, стрес и други. Най – съществен пример са електро-клиничните синдроми, наречени каналопатии, където молекулният дефект засяга един или няколко гена, кодиращи белтъци - канали в мозъка, които имат отношение към нормалното генериране и провеждане на нервния импулс. Генетични са повечето генерализирани епилепсии (синдром на генерализирана епилепсия с фебрилни гърчове плус- GEFS+ синдром, миоклонично – астатична епилепсия – MAE, бенигнени фамилни неонатални конвулсии - BFNC и други), както и някои фокални епилепсии (автосомно-доминантна нощна фронтално-дялова епилепсия - ADNFLE). По-голямата част от генетичните епилепсии са фамилно – унаследяеми, но съществуват и спорадични случаи. За генетична епилепсия може да се говори, когато се наблюдава сигурна сегрегация в рамките на фамилни проучвания и конкордантност в резултат от изследвания при моно- и дизиготни близнаци (8). Генетичните генерализирани епилепсии (ГГЕ) се характеризират с така наречената непълна пенетрантност, където в рамките на едно семейство риска от развитие на епилепсията при сиблингите е 8%, значително по – малък, отколкото е при Менделово рецесивно (25%) или доминантно (50%) заболяване (9). Този факт определя ГГЕ като генетични, но не задължително унаследяеми заболявания. До момента все още няма ясно обусловени модели на полигенно унаследяване, касаещо ГГЕ. Затова терминът идиопатични генерализирани епилепсии в известен смисъл се използва и до днес.

1.1.2. Структурно–метаболитна епилепсия (старо название: симптоматична) – епилептичните пристъпи се явяват резултат от мозъчен структурен дефект или метаболично заболяване. Структурно–метаболитни епилепсии са например туберозна склероза, малформации в коровото развитие (шизенцефалия, лизенцефалия, холопрозенцефалия), мозъчни тумори (глиоми, олигодендроглиоми), синдром на дефицит на глюкозния транспортер (GLUT1 дефицит), креатинов дефицит, синдроми с вродени грешки в метаболизма и други.

1.1.3. Епилепсия с неизяснена причина (старо название: криптогенна) – при нея причината за възникване на епилептични пристъпи е неизяснена. Възможно е да бъде и генетичен дефект, но той не е установен. Около 40% от случаите на епилепсия са с неизяснена етиология.

Важно е да се отбележи, че някои структурни мозъчни лезии, например малформациите в коровото развитие на мозъка, както и някои метаболитни заболявания са резултат от генетичен дефект (10). Същото важи и за епилепсиите с неизяснена етиология, при които се допуска влиянието на генетични фактори. Всичко това затруднява ясното разграничаване на епилепсиите като цяло.

1.2. Класификация на епилептичните пристъпи

През 2017 година ILAE усъвършенства класификацията на епилептичните пристъпи, базирайки се на старата класификация, предложена през 1981 година (11). Основната цел на тези промени е да се даде по-ясна терминология и по-големи възможности за дефиниране на разнообразни епилептични състояния, тъй като е известно, че много от тях се проявят едновременно в разнообразни комбинации. Съгласно международната класификация епилептичните пристъпи се делят на:

1.2.1. Фокални пристъпи (старо название - парциални) – по дефиниция те засягат невронни мрежи в кората и субкоровите пространства, разположени само в едната мозъчна хемисфера. След старта на пристъпите биха могли да се разпространят в двете хемисфери – билатерално генерализирани пристъпи (старо название: вторична генерализация). Фокалните пристъпи са най-разпространените пристъпи в пациенти с епилепсия. Те биха могли да са придружени от загуба на съзнание, но съществуват много случаи на фокални пристъпи, при които не се наблюдава такава. Като част от фокалния пристъп биха могли да се проявят и някои двигателни симптоми:

- автоматизми (примляскване),
- хипермоторни пристъпи
- атонични пристъпи (внезапно прекратяване на мускулния тонус в засегнатата част)
- клонични (фокално ритмично съкращаване на засегнатия мускул)
- тонични (продължително стягане на засегнатата част от мускула)
- епилептични спазми (ритмично свиване и отпускане на ръцете и туловището).

Фокалният пристъп може да се прояви без засягане на моториката, а чрез сетивни и когнитивно-поведенчески симптоми, някои от които са субективни и следва да се потвърдят като патологична промяна от самия пациент и неговия болногледач:

- фокални сомато-сензорни пристъпи (зрителни, слухови, вкусови, звукови и равновесни възприятия)
- фокални когнитивни пристъпи (иктален дефицит на речта и абстрактното мислене, както и всички когнитивни функции, характерни за висшата нервна дейност)
- емоционални пристъпи (агресия, страх, безпокойство, параноя, смях и други)

- поведенчески арест (внезапно преустановяване на движенията и невъзприемчивост)

1.2.2. Генерализирани пристъпи – проявяват се билатерално, като засягат невронни мрежи, разположени в двете хемисфери. Почти всички се съпътстват със загуба на съзнание, въпреки че рядко се срещат генерализирани пристъпи, при които съзнанието се запазва. Повечето генетични епилепсии са генерализирани, но съществуват и някои фокални (ADNFLE, BFNC). Подразделят се на генерализирани пристъпи с моторно и такива без моторно начало.

1.2.2.1. Генерализирани пристъпи с моторно начало:

- **тонично–клонични** – най-често срещаните пристъпи. Характеризират се със стягане на крайниците и туловището (тонична фаза) с последващо неконтролируемо съкращение на мускулите на крайниците от двете страни на тялото (клонична фаза) с често засягане на лице, шия и туловище. Двата вида пристъпи, освен в комбинация, могат да се срещат и изолирано. Често са придружени от инконтиненция и цианоза на устните и лицето. В постикталният период се наблюдава замъглено съзнание, сънливост и летаргия, които преминават постепенно.

- **миоклонични пристъпи** – могат да се появят изолирано или в комбинация с атонична и тонична активност. Представяват бързи, кратки и единични съкращения на мускулатурата на крайниците, които не се повтарят регулярно, както клоничните пристъпи.

- **миоклонично-тонично-клонични пристъпи** – започват с единични миоклонии, следвани от тонично-клонична активност. Такъв тип пристъпи са характерни за ювенилната миоклонична епилепсия (Juvenile Myoclonic Epilepsy- JME) (12).

- **миоклонично-атонични пристъпи** (предишно наименование: миоклонично-астатични) - старт от миоклоничен припадък, последван от преустановяване на движението. Такъв тип пристъпи са характерни за миоклонично–астатичната епилепсия (синдром на Doose) и за електро-клиничния синдром на Lennox – Gastaut (13).

- **епилептични спазми** – съкращения под формата на клъстери, засягащи проксималните и трункални мускули. Старото им название е инфантилни спазми, тъй като се появяват в детска възраст. Епилептични спазми се срещат и при фокалните видове епилепсия.

1.2.2.2. Генерализирани пристъпи без моторно начало: в тази група са основно абсансните пристъпи. Характеризират се със загуба на съзнание, втрещване, примигване и автоматизми. Според специфичните електроенцефалографски находки (ЕЕГ) се разграничават типични и атипични абсанси (11). Други пристъпи, включващи се в тази група са:

- миоклонични абсанси - абсансен припадък с ритмични тройни миоклонични движения на всяка секунда.
- миоклонии на клепачите – конвулсии на клепачите в комбинация с въртене на очните ябълки.

Предимно генерализирани абсанси се срещат при детската абсансна епилепсия (Childhood Absence Epilepsy - CAE), ювенилната абсансна епилепсия (Juvenile Absence Epilepsy - JAE), синдрома на GLUT1 дефицит и други.

1.2.3. Епилептичен статус (Status epilepticus, SE) – представлява живото-застрашаващо състояние, при което мозъкът се намира в постоянен единичен пристъп, или се наблюдават поредица от пристъпи, появяващи се един след друг без да се възстановява съзнанието между тях за период повече от 5 минути.

1.2. Генетична (идиопатична) генерализирана и фокална епилепсия

Генетичните генерализирани и фокални епилепсии (ГГЕ/ГФЕ) съставляват между 20 и 30% от всички епилепсии, известни до момента (14). Те формират една добре дефинирана група от електро-клинични синдроми, при които епилептичните пристъпи са основния симптом на заболяването. Подтиповете ГГЕ по дефиниция се разделят в зависимост от комбинацията от различни типове епилептични пристъпи и възрастта на началото им. Към ГГЕ/ГФЕ спадат добре охарактеризирани с ясна генетична етиология синдроми: детска абсансна епилепсия (CAE), ювенилна миоклонична епилепсия (MAE), генерализирана епилепсия с тонично-клонични пристъпи + (GEFS+ синдром), бенигнени фамилни неонатални конвулсии (BFNC), миоклонично–астатична епилепсия (MAE) и други. Основна характерна черта е, че пристъпите започват в ранна детска възраст, провокирани от висока температура (FS) или непровокирани от странични фактори, което предполага участието на генетичен дефект в етиологията им. Пристъпите в повечето случаи са генерализирани и със загуба на съзнание, но съществуват и някои фокални генетични епилепсии (BFNC, ADNFLE). Най–характерните видове пристъпи са ГТКП, следвани от абсансите и миоклоничните пристъпи.

Изследвания при еднояйчни близнаци показват 70-80% конкордантност, по- висока от тази при двуяйчни близнаци и общата популация, което предполага недвусмислено влиянието на генетични фактори в етиологията на ГГЕ (15). В по–голямата си част ГГЕ са фамилни, но съществуват и спорадични, изолирани случаи. Унаследяването би могло да е на Менделов принцип, резултат от моногенен дефект, но в повечето случаи ГГЕ следват един по–сложен модел на унаследяване, резултат от комбинираното действие на няколко генетични фактора с директен и модифициращ ефект, в съвкупност с действието на фактори на средата.

Болшинството от моногенните ГГЕ се дължат на мутации в гени, кодиращи потенциал-зависими (K^+ , Na^+ , Ca^+ , Cl^-) йонни канали, както лиганд-зависими йонни

канали (различни субединици на рецептора за гама аминокиселината киселина - GABA, ацетил холиновия ACh рецептор и други), отговорни за генерирането и предаването на нервния импулс. Мутациите причиняват загуба или придобиване на функция на съответния канал, при което се нарушава правилното медиране на акционния потенциал в неврона (16). Тези епилептични състояния, наречени каналопатии, са основно с доминантно унаследяване и се характеризират с генетична и фенотипна хетерогенност. Един и същи епилептичен синдром би могъл да се причинява от мутации в различни гени (например GEFS+ е резултат от мутации в *SCN1A*, *SCN1B*, както и в *GABRG2* гена; BFNC - резултат от мутации в *KCNQ2* или *KCNQ3*; *CHRNA2*, *CHRNA4* и *CHRNA2* гените като причина за ADNFLE и други). Обратно, една и съща мутация в даден ген би могъл да доведе до различен клиничен фенотип. Например, мутация в *SCN1A* гена би да е причина за изява на фебрилни гърчове + (FS+) или тежка епилептична енцефалопатия като синдром на Драве (Dravet syndrome - DS). Редица фактори биха могли да допринесат за фенотипната хетерогенност (фенотипна плейотрофия), например типа мутация, възрастта на индивида, свързана с повишената или понижена експресия на определен ген през конкретен период от развитието му, влияние на множество епигенетични фактори, както и влиянието на гени - модификатори.

С развитието на широкообхватните геномни технологии за паралелно изследване на множество гени, каквото е новогенерационното секвениране (Whole Genome Sequencing - WGS, Whole Exome Sequencing - WES) се идентифицираха допълнително гени, кодиращи не само йонни канали в мозъка, но и такива, участващи в синаптичната трансмисия, транспорта на метаболити през кръвно – мозъчната бариера, регулация на транскрипцията, гени, участващи в ДНК поправката и хроматиновото ремоделиране. Такива са например *SLC2A1* гена, кодиращ главния глюкозен транспортер през кръвно – мозъчната бариера, разнообразни мутации в който причиняват метаболитния синдром на GLUT1 дефицит (17); *LGI1* гена (leucine-rich glioma-inactivated 1), експресиращ се предимно в мозъка и участващ в редица процеси като клетъчен растеж, адхезия и миграция, както и като регулатор на K^{+} - канали в синапсите участващи на глутаматните AMPA рецептори, мутации в който са причина за изява на автосомно доминантната (АД) фамилна епилепсия на темпоралния лоб (18); *GRIN2B*, чийто продукт участва в синаптичното предаване на нервния импулс и мутации в него са установени при пациенти с фокална епилепсия с ранно начало и интелектуален дефицит (19).

В настоящият литературен обзор ще бъдат описани само тези ГГЕ, ГФЕ и епилептични енцефалопатии, които са предмет на проучването с оглед на събраната извадка от пациенти в рамките на научно–изследователски проект.

1.3. Фебрилно – провокирани пристъпи и епилептични синдроми

1.3.1. Фебрилни гърчове и фебрилни гърчове плюс (FS/FS+)

Фебрилните гърчове не покриват дефиницията за епилепсия, тъй като понякога са единични пристъпи и не се повтарят отново. Провокират се от висока температура (повисока от 38°C), най-често по време на вирусна инфекция, като по характеристика са най-често ГТКП. Понякога се изявяват в комбинация с други типове пристъпи (абсанси, миоклонични, фокални), формирайки различни електро-клинични синдроми. Типичните FS се появяват между 3- и 6-месечна възраст на фона на висока температура, провокирана най-често от инфекциозни заболявания. Фебрилни пристъпи се срещат при около 2-5% от населението в Европа и Северна Америка, като честотата на заболяемост е най-висока в Япония – 6-9% (20). Характерно за тях е, че отшумяват с израстването на детето, като при фебрилните гърчове плюс (FS+) се наблюдава персистиране на пристъпите до по-късна възраст (6 години). FS и FS+ представляват най-леката форма на епилепсия от спектъра на GEFS+ синдрома. Описани са няколко начина на унаследяване – АД с непълна пенетрантност, полигенно със сложен и недобре дефиниран генетичен фон. Последният случай се допуска при семейства, при които се среща повече от една форма на епилепсия в комбинация с FS/FS+ (21, 22).

1.3.2. Синдром на генерализирана епилепсия с фебрилни гърчове плюс (Generalized Epilepsy with Febrile Seizures +, GEFS+)

Когато фебрилните ГТКП персистират след 6-годишна възраст и се явят в комбинация с други видове афебрилни генерализирани пристъпи (миоклонични, атонични, абсанси) се говори за синдром на генерализирана епилепсия с фебрилни гърчове плюс (GEFS+ синдром) (23). В някои GEFS+ семейства се срещат FS в комбинация с фокални пристъпи, най-често на темпоралния лоб (21, 24). Спектърът на GEFS+ синдрома включва както изява на доброкачествени FS или FS+, така и тежка епилептична енцефалопатия със допълнителна невропсихологична симптоматика. По-леката форма на синдрома се характеризира със спонтанно изчезване на пристъпите в по-късните етапи от живота на пациента и запазено психомоторно развитие (21). По-тежките форми, при които се наблюдава постепен спад в невропсихологическото развитие (НПР) след старта на пристъпите са синдром на Драве и някои случаи на миоклонично-астатична епилепсия (MAE) (21). Унаследяването на GEFS+ синдрома е типично АД с непълна пенетрантност – около 60% (25). В една и съща фамилия биха могли да се наблюдават както прости FS, така и тежък Драве – фенотип (26). Това би могло да се дължи на действието на гени – модификатори на фенотипа в рамките на съответния индивид (27). Клиничната хетерогенност на GEFS+ усложнява поставянето на диагнозата при изолирани случаи, тъй като FS могат понякога да са единственият симптом на болестта (21).

1.3.3. Тежка миоклонична епилепсия в детството (Dravet syndrome, DS)

Тежката миоклонична епилепсия в детството (Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy - SMEI) е най-тежката форма на епилепсия от спектъра на GEFS+. Нарича се още синдром на Драве (Dravet syndrome - DS) по името на откривателя си (28). DS е генетично най-добре охарактеризираната епилептична енцефалопатия (ЕЕ) до момента, с ясна генетична етиология при около 85% от случаите в световен мащаб (29). Въпреки това, честотата му на разпространение е сравнително ниска - 1 на 22000 живо-родени деца (30). Засяга повече момчета, отколкото момичета в съотношение 2:1 (31). При DS пристъпите започват към 6-месечна възраст, най-често провокирани от висока температура заедно с рекурентен фебрилен SE. Заболяването еволюира с поява на допълнителни нефебрилни пристъпи като ГТКП, миоклонични, атипични абсанси, атонични между първата и четвъртата година (31). Към втората година от живота започва да се наблюдава постепен спад в невропсихологическото развитие (НПР) в резултат от абнормалната епилептоформена активност. Пристъпите са основно рефрактерни, неповлияващи се от антиепилептични медикаменти (АЕМ). Наред с интелектуалния дефицит (ИД) се наблюдават поведенчески и моторни проблеми (аутистични стигми, атаксия) (32), както и задръжка в развитието на речта (33). Всички тези когнитивни нарушения предполагат, че ЕЕ, в частност DS, се дължат на аберантни механизми, различни от епилептогенния - такива, свързани с миграцията на невроните по време на ембрионалното развитие, както и нарушени невронални мрежи за комуникация между тях (34). Следователно, невъзможно е когнитивно-поведенческите проблеми да бъдат повлияни от конвенционалните антиконвулсанти и ако те биха могли да имат ефект върху изязвата на епилептичните пристъпи, не се наблюдава обратимост при наличие на ИД в никой случай (35). Затова при DS, както и при повечето ЕЕ, прогнозата е неблагоприятна (31, 36). Болшинството от DS пациентите са изолирани случаи (95%), в останалата част се наблюдава фамилна история за епилепсия от спектъра на GEFS+ (37; 38, 39). Описани са и гранични клинични състояния на DS (borderline DS или SMEB), поради факта, че липсват основни характерни симптоми на DS синдрома, като миоклонични пристъпи и генерализирана острие - вълнова активност (40, 41).

1.3.4. Миоклонично-астатична епилепсия (Myoclonic Astatic Epilepsy, MAE; синдром на Doose)

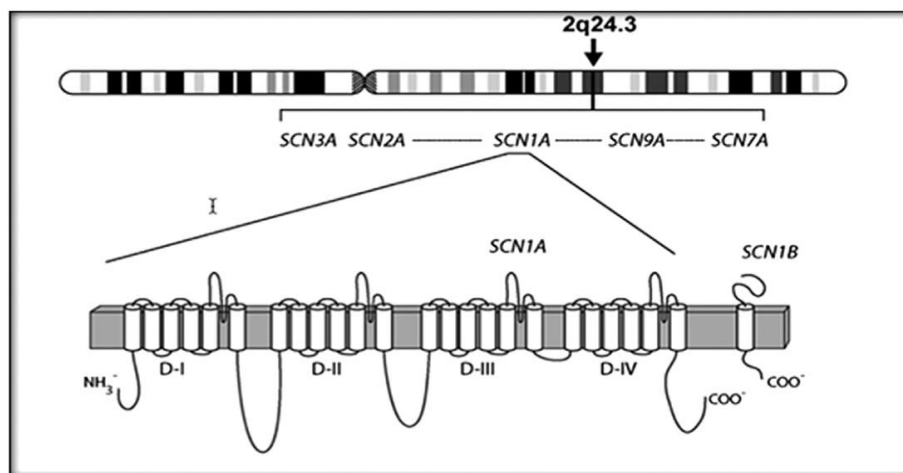
Рядък епилептичен синдром, включващ множество различни типове пристъпи, като доминиращи са миоклонични и атонични/астатични пристъпи. В някои случаи, но не във всички, се наблюдават когнитивни нарушения. MAE е сравнително често срещано заболяване (1 на 10000 деца), съставлявайки между 1 и 2% от епилепсиите в детска възраст (42). Както при DS, тук се засягат повече момчета, отколкото момичета ако заболяването стартира в по-късните етапи от живота. Ако началото на пристъпите е през първата година от постнаталното развитие се наблюдава еднакво засягане и на двата пола. Начало през този период се наблюдава при 24% от случаите на MAE. При болшинството от MAE

пациентите (94%) началото на пристъпите е между 3- и 4-годишна възраст (43). С течение на времето, пристъпите зачестяват и трудно се повлияват от конвенционалните АЕД, като всички типове пристъпи могат да завършат в конвулсивен или не SE. В случаите, при които пристъпите персистират в по-късна възраст, прогнозата е неблагоприятна, като се наблюдават допълнително и ИД, поведенчески проблеми и хиперактивност (44). Хиперактивност и поведенчески проблеми се съобщават при 10 от 22 МАЕ пациента (45), въпреки че специфично установен когнитивен дефицит, характерен за МАЕ досега няма. Около две трети от случаите на МАЕ са с добра прогноза и нормални стойности на IQ, при които се наблюдава ремисия на пристъпите в по-късна възраст (44, 46).

1.3.5. Молекулни дефекти в ген *SCN1A*

Потенциал-зависимите Na^+ канали в мозъка представляват комплекси с големина от 260 kDa, съставени от голяма порообразуваща α -субединица, асоциирана с ауксиларна β -субединица ($\beta 1$ - $\beta 4$) (33-36 kDa) (Фигура 1). В геномът на бозайниците се съдържат гени, кодиращи девет функционално-активни α субединици за потенциал-зависими Na^+ канали, различаващи се една от друга по биофизичните си свойства и тъканта, в която се експресират. Протеините *NaV1.1*, *NaV1.2*, *NaV1.3* и *NaV1.6*, кодирани съответно от гените *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN3A* и *SCN8A*, са основните Na^+ канали в централната нервна система (ЦНС). Те участват основно в генерирането и разпространението на соматодендритни и аксонални акционни потенциали в мозъка (47).

Такъв е генът *SCN1A*, разположен в хромозомен район 2q24.3 и заедно с гените *SCN2A*, *SCN3A*, *SCN7A* и *SCN9A* формира специфичен генен клъстер в дългото рамо на хромозома 2 (Фигура 1). *SCN1A* кодира α субединицата на натриев канал, разположен в мембраната на клетъчното тяло и дендритите на GABA-ергичните инхибиторни интерневрони в мозъка (48). Алфа субединицата притежава волтажен сензор на йон-провеждащата пора, изградена от четири хомоложни домена (DI-DIV; Фигури 1,2), като всеки един от тях се състои от шест α -спирални трансмембранни сегмента (S1-S6) (47). Сегменти S1-S3 от всеки домен имат структурно значение за канала, S4 представлява волтажния сензор, а сегменти S5 и S6 изграждат пората, през която се осъществява йонния транспорт (Фигура 2). Ауксиларната β -субединица, кодирана от ген *SCN1B* има модифициращ ефект върху кинетиката и пропускливостта на канала и служи като адхезионна молекула, взаимодействаща си с екстрацелуларния матрикс и цитоскелета (47) (Фигура 1). По време на деполяризация на мембраната положително заредения сегмент S4 търпи конформационна промяна и се премества към екстрацелуларното пространство, което предизвиква отваряне на пората на канала и поток на Na^+ йони. Следва бърза инактивация чрез затваряне на пората посредством инактивационната бримка, разположена между сегменти S6 (от домен DIII) и S1 (от домен DIV). Това спира потока на Na^+ йони и позволява на мембраната да възстанови потенциала си на покой. По време на фаза на реполяризация S4 сегмента се връща в първоначалното си състояние и Na^+ канал се възстановява, готов за нова фаза на деполяризация (49).



Фигура 1. Схематично изображение на геномната позиция на SCN- генния клъстер, заемащ приблизително 1,4 Mbp от район 2q24.3. На схемата са представени разгънатата домевна структура на Nav1.1 протеина и неговата ауксиларна субединица, продукта на *SCN1B* гена (адаптирана от William and Battaglia, 2013 (50)).

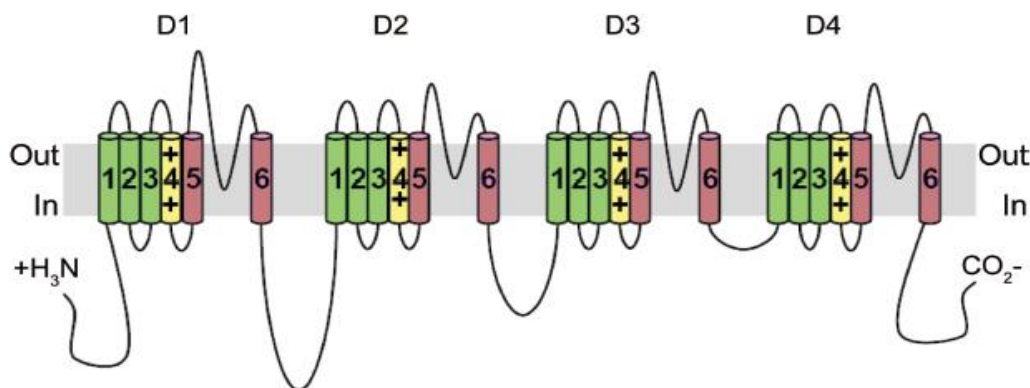
При около 10% от пациентите с GEFS+ синдром се откриват точкови мутации в *SCN1A* гена, докато делът на мутации в *SCN1A* при DS пациенти е около 70-80% (51,52). Интрагенни делеции или цялостно-генни делеции се откриват при 2-27% от DS случаите, негативни за точкови мутации в *SCN1A* гена (51-54). Не е ясно колко е процента на копийни варианти (Copy Number Variations; CNVs), засягащи пациенти с по-леките форми на епилепсии от GEFS+ спектъра. Това вероятно се дължи на по-тежките последици, които причинява пълната липса на *SCN1A* копие, резултат от делеция и изява на епилептична енцефалопатия, каквато е DS.

Около 95% от *SCN1A* мутациите при DS пациенти възникват *de novo*, като основно са от типа missense (39%), следвани от nonsense (22%), frameshift (19%), сплайс-място (10%), геномни преустройства (делеции, дупликации, амплификации, транслокации – 2-3%), in-frame делеции (2%) и други комплексни мутации (1%) (51,55,56). Анализ на генотип - фенотипните корелации показват, че по-тежка клинична картина се наблюдава в случаите на мутации с прекъсване на рамката на четене (nonsense) и големи делеции, водещи до липса на едното копие от гена и недостатъчно количество от белтъка (хаплоинсуфициенция). Тежък DS фенотип се наблюдава и при случаи на мутации с промяна на смисъла (missense), при които се засягат порообразуващите сегменти (S5 и S6) и волтажния сензорен сегмент S4, при които се засяга полярността на изграждащите АК, а в резултат и йонния транспорт (57,58). Обратно, missense мутации, разположени извън порообразуващия район (S5-S6) водят до изява на по-лек GEFS+ фенотип (59,60). Сравнително скорошно проучване показва, че прекъсващите рамката на четене мутации, водят до загуба на функция на белтъка и по-ранна изява на епилептичните пристъпи, най-често миоклонични и атипични абсанси, които водят и до тежък DS фенотип (57). Малка част от случаите на DS се дължат на мутации в други гени, като *GABRA1*, *GABRG2* кодиращ α -субединиците на GABA рецептор, или *STXBP1*, чийто продукт, като част от

синапсните комплекси, играе важна роля в невротрансмисията, други субединици на Na^+ йонни канали – *SCN1B*, *SCN2A* и други (54, 61,62).

Част от *SCN1A* патогенните мутации биват унаследени от родител със значително по-лек фенотип или асимптоматичен такъв. Тази клинична хетерогенност предполага наличието на така наречените гени - модификатори, мутации в които повлияват от ефекта на *SCN1A* патогенния вариант. Съществуват няколко проучвания, предоставящи доказателства за модифициращия ефект на някои гени върху тежестта на GEFS+ и DS. Такива гени - модификатори са *SCN8A*, *SCN9A*, *CACNB4* и други (63-65).

В случаите на големи делеции на хромозомни райони, освен SCN- генния клъстер в 2q24.3, се засягат и допълнителни гени, водещи до изява на синдромен фенотип, при който освен епилептичните пристъпи се наблюдават и дисморфични белези, ИД, изоставане в развитието и други синдромни характеристики (66,67). Въпреки това, в някои случаи класическият DS фенотип е неразличим при пациенти, носещи както точкови мутации, така и интрагенни делеции или големи делеции на целия SCN- клъстер (54). Поради тази причина е важно при съмнение за DS или друга ЕЕ, да се прилагат както методи за търсене на точкови варианти, така и методи, способни да идентифицират малки или по-големи промени в броя копия на част от *SCN1A* гена, целия ген и група гени.



Фигура 2. Схематично представяне на разгърнатия Nav1.1. белтък, изграден от 4 идентични домена (D1-D4). Всеки от тях е изграден от 6 сегмента (S1-S6), като трансмембранните сегменти S1-S3 (зелено) имат структурно значение, S4 (жълто) представлява волтажния сензор, а S5 и S6 (виолетово) изграждат пората на канала, през който се осъществява потока на йони (взета от Zuberi et al., 2011 (57)).

Експерименти с миши модели показват, че хомо- и хетерозиготни мутации със загуба на функция на Nav1.1 протеина не водят до промяна в нормалното функциониране на пирамидните възбудни интерневрони в хипокампа, но влияят негативно на активността на инхибиторните GABA-ергични интерневрони, разположени отново в хипокампа, както и в кортекса (68). Така загубата на функцията на инхибиторните интерневрони ще доведе до дебалансиране на процесите възбудимост и инхибиране в мозъка и като резултат – епилептични пристъпи. Тази концепция се подкрепя от резултатите от изследвания при мишки - двойни хетерозиготи, носещи мутация както в *SCN1A*, така и в гена *SCN8A* (63).

Генът *SCN8A* е експресиран основно в неврони, генериращи възбудни импулси в мозъка (69). Хипотетично, дисбаланса между процесите на възбудимост и инхибиране при наличие на мутация в *SCN1A* би могъл да се компенсира с мутация със загуба на функция в ген, кодиращ канал на възбудни неврони, както е *SCN8A*. Последният се явява ген - модификатор на експресията на *SCN1A* гена. Точно това се случва и при *Nav1.1^{+/-}/Nav1.6^{+/-}* мишки: наблюдава се по-добър отговор към антиконвулсанти, както и по-дълъг живот, в сравнение с *Nav1.1^{+/-}* хетерозиготи (63,70). В допълнение, тези резултати подкрепят хипотезата че *SCN1A* гена е дозово-зависим и недостатъчно количество от продукта му е отговорна за изявата на заболяванията от GEFS+ спектъра. Практически резултат от това откритие е избягване на прилагането на АЕМ от групата на блокери на натриевите канали, които биха могли да влошат симптоматиката при DS пациенти (71). Алтернативен подход би могъл да е прилагането на медикаменти, които целят постигането на баланс между възбудните и инхибиторните импулси в мозъка, чрез специфично инхибиране на възбудните *Nav1.6* канали, кодирани от *SCN8A* гена. За съжаление, специфично свързващи се медикаменти с *Nav1.6* канала все още не са открити. Епилептогенната активност в резултат от дозов ефект на *SCN1A* гена се дължи на намалено отделяне на главния инхибиторен невротрансмитер GABA. В този смисъл, друг подход за лечение цели увеличаване на концентрацията на GABA в кръвта с цел компенсация на липсата му и лекарства като тиагабин действително правят това. Тиагабинът увеличава GABA концентрациите в синаптичната цепка чрез инхибиране на обратната абсорбция на GABA в нервните окончания и глиата (72,73). Други лекарства от групата на бензодиазепините (например клоназепам) действат като алостерични активатори - увеличават отговора на постсинаптичните GABA-рецептори към GABA (73). Въпреки усилията за подобряване на лечението, пристъпите при много пациенти с DS и GEFS+ остават рефрактерни, което би могло да се дължи на разположението на мутацията в конкретен район на белтъка, независим от фармакологичния ефект на медикамента.

1.4. Бенигнени фамилни неонатални, неонатално-инфантилни и инфантилни конвулсии

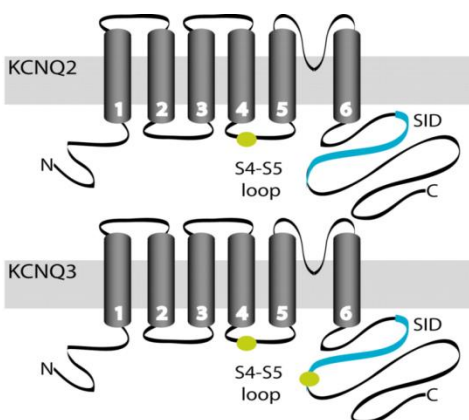
Представяват три отделни фамилни фокални електро-клинични синдрома с висока пенетрантност, които се отнасят към каналопатиите. Наречени са бенигнени, тъй като се наблюдава спонтанна ремисия на пристъпите през по-късните етапи от живота. Болестността за BFNC е 14,4 на 10 000 живородени деца. Ранното разпознаване на бенигнените фамилни фокални епилептични синдроми е важно с цел предотвратяване на ненужни изследвания и позволява ранно преустановяване на антиепилептичното лечение, което често пъти води до странични ефекти при новороденото. И трите типа епилепсия имат сходни клинични характеристики, като пристъпите се появяват през първата година от живота. Различават се една от друга по възрастта на начало на пристъпите и асоциирания генен дефект. При бенигнените фамилни неонатални конвулсии (Benign Familial Neonatal Convulsions - BFNC) старта на пристъпите е през първите дни от живота -

втори до осми ден, като постепенно отшумяват до 16-месечна възраст (74). При около 15% от пациентите се наблюдава персистиране на пристъпите и след първата година (75). Бенигнените фамилни неонатално-инфантилни конвулсии (Benign Familial Neonatal Infantile Convulsions - BFNIC) се появяват между втори и седми месец от живота и постепенно отшумяват до края на първата година (76). Бенигнените фамилни инфантилни пристъпи (Benign Familial Infantile Convulsions - BFIC) се появяват между 4- и 8- месечна възраст, като постепенно изчезват до достигане на 3- годишна възраст (77). Те са генетично най-хетерогенните от трите бенигнени фамилни епилепсии. Съществуват данни за няколко семейства, при които BFIC по-късно през живота косегрегира с пароксизмална хореоатетоза – неврологично заболяване, характеризиращо се с поредица от неволеви движения на тялото и крайниците, продължаващо до няколко секунди (21). Описани са случаи на хемиплегична мигрена в комбинация с инфантилни конвулсии (78). Всичко това вероятно се дължи на генетичната хетерогенност на синдрома със засягането на допълнителни локуси.

Характерно и за трите синдрома е начало с основно тонични пристъпи, следвани от фокални пристъпи с моторен компонент, често асоциирани с апнеа и цианоза. Пристъпите са кратки, най-често под формата на клъстери, като могат да се повторят до 30 пъти дневно, а понякога да еволюират до SE (74). Понякога се наблюдава и вторична генерализация в клонични пристъпи или ГТКП. Интерикталните ЕЕГ данни са нормални, като пациентите имат добър отговор към АЕМ. Общото и интелектуално развитие не се нарушават. И трите синдрома се характеризират с АД унаследяване и висока пенетрантност (21).

1.4.1. Молекулни дефекти в ген *KCNQ2*

От молекулна гледна точка, BFNC представляват невронални каналопатии, възникващи като резултат от мутации в два гена – *KCNQ2* (OMIM: 121200) и *KCNQ3* (OMIM: 121201). Двата гена кодират високо хомоложни субединици Kv7.2 и Kv7.3 на нископрагови, потенциал-зависими, бавно активиращи се и бавно деактивиращи се калиеви канали. Всяка субединица се състои от шест трансмембранны домена – четири потенциал-чувствителни домена, два домена, формиращи пора и дълъг С-краен цитоплазмен домен. По две вериги от всяка субединица се свързват и формират тетрамер (Фигура 3). N-крайният домен играе роля в насочването на новосинтезирания белтък към мембраната и вероятно подпомага способността за отваряне на пората, регулираща йонния транспорт. Трансмембранните домени, заедно с продукта на *KCNQ3*, са отговорни за формирането на пората на канала, през който се осъществява потока на йони. С-терминалният домен се свързва с Ca^{2+} сензор калмодулин (CaM) и така спомага за асемблирането и тетрамеризацията на Kv7.2 и Kv7.3, като така се формира функционален канал в мембраната на клетката (79). Тези канали играят роля в регулацията на възбудимостта на неврона, спомагайки за възстановяването на потенциала на покой на мембраната чрез пренос на K^{+} йони в интрацелуларното пространство.



Фигура 3. Схематично изображение на Kv7.2 и Kv7.3 белтъците, продукти на гените *KCNQ2* и *KCNQ3* с показана доменна структура (взета от Surti et al., 2005 (80)).

Генът *KCNQ2* е засегнат в 90% от случаите на BFNC, с 85% пенетрантност (25,81). Мутации със загуба на функция в този ген са открити и при пациенти с BFNC без фамилна история. Генът *KCNQ2* се намира върху дългото рамо на 20-та хромозома, участък 20q13.3. Състои се от 18 екзона. Кодираният от него белтък Kv7.2 се експресира в централната и периферната нервни системи и е високо представен в прищъпванията на Ранвие на периферните миелинови влакна (82). В редки случаи, мутациите в *KCNQ2*, които засягат кинетиката на активирането на Kv7.2 канали са асоциирани с миокимия, но като цяло болните с BFNC нямат симптоми, показващи промени в периферната нервна възбудимост.

Мутационният спектър на *KCNQ2* гена включва погрешно-смислени (missense), мутации с прекъсване на рамката на четене (nonsense) мутации, с изместване в рамката на четене (frameshift) в различни участъци на гена, както и делеции и инсерции на цели екзони (83). Проучвания върху ефекта на тези мутации в хетерозиготни експресионни системи показват, че техният ефект варира: от леки промени до пълна липса на функция на K^+ канал и че леко понижаване на М-тока с около 25% през този канал е достатъчно, за да се развие BFNC. Това показва, че недостатъчност на функцията на гена (дозов ефект) е преобладаващия патогенен механизъм при BFNC.

Клиничният спектър на мутациите в *KCNQ2* гена отдавна надхвърля рамките на BFNC. Мутации в този ген, основно възникнали *de novo*, са установени при 10% от пациенти с епилептична енцефалопатия EEEI7 (OMIM: 613720) – заболяване с АД унаследяване, характеризиращо се с поява на рефрактерни пристъпи през първата седмица от живота, свързани впоследствие с изоставане в НПП и персистиращи неврологични нарушения (74,84). ЕЕГ данните показват мултифокална епилептиформна активност. Допълнително се наблюдават и лезии в базалните ганглии при провеждане на образни изследвания. Пристъпите обикновено отшумяват от 1- до 4- годишна възраст с подобрене в ЕЕГ данните, но тежкия неврологичен дефицит се запазва (74). За разлика от гърчовете при BFNC, BFNC или BFIC, които са самоограничаващи се, тези при EEEI7 са пролонгирани и изключително резистентни на лечение, с лоша прогноза, свързана с тежък неврологичен дефицит. Нито една от *KCNQ2* мутациите, свързани с EEEI7 не е открита

при пациенти с BFNC. Повечето от тях възникват *de novo*. Всички тези мутации са асоциирани с добре очертан потенциално разпознаваем клиничко-електрофизиологичен и радиологичен фенотип. Това позволява включването на *KCNQ2* гена в скрининг програми на пациенти с рефрактерни, неонатални пристъпи с неизяснен произход. Резултатите от такъв скрининг биха имали голяма диагностична стойност, тъй като позволяват разграничаването на EEEI7 формата от други тежко-протичащи форми на епилептична енцефалопатия с лоша прогноза.

Мутации във вторият ген - *KCNQ3*, са установени в значително по-малък процент (10%) от случаите на BFNC. Генът *KCNQ3* се намира върху дългото рамо на хромозома 8, участък 8q24.22 и съдържа 16 екзона. Откритите до този момент мутации в този ген засягат пора-формиращите домени в трансмембранный регион на белтъка Kv7.3. Клиничната картина при всички семейства е представена от бенигнени неонатални гърчове със или без фамилна история (85).

Мутации в описаните дотук гени се откриват в около 70% от случаите на бенигнени конвулсии в детството, което показва наличието на допълнителни локуси, свързани с изява на тези електро-клинични синдроми. Например, Schubert и съавтори идентифицират мутации в ген *PRRT2* при 77% от семействата със BFIS (86). Малко по-късно, изследване на четири гена (*KCNQ2*, *KCNQ3*, *SCN2A* и *PRRT2*) в 46 семейства с бенигнени фамилни пристъпи в кърмаческа възраст показва, че молекулната патология на BFNC е специфично свързана с *KCNQ2* гена, докато при BFIC играе роля още един ген, *SCN2A*. Най-разнородна е групата на BFIC, в която са открити молекулни дефекти и в четирите гена, но 70-80% от тях са в ген *PRRT2*. Откриваемостта на молекулните дефекти в това проучване е била 89% (81).

1.5. Абсансни епилепсии

Генерализирани генетични епилепсии, при които основните пристъпи са абсанси. Към тази група се причисляват абсансната епилепсия с ранно начало (Early Onset Absence Epilepsy - EOAE), детска абсансна епилепсия (Childhood Absence Epilepsy - CAE) и ювенилна абсансна епилепсия (Juvenile Absence Epilepsy - JAE). Трите заболявания трудно се разграничават едно от друго, но в повечето случаи отдиференцирането е по възрастта на начало на пристъпите. CAE започва между 4- и 10- годишна възраст, при EOAE абсансните пристъпи се появяват пред четвъртата година от живота, а при JAE – след възраст от 10 години. Детската абсансна епилепсия (CAE) е типичен представител на ГГЕ с начало между четири и 10 години при иначе здрави деца. Пристъпите са внезапни и кратки, с продължителност обикновено от три до 20 секунди и се характеризират с периоди на втрещване със загуба на съзнанието. Честотата на поява на пристъпите е до 200 дневно. В повечето случаи те се повлияват от АЕМ, или изчезват спонтанно и заболяването има добра прогноза (87). CAE е генетично детерминиран, с конкордантност 70-85% при монозиготни близнаци и се счита, че има комплексно унаследяване (88). Често се наблюдава еволюция в ювенилна абсансна епилепсия (JAE) в по-късните етапи от

живота (89). При JAE пристъпите стартират след 10- годишна възраст, като за разлика от САЕ, се появяват допълнително и ГТКП и миоклонични пристъпи. Случаите на ЕОАЕ с начало под 4- годишна възраст са по-рядко срещани и в комбинация с типичните абсанси, могат да имат комплексен фенотип с допълнителни видове пристъпи, двигателни проблеми или ИД с лоша прогноза (90).

1.5.1. Синдром на GLUT1 дефицит (GLUT1 deficiency syndrome, GLUT1 DS)

Рядко генетично заболяване, дължащо се на разстройство на енергийния метаболизъм в мозъка, в резултат от молекулен дефект в основния глюкозен транспортер - GLUT1. Първоначално синдромът е описан от De Vivo и съавтори като тежка епилептична енцефалопатия (ЕЕ) със старт в ранното детство и асоцииран ИД, моторни проблеми (атаксия и спастичност), придобита микроцефалия и хипогликорахия (намалено съотношение на глюкозата в плазма и цереброспинална течност – CSF съотношение: 0.19-0.35, при запазена нормална плазмена концентрация) (91). Друга характерна находка в цереброспинална течност е ниските нива на лактат, като част от метаболизма на глюкозата (92). Досега по литературни данни са описани не повече от 300 случая на GLUT1 DS. Честотата на разпространение на синдрома не е добре установена, но съществуват публикувани данни за честота от 1:83000, изследвайки основно случаи от датската популация (93). В клиничен аспект спектъра на симптоматиката на GLUT1 DS в последните години се разшири. Различават се както класическа форма на фенотипа, така и атипична такава. При класическият GLUT1 DS, в комбинация с придобита микроцефалия, хипогликорахия и понижени нива на лактат в плазма, се наблюдават основно три групи неврологична симптоматика:

- Епилептични пристъпи – старт в ранна детска възраст, най-често през първата година от живота. Основният тип пристъпи са генерализирани абсанси, в комбинация с миоклонични, миоклонично-астатични, тонични, фокални, ГТКП (94).
- Двигателни нарушения – биха могли да са постоянни или пароксизмални (само по време на пристъпите), като тежестта им флукутира в зависимост от действието на външни стресови фактори (инфекции, продължителни физически упражнения и други). Най - характерни моторни нарушения са спастичност, хипотония, атаксия, хорея, дистония на крайниците, диспраксия и миоклонус (94).
- Когнитивно-поведенчески нарушения – нарушенията в ИД са пропорционални с тежестта на изява на останалите симптоми. В повечето случаи се наблюдават умерен към тежък ИД (95), задръжка в развитието на речта, понякога дисартрия, нарушения в обучението, а по-рядко и поведенчески нарушения, депресия или синдром на дефицит на вниманието с хиперактивност (Attention Deficit Hyperactivity Disorder- ADHD) (96).

При некласическата форма на GLUT1 DS се включват най-често моторни заболявания като атаксия и дистония, с или без епилептични пристъпи, мигренозни

състояния и пароксизмална дискинезия, индуцирана при физически натоварвания (Paroxysmal Exertion-induced Dyskinesia - PED). PED се характеризира с кратки, неволеви хореоатетични или дистонични движения, засягащи основно долните крайници, съпроводени или не с епилептоформена активност и загуба на съзнание (97).

Характерно за GLUT1 DS е благоприятното повлияване от кетогенна диета, богата на мазнини – кетоните са алтернативен енергиен източник за мозъка и заместването на въглехидратите с мазнини в диетата води до редуциране основно на епилептичните пристъпи, разстройствата в движението и нормализиране растежа на главата (95). ИД остава непроменен. Най-точен и сигурен метод за поставяне на диагноза е изследването на CSF съотношението в цереброспинална течност, получена чрез лумбална пункция и кръвна плазма. Поради инвазивната природа на тази процедура и високия риск от усложнения, тя е рядко прилагана в клиничната практика. Този факт, в комбинация с широкия фенотипен спектър на изява на синдрома, затруднява поставянето на точна диагноза при пациентите в ранна детска възраст. В допълнение, фактът, че GLUT1 DS синдромът е донякъде лечимо заболяване, повишава интереса на изследователите с цел установяване на молекулните патомеханизми, стоящи в основата му.

1.5.2. Молекулни дефекти в ген *SLC2A1*

Генът *SLC2A1* се намира върху късото рамо на хромозома 1, участък 1p34.2 и кодира основния транспортен белтък GLUT1, пренасящ глюкоза през кръвно-мозъчната бариера при бозайниците. Представлява интегрален трансмембранен гликопротеин, състоящ се от 492 аминокиселини (АК), който улеснява транспорта на хексози и пентози през еритроцитната мембрана.

Мутации в *SLC2A1* са рядка причина за генерализираните абсансни епилепсии с пол-лека клиника и вариабилна възраст на начало. При фамилни случаи с мутации в *SLC2A1* гена е установена непълна пенетрантност и значителна вариация във фенотипната изява, включваща епилепсии с абсанси и начало в много ранна детска (ЕОАЕ) и детска възраст (САЕ), както и случаи на юношеска форма с миоклонични пристъпи (JME), миоклонично-астатична епилепсия (MAE) и фокална епилепсия (98,99).

Мутациите в *SLC2A1* гена водят до загуба на белтъчната функция. Направените до сега функционални изследвания на мутантни протеини показват, че заболяването се дължи на редуциран глюкозен транспорт през кръвно-мозъчната бариера, когато енергийните изисквания на мозъка надхвърлят снабдяването му (99). Точковите missense мутации в *SLC2A1* гена са характерни за по-леките форми на ГГЕ, като САЕ, JAE, MAE, докато тежката енцефалопатия GLUT1 DS се причинява основно от *de novo* мутации от типа загуба на смисъла, екзонни или цялостногенни делеции и дупликации с доминантен ефект, причиняващи загуба на функция на GLUT1 транспортера (95,100).

Недостатъчност на GLUT1 протеина се явява важна причина за моногенните форми на абсансна епилепсия с начало от ранно детство до зряла възраст. Участието на GLUT1 глюкозния транспортер в етиологията на детските абсансни епилепсии с ранно начало е

описано от различни изследователски групи, които съобщават противоречиви резултати относно ролята на *SLC2A1* в тези епилептични заболявания. Първоначалните литературни данни сочат, че генетичните дефекти в *SLC2A1* гена се срещат при 12% от пациенти с детска абсансна епилепсия с ранно начало- ЕОАЕ (17,101). Други автори потвърждават тези наблюдения, изследвайки 26 пациенти с ЕОАЕ, но не откриват мутации в този ген при селектирана група от абсансни епилепсии с начало след 4- годишна възраст - САЕ и JAE (102). Arsov и съавтори показват, че 1.4% от тяхната кохорта пациенти с идиопатични абсанси имат функционално валидирана мутация, засягаща *SLC2A1* гена, което значително разширява фенотипния спектър на GLUT1 DS и го прави трудно за поставяне на диагноза заболяване (101). В допълнение, дефекти в *SLC2A1* (основно missense) са причина за изява на 5% от спорадичните случаи на МАЕ (100,103) и 1% от случаите на неизяснена ГГЕ (105,106).

Знае се, че генетичният спектър на мутациите в *SLC2A1* също варира значително – от точкови мутации от различен тип до големи цялостногенни делеции. Около 70-80% от пациентите с GLUT1 DS носят патогенен точков вариант, докато спектъра на интрагенни или делеции на целия *SLC2A1* ген е значително по-малък – 11-14% (95,101,106). Установено е, че делеции на целия ген, мутации с прекъсване на рамката на четене и загуба на смисъла водят до 50% загуба на GLUT1 протеина и са асоциирани с по-тежък фенотип и класическа изява на GLUT1 DS. Някои мутации с промяна на смисъла водят до 50-75% запазване на функцията на белтъка, което е свързано съответно и с по-лека симптоматика (95). Все пак съществува фенотипна хетерогенност и пациенти с missense мутации, показват тежък ИД и обратно - пациенти с интрагенни делеции проявяват по-лека симптоматика (95). Описани са и няколко случая на двойни хетерозиготи в транс-състояние с изява на много тежка форма на GLUT1 DS и запазване на функцията на белтъка само с около 25-50% (92).

1.6. Комплексни форми на епилепсия

1.6.1. Епилептични енцефалопатии (ЕЕ)

Някои от описаните дотук ГГЕ с ранно начало в детска възраст са самоограничаващи се, като характерно при тях е постепенното изчезване на пристъпите в постнаталното развитие. Съществуват обаче състояния с по-тежък фенотип, при които след старта на пристъпите, най-често генерализирани, се наблюдава постепен спад в НПП в резултат от абнормната епилептоформена активност. Тези тежки епилептични състояния се наричат епилептични енцефалопатии (ЕЕ) и по същество представляват ГГЕ. Според дефиницията на ILAE, ЕЕ са състояния, при които епилептоформените абнормалности се явяват причина за прогресивното нарушение на мозъчните функции (107). Епилептични енцефалопатии са дотук описаните DS и GLUT1 DS. Всички ЕЕ се характеризират с генерализирани пристъпи, появяващи се в ранна детска възраст, които често се придружават от болести от аутистичния спектър (Autism Spectrum Disorders; ASD),

когнитивно-поведенчески, моторни проблеми и структурно-мозъчни аномалии. Прогнозата в повечето случаи е неблагоприятна. Както при ГГЕ, генетичните причини за изява на ЕЕ са разнообразни - засягат се както гени, кодиращи йонни канали (например SCN- генния клъстер, *KCNQ2*, *KCNT1*, *CACNA2D2* и други), така и гени, участващи във вътреклетъчната и междуклетъчна сигнализация (например *DNM1*, *STXBP1*, *DOCK7*, *ARHGEF9*, *PCDH*- генния клъстер), ензими (*WWOX*, *SZT2*, *PNKP*), рецептори за невротрансмитери (*GABRA1*, *GABRG2*, *GRIN2A*, *GRIN2B*), както и гени с важна функция в ранното развитие на ЦНС (*ARX*, *CDKL5*) (21,52,108). Дължат се както на точкови мутации в отделни гени, така и на хромозомни структурни аномалии и могат да са част от симптоматиката на хромозомни болести, например синдром на Down, синдром на Angelman/Prader Willi и други (109-111). В почти всички случаи на ЕЕ, мутациите се появяват *de novo*, в изолирани случаи без фамилна история. Добре охарактеризирани ЕЕ са синдром на Ohtahara, West синдром, синдром на Dravet, синдром на Landau- Kleffner, Lennox-Gastaut синдром и други (21,31,112, 113). Понякога се наблюдава еволюция от епилептогенно състояние с по-лек фенотип и добра прогноза към ЕЕ с регрес в НПР. Типичен пример е синдрома на Dravet (DS), част от спектъра на GEFS+ синдрома. Съществуват ЕЕ, резултат от мозъчни аномалии, както и метаболитни дефекти (например GLUT1 DS, хиперпролинемия, креатинов дефицит), или с други думи класификацията на ЕЕ е същата, както при ГГЕ.

За първи път генетичната причина за ЕЕ бива открита при проучване на деца с DS, при което се наблюдават *de novo* мутации в *SCN1A* гена при седем пациента (24). С разрабътването на широкообхватните молекулярно-генетични и геномни технологии, като микрочиповия анализ и масивното паралелно секвениране, се откриват и множество други гени и геномни райони, свързани с изявата на различни типове ЕЕ (52,114,115). Генетичната природа на тези заболявания е хетерогенна, мутации с *de novo* възникване в засегнатия индивид са най-често докладвани.

1.6.2. Промени в броя копия като причина за изява на ГГЕ/ЕЕ. Микроделеционни и микродупликационни синдроми

Делеции и дупликации на хромозомни сегменти, известни още като промени в броя копия (Copy Number Variations - CNVs) са една от генетичните причини за заболявания в развитието на ЦНС с комплексно унаследяване, в които се включват и ГГЕ (116). Промените в броя копия (CNVs) се дефинират като загуба или придобиване на сегмент от ДНК, вариращ по размер от една или няколко килобази (Kb) до няколко мегабази (Mb), а понякога засягат и цели хромозоми (три- или тетразоми, монозоми). Структурните вариации съставляват около 1,2% от вариациите в човешкия геном, сравнени с еднонуклеотидните полиморфизми (SNPs), които заемат около 0,1% от него (117). В зависимост от размера на засегнатия участък могат да се засегнат един, няколко или множество гени, а също така е възможно аберацията да не засяга генни райони. Част от CNVs се срещат с висока честота в общата популация, имат положително влияние върху

еволюцията и не причиняват заболяване. Друга част CNVs се срещат значително по-рядко и засягат гени от важно значение за нормалното ембрионално развитие на нервната система и по този начин се явяват причина за изява на болестни състояния като ГГЕ/ЕЕ. Рекурентни (повтарящи се) делеции и дупликации на хромозоми 15 (15q13.3, 15q11.2) и 16 (16p13.11) са асоциирани с около 3% от пациентите с ГГЕ (116,118). Копийни варианти в хромозомите са причината за изява или допринасящ фактор за малко повече от 8% от ЕЕ, идентифицирани до този момент (119). Въпреки това, същите CNVs се наблюдават и при асимптоматични носители от общата популация, както и при здрави родственици в рамките на едно семейство. Те биват класифицирани като рисков фактор за развитие на неврологично заболяване, не толкова като директна причина за наблюдавания фенотип. Асоциативно проучване показва, че приблизително един на всеки три носителя на CNV в 15q13.3 района ще развие ГГЕ (120). Промените в броя копия първоначално биват открити при пациенти с епилепсия и коморбидни аутизъм, ИД и шизофрения (121,122). Оказва се, че е по-вероятно CNVs да са генетичната причина за заболяването при случаи на ГГЕ с коморбиден ИД, отколкото при пациенти, които имат само ГГЕ или само ИД (120). Патогенни копийни варианти се откриват при повече от 10% от случаите на неизяснена епилепсия в комбинация с ИД, аутизъм и изоставане в развитието (123).

С развитието на геномните микрочипови технологии за търсене на CNVs, в последните години се откриха десетки нови микроделеционни/дупликационни синдроми (124,125). Тези заболявания включват както неврологична симптоматика, така и различни вродени аномалии – например засягане на системи като сърдечно-съдова, пикочно-полова, опорно-двигателна, структурно-мозъчни аномалии и други. Класически примери за микроделеционни/дупликационни синдроми са 15q11-q13 делецията, асоциирана със синдроми на Angelman и Prader-Willi (126), делеции и дупликации в район 22q11, свързани с велокардиофациален синдром, DiGeorge синдром и 22q11.21 дупликационен синдром (127,128), 7q11 делеция, асоциирана с Williams-Beuren синдром (129) и други. Всеки един от тези синдроми първоначално е бил описан на база сходни клинични характеристики, наблюдавани при група пациенти (подходът „първо фенотип“) и впоследствие са били открити генетичните причини, стоящи в основата им. Болшинството от микроделеционните/дупликационни синдроми са неясни и не могат да бъдат разграничени на базата на общи фенотипни характеристики. Затова при тях, чрез микрочиповите технологии се прилага подходът „първо генотип“, след което се дефинират на базата на откритите и асоциирани с тях CNVs. Чрез този подход през последните години биват открити много микроделеционни/дупликационни синдроми като например 15q24 микроделеционен синдром (130), 17q12 микроделеция/дупликация (131), 1p36 делеционен синдром (132) и други. По отношение на ИГЕ/ГГЕ, няколко изследователски групи откриват повтарящи се микроделеции в 15q13.3, които се асоциират съответно с ИД, аутизъм, шизофрения и с 3% от ГГЕ (116,121,133,134). Чрез подходът „първо генотип“ идентификацията на група пациенти със сходни геномни аберации позволява по-точно характеризиране на клиничните симптоми, свързани със съответния синдром, което пък позволява по-точна диагноза и индивидуализирана профилактика и терапия в бъдеще.

От друга страна, наблюдаваната коморбидност на епилепсията заедно с други невропсихиатрични проблеми като ИД, аутизъм, изоставане в развитието на речта в контекста на микроделеционните/дупликационни синдроми от една страна може да се дължи на засягането от аберацията на няколко гена с дозов ефект, а от друга да е резултат от явлението фенотипна плейотропия.

1.6.3. Фенотипна хетерогенност (плейотропия)

Много проучвания през последните години предполагат, че общи молекулни пътища стоят в основата на патогенезата на различни заболявания на нервната система (111,136,137), вземайки предвид високата коморбидност, наблюдавана при ИД и други когнитивно-поведенчески проблеми, в комбинация с епилепсия, аутизъм и шизофрения (138,139). Например, 70% от пациентите с аутизъм развиват също и ИД (140). Аутистични стигми имат между 15-35% от децата с епилепсия (141,142) и обратно - епилепсия се наблюдава при до 46% от пациентите с аутизъм, като е по-често наблюдавана при такива с коморбиден ИД (143). Независимо от вида унаследяване (моногенно или комплексно) или етиологията на възникване, при около 20% от случаите на ИД се наблюдават и епилептични пристъпи (144). Допълнително, пациенти с епилепсия на различна възраст показват тенденция към повишаване на риска от развитие на синдром на дефицит на вниманието и хиперактивност (ADHD), който присъства при 12-30% от случаите с епилептични пристъпи (145).

Явлението фенотипна хетерогенност или плейотропия се наблюдава както при случаи на идентифицирани еднонуклеотидни замени в редица гени, така и при патогенни CNVs, засягащи големи хромозомни райони. Например, *de novo* мутации със загуба на функция в *SCN2A* и *SCN8A* гените, кодиращи различни α -субединици на потенциал-зависими Na^+ канали в мозъка са идентифицирани при пациенти с ИД, аутизъм, епилепсия и атаксия (146,147). Допълнително, гени, отговорни за ремоделирането на хроматина и епигенетичната регулация на генната експресия, каквито са например *CHD8* (хромодомейн хеликаза ДНК-свързващ протеин), *MECP2* (метил CpG свързващ протеин), *AUTS2* (аутизъм-предразполагащ кандидат ген) са асоциирани с широк спектър невропсихиатрични заболявания (148). Мутации в гени, участващи в GABA трансмисията, разклоняването на дендритите в пре- и постнаталното развитие на ЦНС, синаптичната пластичност, невроналната миграция и невротрансмисия причиняват фенотипи като епилепсия, аутизъм и ИД (138,149). В допълнение, микроделеции/дупликации стоят в основата на патогенезата на невропсихиатрични фенотипи като ИД/забавяне в развитието, аутизъм, ADHD, епилепсия и шизофрения (122,150,151). Например, делеции в 16p11.2, както и дупликации в 16p13.3 и 15q11q13 райони са асоциирани, както с ASD, така и с епилепсия (152,153). Епилепсията, аутизма и интелектуалния дефицит са коморбидни симптоми на синдрома на Даун, туберозна склероза и други комплексни синдроми (154-157).

Още повече, мутации в един и същи ген биха могли да са асоциирани с повече от едно невропсихиатрично заболяване (111,158,395). Различните проявления на неврологичен фенотип при мутации в един и същи ген вероятно са резултат от стохастични процеси по време на ембрионалното развитие, разликата в генетичния фон при различните индивиди, както и ефекта на допълнителни мутации от различен тип в рамките на съответния геном. Например, делеции на гена *HCN1*, кодиращ цикличен нуклеотид-зависим калиев канал, причиняват ИД в комбинация с аутизъм, докато точкови мутации с придобиване на функция в същия ген причиняват ЕЕ с или без ИД и/или аутистични стигми (159). От друга страна, мутации в други K^+ канали са причина за изява предимно на епилепсия, понякога с или без ИД и ASD (160). Това предполага, че невропсихиатричните заболявания споделят някои базисни молекулни пътища, в които дефектните гени винаги ще водят до изява на различен невропсихиатричен фенотип, в зависимост от фактори на околната среда и индивидуалния генетичен фон.

Сравнителният анализ между множество различни проучвания показва, че някои мутации са асоциирани с широк спектър по тежест фенотипи не само в популацията, но и в рамките на едно семейство. Такава непълна пенетрантност и вариабилна експресивност е характерна както за еднонуклеотидни замени, така и за големи хромозомни копийни варианти, засягащи множество гени. Например, анализът за скаченост и таргетно търсене на мутации в гени, асоциирани с епилептични синдроми показва значителна клинична хетерогенност при фамилените форми на епилепсия в големи ромски фамилии в България с изразени интра- и интерфамилни вариации (395). Копийни варианти, показващи вариабилна експресивност и непълна пенетрантност на заболяването са делеции и дупликации в 1q21.1, 15q13.3, 16p11.2 и 16p13.11 райони (161-164). За повечето от тези райони структурни хромозомни аберации са причина за повишаване на риска от развитие на болести на ЦНС, каквито са ИД, ASD, ADHD, епилепсия и шизофрения. Тези заболявания, освен в изявата си, се различават значително и по тежестта, с която протичат. Факторите, стоящи в основата на тази екстремна клинична вариабилност са слабо проучени. Съществуват няколко вероятни обяснения за тези наблюдения при индивидите, носещи един и същи тип структурни изменения. Едно от тях е разликите в генетичния фон на всеки отделен индивид, като е доказано, че както честите, така и редките варианти в генома играят роля в модифицирането на фенотипа (165,166). Други фактори, които също оказват влияние, са епигенетичните промени и геномния импринтинг. Постоянно действащи фактори на околната среда, както и спорадични ефекти от тях биха могли да взаимодействат и да предизвикат промяна в експресията на гени, съответно и модификация на фенотипно ниво. Например, таргетни проучвания на хромозомен район 1q21.1 са допринесли за изясняване на фенотипната вариабилност при 1q21.1 микроделеционния синдром. Досега няма доказателства, че разлики в точките на счупване, метилационните места или в кодиращата последователност поне на два различни гена от регион 1q21.1 са причина за наблюдаваната фенотипна хетерогенност при този синдром (161). Също така, няма доказателства за ролята на допълнителни патогенни копийни варианти в малък брой изследвани семейства до този момент (167,168). Анализ на

експресията на повечето от уникалните гени, разположени в 1q21 региона (*PRKAB2*, *CHD1L*, *BCL9*, *ACP6*, *GPR89A* и *PDIA3P*) корелира с броя копия при съответния пациент, но не са открити разлики в експресията им между няколко пациенти, носещи делеция или дупликация в 1q21, за да може да се установят причините за разликите в изявата на заболяването (167). Подобно, делеции в 16p13.11 района са асоциирани с ИД, аутизъм, шизофрения и епилепсия (162). Отново, анализ на експресията на гени, разположени в района показва, че нивата на експресия на всички гени намаляват при седем пациента с делеция в 16p13.11 и изява на различни по форма и тежест епилепсии. Допълнително, секвенционен анализ на същите гени при тези пациенти не разкрива допълнителна мутация, която би могла да допринесе за разликите във фенотипа им (164). През 2010 година Girirajan и съавтори изследват хипотезата, че присъствието на допълнителен копиен вариант би могъл да модифицира фенотипа при геномните заболявания. Екипът изследва 2312 деца с изява на невропсихиатричен фенотип и вече идентифицирани патогенни CNVs в 16p11.2 региона, като открива, че 10% от децата носят допълнителна аберация с голям размер в генома си, като фенотипно те се различават от тези, носещи само конкретната 16p11.2 аберация. При някои от пациентите фенотипа е значително по-тежък, докато при други е съвсем различен от основно наблюдавания се (169). Предложената хипотеза за „втори удар“ предполага, че фенотипът се модифицира в резултат от допълнителна мутация, която може да е CNV или еднобазова замяна, засягаща ген/и, участващ/и в един функционален модул с генът, засегнат от първооткритата мутация в резултат или не от действието на фактори на средата. Хипотезата бива подкрепена и от наблюденията, че генетични фактори, първоначално асоциирани с един специфичен неврологичен фенотип, впоследствие се идентифицират при индивиди с други заболявания. Например, делеции в 15q13.3 са асоциирани с епилепсия, шизофрения и умствено изоставане (170).

Всичко това разширява обхвата на генетичните причини, стоящи в основата на ГГЕ/ЕЕ, което предполага един сложен генетичен фон с множество взаимодействия, специфични за всеки индивид, правещо задачата за точно идентифициране на генетичните основи на епилепсията и други невропсихиатрични заболявания изключително трудна.

1.7. Механизми на възникване на промените в броя копия (Copy Number Variations, CNVs)

Промените в броя копия, или CNVs представляват небалансирани хромозомни изменения, които включват загуба (делеции) или придобиване на генетичен материал (дупликации). Дефинират се като сегменти от ДНК с големина поне 1 Kb, чийто брой в генома може да варира, в сравнение с представителен референтен геном. Молекулните механизми за възникване на копийните варианти в генома включват рекомбинационни събития, каквито са процесите на неалелна хомоложна рекомбинация (Nonallelic Homologous Recombination - NAHR) и нехомоложно снаждане на краища (NonHomologous End Joining – NHEJ) като част от системата за поправка на ДНК, както и репликационно-

базираните механизми: прекъсване на репликационната вилка и смяна на матрицата (Fork Stalling and Template Switching - FoSTeS) и микрохомология- медираната индуцирана от прекъсване репликация (Microhomology-Mediated Break-Induced Replication (MMBIR)

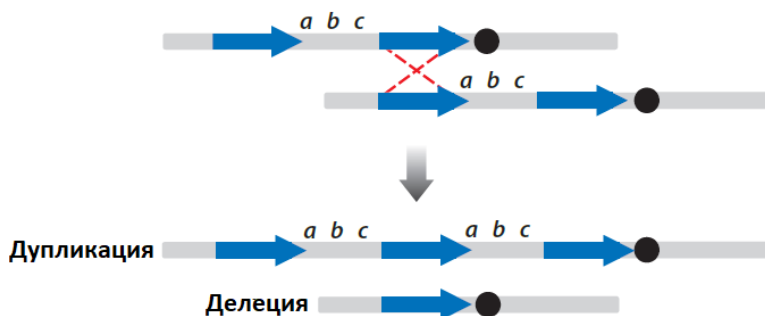
1.7.1. Неалелна хомоложна рекомбинация (Nonallelic Homologous Recombination, NAHR).

Според механизмите на възникване, съществуват два класа CNVs: рекурентни и нерекурентни. Рекурентните CNVs се получават чрез процеса на NAHR по време на мейозата, като се характеризират с общи точки на счупване (breakpoints - BP), които са съставени от нискокопийни повторени последователности (Low Copy Repeats- LCRs или сегментни дупликации), показващи помежду си над 95% хомология (171). Сегментните дупликации съставляват около 5% от хаплоидния човешки геном и по същество са ДНК фрагменти с големина >1 kВ, които съдържат високо хомоложни последователности, представени от две или повече копия в генома. Когато две копия от параложни LCRs са разположени на разстояние по-малко от 10 Mb едно от друго, би могло да се случи разместване на правилните позиции на хромозомите или хроматидите от една хромозома и в резултат - неравен кросинговър. Така се делетират/дуплицират уникални сегменти с еднакъв размер и локализация, разположени между съответните LCRs (Фигура 4). Чрез процеса на NAHR се формират рекурентни CNVs, които включват същият геномен интервал и които възникват независимо при неродствени индивиди (172,173). Някои LCRs имат по-сложна структура, изградена от множество модули с прави или обърнати повтори. В зависимост от ориентацията на последователността в модула и това какъв тип модул участва в неравния кросинговър (с прави или обърнати повтори), се получават различни мутационни събития: делеции/дупликации при тандемни (прави) повтори, или инверсии при обърнати повтори (173). Проучвания на рекомбинационни горещи точки в генома разкриват региони от LCRs с перфектна идентичност и с размер повече от 300 bp, които биват наречени впоследствие рекомбинационни горещи точки (recombination hotspots) (174,175). Целият човешки геном е осеян с такива точки, в които се извършва активно нормален кросинговър по време на мейозата, но тези места също така са потенциални точки за настъпване на NAHR. Така нормалните архитектурни характеристики на генома предразполагат към поява на геномни пренареждания с клинично значение.

1.7.2. Нехомоложно снаждане на краища (NonHomologous End Joining, NHEJ)

Нерекурентните CNVs се различават по точки на счупване при отделните индивиди и следователно са с различен размер (Фигура 5). Част от тях се получават чрез процеса на нехомоложно снаждане на краища (NonHomologous End Joining - NHEJ), който е един от процесите за ДНК поправка на двойноверижни счупвания в отговор на редица мутагенни фактори (йонизираща радиация, активни кислородни видове и други). Тези счупвания биват разпознати от специфични NHEJ репаративни белтъци, формира се мост, който бива

ензимно модифициран и в крайна сметка двата края на ДНК веригите биват лигирани. По време на стъпката на модификация на ДНК краищата, част от нейната последователност бива изрязана и като резултат от NHEJ се получават нерекурентни делеции. За процесът на NHEJ не е необходимо наличието на сегментни дупликации, или LCRs, тъй като разривът би могъл да засегне която и да било последователност от ДНК, в това число и кодиращата част на ген. Допълнително, чрез NHEJ биха могли да се формират и нерекурентни дупликации в случаите, когато по време на модификацията на краищата последователност от едната верига послужи за матрица за изграждане на един от краищата на повредената ДНК верига (176).

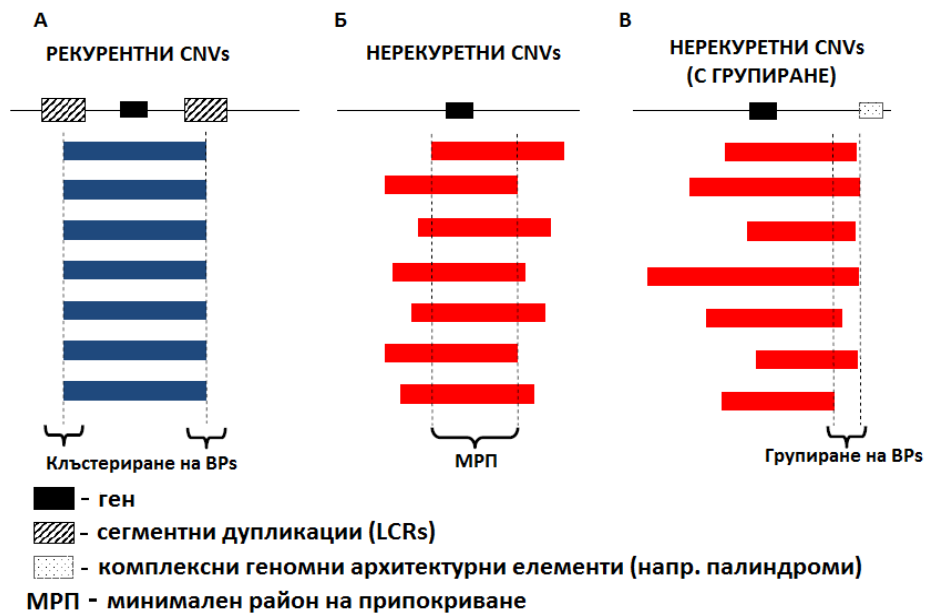


Фигура 4. Принцип на неалелната хромозомна рекомбинация (NAHR) – механизъм за генериране на рекурентни CNVs. Сините стрелки представляват райони на сегментни дупликации (или LCRs), показващи висока секвенционна хомология помежду си, които обграждат фрагмент с уникална структура, съдържащ гени, означени с *a*, *b* и *c*. Следва неалелно параложно удвояване на два такива LCRs с последващ неравен кросинговър, в резултат от което се получават два реципрочни продукта: една хромозома, носеща дупликация на уникалния район, съдържащ гените *a*, *b* и *c* и втора хромозома, с делеция на същите гени (адаптирана от Watson et al., 2014 (125)).

1.7.3. Прекъсване на репликационната вилка и смяна на матрицата (Fork Stalling and Template Switching, FoSTeS) и микрохомология-медирана индуцирана от прекъсване репликация (Microhomology-Mediated Break-Induced Replication, MMBIR).

Механизмът на прекъсване на репликационната вилка и смяна на матрицата (Fork Stalling and Template Switching - FoSTeS) представлява репликационно-базиран механизъм за ДНК поправка, който играе роля в генерирането на комплексни нерекурентни делеции и дупликации, прекъснати от райони с нормален брой копия или триплицирани сегменти. При този модел, за разлика от NHEJ, поправката е индуцирана от едноверижни разриви на ДНК или комплексни архитектурни особености на матрицата (кръстовидни структури например). В резултат от това се спира синтезата на ДНК в репликационната вилка, изоставащата верига се отделя от матрицата и се удвоява към друга репликационна вилка във физическа близост или на по-голямо разстояние, посредством микрохомология с 3'-края си, като синтезата на ДНК се възстановява (177). Друг подобен модел, наблюдаван

при моделни организми, е микрохомология-медираната, индуцирана от прекъсване репликация (Microhomology-Mediated Break-Induced Replication - MMBIR). При MMBIR реплициращата се верига сменя матрицата за синтез, показваща микрохомология с 3'-края ѝ, индуцирана от двойноверижни скъсвания на матричната ДНК верига (178). И при двата механизма, района на микрохомология би могъл да е на разстояние от няколко до хиляди бази от прекъснатата оригинална матрица. В зависимост от разположението на новата репликационна вилка (в посока или обратно на посоката на синтез), се получават съответно делеции или дупликации (179).

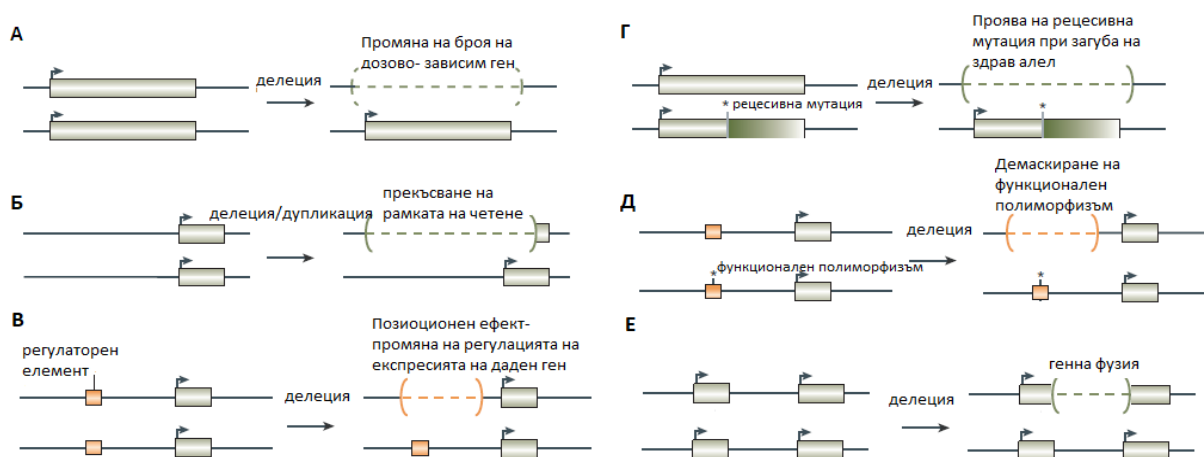


Фигура 5. Видове промени в броя копия (CNVs). А. Рекурентни CNVs с клъстерираните точки на счупване (BPs), които се характеризират с еднакъв размер и локализация. Резултат от процеса на NAHR; Б. Нерекурентни CNVs, чийто BPs са пръснати на неопределени места в един геномен район. Тези пренареждания споделят минимален район на припокриване (МРП), съдържащ гена/ите, чийто дозов ефект е необходимо условие за изява на съответния фенотип и заради който тези CNVs са били установени; В. Нерекурентни CNVs с групиране на една от BPs, което е различно от клъстерирането на BPs, като е провокирано от архитектурни особености на генома (например палиндромии или кръстовидни форми). (адаптирана от Gu et al., 2008 (176)).

1.8. Ефект на вариациите в броя копия върху фенотипа

В контекста на клиничната патология, в зависимост от разположението и големината на даден копиен вариант, се наблюдават различни последствия върху експресията на определен ген или множество гени. CNVs могат да оказват влияние върху фенотипа основно чрез промяна в генната експресия. Съществуват няколко възможни механизма, чрез които това би могло да се случи (Фигура 6):

- Ако засегнатия ген има дозова чувствителност, това би довело до изява на патологичен фенотип (дозов ефект), поради недостатъчното или прекомерно количество от иРНК и съответно белтъчен продукт (фигура 6А - на фигурата е показана само делеция).
- Прекъсване на рамката на четене на даден ген, който има дозова чувствителност (фигура 6Б).
- Позиционен ефект при загуба или придобиване на регулаторна последователност. Тези регулаторни последователности понякога отстояват на милиони бази от гена, чиято експресия регулират. Следователно, при непроменена последователност на гена, промяната в броя копия индиректно повлиява генната му експресия (фигура 6В).
- Проява на рецесивна мутация или функционален полиморфизъм при загуба на функция на „здравия“ алел посредством делеция или транслокация (фигура 6Г, 6Д).
- Генна фузия в точките на счупване, представлява мутация с придобиване на функция, най-често в резултат от делеция и получаване на нов транскрипт от гена с променено екзонно съдържание, или фузия с последователност от друг ген или друга регулаторна последователност (фигура 6Е).



Фигура 6. Модели на ефекта на CNVs върху фенотипа. Поясненията са дадени в текста. Хомоложните хромозоми са означени с непрекъснати линии; абстрактният хромозомен интервал е ограден със скоби; всеки ген е означен със сив, хоризонтален правоъгълник; регулаторните елементи – с оранжев правоъгълник; със звезда са означени точковите мутации. (адаптирана от Feuk et al., 2006 (180) и Lupski and Stankiewicz, 2005 (181)).

За оценката на ефекта на вариациите в броя копия върху експресията на гените са необходими допълнителни проучвания чрез моделни системи на клетъчно и организмено ниво. До момента не са проведени много изследвания, целящи изясняване ролята на CNVs чрез проследяване експресията на гените и влиянието им върху болесния процес.

1.9. Методи за идентифициране на CNVs

През последните години микрочиповите технологии дадоха началото на така нареченото молекулно кариотипиране, позволяващо търсене на микрохромозомни аберации с много малък размер на геномно ниво. Преди тяхното въвеждане, стандартните цитогенетични техники като **Гимза- оцветяването на хромозомите** се използваха като еталон в клиничната практика. Хромозомният цитогенетичен анализ идентифицира числени и структурни хромозомни аберации чрез директно микроскопско броене на хромозомите, както и чрез микроскопски анализ на лентовите им профили на оцветяване през метафаза (класически кариотип) или през прометафаза (високорезолютивен кариотип) на митотичния цикъл. Чрез кариотипният анализ могат да се идентифицират мозаицизъм, както небалансирани и балансирани хромозомни изменения, но не по-малки от 3-10 Mb. Заедно с ниската си резолюция, този метод има и други недостатъци – трудоемък е и изисква високо специализирани умения.

1.9.1. Флуоресцентна ин ситу хибридизация (Fluorescence In Situ Hybridization, FISH)

Флуоресцентната ин ситу хибридизация (FISH) е ново поколение молекулярна цитогенетична техника, използвана за изследване на специфични геномни райони с много по-малък размер, отколкото Гимза - оцветяването, използвайки специфични сонди - таргети върху хромозомите. Техниката на FISH има широка приложимост в клиничната практика, тъй като чрез нея може да се идентифицират балансирани хромозомни преустройства (инверсии, транслокации) и мозаицизъм. Детекцията на подобни изменения позволява прецизна оценка на рекурентния риск в такива семейства и дава по-точна преценка за необходимостта от пренатална диагностика. Техниката на FISH първоначално бива прилагана за детекция на добре познати делеционни синдроми, каквито са DiGeorge и Williams-Beuren. Днес, в зависимост от използваните проби за хибридизация (BACs, PACs, фосмиди, олигонуклеотиди) и субстратите за анализ (метафазни или интерфазни хромозоми, отделни хроматинови нишки) могат да се изследват ДНК фрагменти с различна големина, която понякога достига до 10 Kb. Следващи подобрения на технологията включват така наречения множествен FISH (M-FISH) и спектралното кариотипиране (SKY), където всички хромозоми се оцветяват с различни флуоресцентни багрила в рамките на един експеримент, което позволява изучаването на комплексни хромозомни изменения, характерни за различни типове солидни тумори (182). Въпреки ценното приложение на FISH методологията, тя е изключително трудоемък, времеемък и труден за автоматизиране метод. Следователно би могъл да бъде приложен само за ограничен брой проби и не е подходящ за рутинната клинично-лабораторна практика.

В този смисъл биват разработени алтернативни хибридизационно-базирани подходи за таргетно търсене на промени в броя копия, каквито са количествения PCR в реално

време (qPCR) и мултиплексен амплификационен анализ на лигирани проби (Multiplex Ligation - Dependent Probe Amplification - MLPA).

1.9.2. Количествен PCR в реално време (qPCR)

Количественият PCR в реално време (qPCR) представлява количествен метод за определяне на брой копия чрез PCR амплификация на тестова ДНК, сравнена с профила на контролна ДНК. Базира се на принципа, че в определен PCR цикъл (Ct) количеството на натрупания таргетен ампликон достига един фиксиран критичен праг (threshold), който съответства на изходното количество ДНК матрица. Колкото по-голямо (дупликация) или малко (делеция) е изходното количество матрица, толкова по-рано или по-късно ще наблюдава увеличение на флуоресцентния сигнал, съответно ще бъде достигнат критичния праг (Ct) в по-ранен или по-късен етап от PCR реакцията. Експериментът PCR в реално време се провежда в PCR машина, разполагаща с оптична система за възбуждане на флуоресцентните багрила и детекция на емисионните им спектри светлина. Предимства на метода са ниската цена на експеримента и лесния дизайн на праймери, комплементарни на разнообразни райони по желание на изследователя. В съчетание с ниската си цена и бързина на изпълнение, метода показва и висока чувствителност и специфичност, което го прави подходящ за рутинната клинична практика (183).

1.9.3. Мултиплексен амплификационен анализ на лигирани проби (Multiplex Ligation - Dependent Probe Amplification, MLPA)

Друг хибридационно-базиран метод се явява MLPA анализа. При него също се използват сонди - къси секвенции, комплементарни на специфичен район от ДНК, най-често представляващ част от екзон на даден ген. Подробности, свързани с принципа на метода са описани в раздел Материали и методи, MLPA. Както методът FISH, така и MLPA анализа са способни да детектират копийни варианти в региони, където хибридира съответната сонда и които са по-големи от сондата, която се използва. Следователно, чрез двата метода не е възможно да се определят границите на делецията/дупликацията, както и да се сканира целият геном, тъй като сондите се подбират спрямо известна последователност от генома. Методът MLPA е бърз, чувствителен, относително евтин и лесен метод, но има допълнителни недостатъци: сложен дизайн на пробите, технологията е изключително чувствителна на контаминации (186).

Както FISH техниката, така и MLPA и qPCR в реално време изискват предварително познаване на изследваната последователност в съответния хромозомен район, неспособни са да идентифицират нови мутации и не са подходящи за изследвания на геномно ниво.

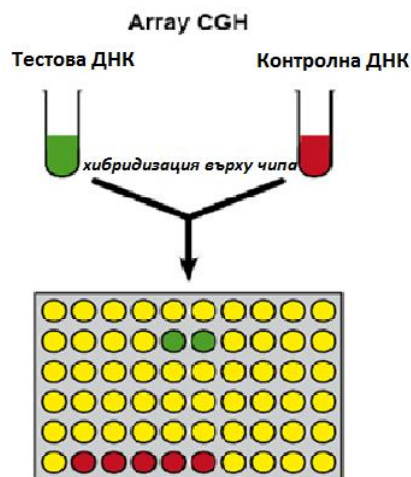
Този недостатък се избягва чрез използването на микрочиповата технология за **сравнителна геномна хибридация, array Comparative Genomic Hybridization (aCGH)**, разработена през края на миналия век основно за анализ на туморни проби (187,188).

1.9.4. Микрочипова сравнителна геномна хибридизация, array Comparative Genomic Hybridization, aCGH)

Първите микрочипове представляват големи геномни ВАС (bacterial artificial chromosomes) или РАС (P1 artificial chromosomes) клонове с дължина от 80-200 нуклеотида, автоматично прикрепени към твърда повърхност. Първата диагностична aCGH платформа се състои от около 3000 ВАС клон с резолюция, достигаща до 1 Mb и използвана за изследване на пациенти с ИД и множествени вродени аномалии (189). През 2004 година се разработват и представят така наречените ВАС “tiling” микрочипове, които се състоят от припокриващи се ВАС клонове, което позволява резолюцията да се увеличи грубо до 100-150 Kb (190). Един от недостатъците на ВАС микрочиповете е, че поради голямата дължина на фрагментите, те съдържат много повторени последователности, което може доведе до неспецифична хибридизация. Допълнително, ВАС микрочиповете са неспособни да определят с точност точките на счупване на аберацията. Заради тези недостатъци, по-късно ВАС клоновете постепенно биват заместени от по-къси комплементарна ДНК клонове (кДНК), PCR ампликони и накрая от олигонуклеотидни проби, използвани широко и до днес (191,192). Изполването на по-къси секвенции и увеличаването на броя им позволява драстично покачване на резолюцията на чипа. Олигонуклеотидните проби представляват едноверижни ДНК последователности с дължина 25-85 ндв, имобилизирани върху силициева мембрана или зрънца, разположени върху стъклена пластинка, или чип. Съществуват чипове с различна резолюция, която зависи основно от броя на олигонуклеотидните проби и геномната позиция на всяка една от тях. Понастоящем съществуват достъпни олиго-чипове, съдържащи един милион имобилизирани клонове, което позволява детекцията на хромозомни изменения с размер до няколко килобази, както и по-прецизно определяне на границата на аберацията. Всъщност, съществуват описани олиго-чипове по дизайн на изследователя, съдържащи 4,2 милиона сонди (193).

Някои от болестотворните аберации са толкова малки, че е невъзможно да бъдат детектирани чрез стандартните микроскопски цитогенетични техники, каквито са FISH, Гимза - оцветяването на хромозомите, MLPA техниката, както и ВАС микрочиповете. Този проблем се избягва с използването на олиго-aCGH технологията. Методът на aCGH, наречен още хромозомен микрочипов анализ, позволява скрининг на значителна част от генома за наличие на CNVs в рамките на единичен експеримент. Принципът на метода се състои в белязване на ДНК от тестова и референтна проба с различни флуорохромни багрила, след което се смесват и хибрилизират върху чипа, съдържащ имобилизирани множество къси 60-мерни олигонуклеотидни сонди, представляващи специфична последователност от генома. На принципа на конкурентната хибридизация тестовата и контролната ДНК се свързват с тези повтори и впоследствие дават сигнали с различен интензитет на светене. В зависимост от това коя ДНК свети повече (тестовата или контролната), чрез биоинформатични подходи се преценява дали в таргетния район има делеция или дупликация на генетичен материал (Фигура 7). За разлика от дотук описаните

методи, микрочиповият анализ има най-високо резолутивна способност – чрез него е възможно да се идентифицират копийни варианти от порядъка на 1 Кб. Съществуват различни микрочипови платформи, които дават различна резолуция на генома. Това прави метода изключително подходящ за скрининг на пациенти с интелектуален дефицит, епилепсия, други невропсихиатрични проблеми и вродени аномалии, където причина за изявата им се явяват CNVs с размер извън обхвата на останалите хибридационни - базирани методи за детекция (116,118,119,194-198).



Фигура 7. Общ принцип на сравнителната геномна хибридизация (aCGH). Различните интензитети на светене на тестова и контролна ДНК върху чипа дават информация за това дали има делеция или дупликация на генетичен материал от съответния клон върху чипа.

Въпреки, че днес микрочиповият хромозомен анализ се препоръчва като първи подход в клиничната диагностика при съмнение за хромозомни аномалии, чрез него не може да се идентифицират мозаицизъм, балансиран хромозомни изменения (инверсии, балансиран транслокации), както и унипарентна дизомия (UPD) и загуба на хетерозиготност (LOH). Унипарентната дизомия представлява унаследяване на две копия от дадена хромозома или част от хромозома само от единия родител. В зависимост от това дали са унаследени две идентични копия от хромозомата или две хомоложни хромозоми от един и същ родител, се различават изодизомия и хетеродизомия съответно. Явлението загуба на хетерозиготност е резултат от наличието на дълги непрекъснати участъци в генома, съдържащи хомозиготни алели на гени, като тези с клинично значение са с дължина между 3 и 10 Mb (199). В контекста на клинична изява на UPD и LOH, тези явления биха имали патогенен ефект ако в засегнатия район са разположени импринтирани гени с важно функционално значение, имащи различна експресия в зависимост от родителския си произход, или ако се демаскират скрити автозомно рецесивни мутации (199,200). За да компенсират тези недостатъци на ДНК микрочиповите технологии, някои компании (например Agilent technologies) създават така наречените SNP

микрочипове, които комбинират технологията на aCGH с допълнителни полиморфни еднонуклеотидни маркери, с което се позволява детекцията на UPD и LOH (201). Еднонуклеотидните полиморфизми (single nucleotide polymorphisms - SNPs) съставляват значителна част от генетичните вариации в човешкия геном и чрез SNP чиповете може да се генотипира значителна част от генома или екзома на конкретен индивид в единичен експеримент. Обикновено производителите на SNP микрочипове белязват двата алела А и Б с две различни багрила, което означава, че конкретния индивид би могъл да има АА, АБ или ББ генотип в съответното SNP място. Както при aCGH технологията, SNP чиповете представляват къси олигонуклеотидни секвенции и тяхната резолюция основно зависи от броя имобилизирани сонди върху чипа и геномното разстояние между всяка една от тях (202). За разлика от aCGH, при SNP микрочиповете не се изисква едновременна хибридизация на две проби, а тестовата ДНК се сравнява биоинформатично с референтен файл. Въпреки допълнителния обхват на изследване, който дават SNP микрочиповете, някои проучвания намират, че aCGH технологията показва по-висока чувствителност при търсенето на копийни варианти (203,204). Други автори твърдят, че и двете платформи са със съизмерима чувствителност на детекция на CNVs и биха могли да се прилагат отделно или съвместно в клиничната диагностика на пациенти със сходни клинични показания (205,206).

Въпреки, че aCGH технологията е неспособна да намира небалансирани хромозомни изменения и нискостепенен мозаицизъм (<10%), тези типове хромозомни аберации съставляват само 0.3% от пациентите с ИД, изследвани чрез кариотипен анализ (207). По отношение на небалансираните изменения като причина за изява на невропсихиатрични заболявания, влючващи ИД, Гимза - кариотипирането може да идентифицира структурни изменения не по-малки от 3Mb, които са генетичната причина за заболяване само при около 5% от пациентите с подобен фенотип. Появата на микрочиповите технологии и тяхната по-висока резолютивна способност позволи откриването на множество микроделеционни/дупликационни синдроми, останали скрити до този момент от конвенционалните цитогенетични техники. Това доведе до повишаване на диагностичния добив при случаите на ИД в комбинация с изоставане в развитието, допълнителни невропсихиатрични проблеми и нормален кариотип до приблизително 20% (208,209). В резултат на това, сегашните препоръки относно хромозомния микрочипов анализ са използването му като първи диагностичен подход при деца с вродени аномалии, ИД/изоставане в развитието в комбинация с ЕЕ и/или аутизъм (207,210). Наскоро Miller и съавтори, които са част от Международния Консорциум за Стандартизиране на Цитогеномни Данни (the International Standards for Cytogenomic Arrays (ISCA) Consortium) ревизират 33 доклада, съдържащи микрочипови данни при 21 698 пациента и достигат до консенсусното решение, че микрочиповия анализ трябва да е първия геномен подход при индивиди с невропсихиатричен фенотип и множество вродени аномалии, тъй като дава по-добър диагностичен добив, отколкото досега прилаганите методи за търсене на CNVs (207). Скоро след това този факт бива потвърден от няколко независими проучвания при пациенти с идиопатична епилепсия, изоставане в развитието и ИД (34,211,212).

Хромозомният микрочипов анализ бива предложен и за първи диагностичен подход при пациенти с неясна ГГЕ и допълнителни неврологични проблеми, където първоначалната клинична преценка не успява да даде предполагаема диагноза. Авторите демонстрират 10% честота на откриваемост на патогенни копийни варианти в изследваната група недиагностицирани пациенти (212). Допълнително, Соорег и съавтори конструират CNV карта на заболяемостта чрез анализ на микрочипови данни на повече от 15 000 пациенти с изоставане в развитието, ИД и различни вродени дефекти, сравнявайки ги с геномния профил на повече от 8000 контролни индивида (210). Проучвания, свързани с шизофренията, едно от мултифакторните психиатрични заболявания, описани до момента, потвърждават ролята на CNVs в патогенезата на това заболяване (133,150,213). В допълнение, aCGH анализа бива широко използван за изучаване генетичните причини, свързани с изявата на други невропсихиатрични болести, като аутизъм, биполарно разстройство, синдром на дефицит на внимание с хиперактивност, епилепсия, ИД, тъй като при тях се наблюдава висока степен на унаследяване и се предполага генетична компонента, играеща роля в изявата им (119,122,151,152,157,214-219). Честотата на откриваемост на патогенни CNVs варира от около 8 до 25% при различните изследвани кохорти, но това основно зависи от избраните критерии за селекция, избора на микрочипова платформа, прилагането на други методи за изключване на различен тип мутации, както и разликата в интерпретацията на резултатите. Ето защо, за съпоставителен анализ, както и от клинична гледна точка, е от изключителна важност да бъдат установени универсални критерии за селекция на пациентите, класификация и интерпретация на клинично значимите варианти в генома.

Най-общо, адаптирането на микрочиповите технологии за анализ на промени в броя копия в ДНК в научно-изследователските и диагностични лаборатории има голямо влияние върху развитието на медицинската генетика, позволявайки както повишаване яснотата на генотип-фенотипните корелации при известни заболявания, така и в идентифицирането на нови синдроми (124,125). В допълнение, чрез микрочип - базираните методи е възможно да се откриват нови гени, пряко отговорни за изявата на даден синдром, чрез стесняване на критичния аберантен геномен район при пациенти с припокриващ се генотип и фенотип.

1.9.5. Секвениране от ново поколение (Next Generation Sequencing, NGS)

Секвенирането от ново поколение или масивното паралелно секвениране (NGS) е технология, базирана на няколко принципа, при които се секвенират милиони ДНК матрици, представляващи уникална последователност от генома. Технологията NGS има висока възпроизводителна способност, позволяваща дълбоко секвениране на множество участъци от генома или целия геном. Днес технологията се използва за търсене на редки SNPs като причина за изява на редица генетични заболявания. Амплифицираните ДНК секвенции с дължина между 50-250 бдв първоначално се картират върху референтен геном, след което чрез специфични програми се намират статистически значимите

уникални варианти в генома. За разлика от секвенирането по Сангер, при което се получава единична ДНК последователност в рамките на една реакция, най-често представляваща единичен екзон на ген, тук паралелно се генерират секвенциите на екзоните на стотици гени, а понякога на целия екзом или геном. NGS технологиите могат да се използват за секвениране на целия геном (Whole Genome Sequencing - WGS), цялата кодираща част от генома (Whole Exome Sequencing- WES), или таргетно секвениране на специфични локуси или група гени (Clinical Exome Sequencing - CES). Цялостно-геномните и екзомни данни обикновено имат по-малко покритие на генома (8-30 пъти), докато при таргетното секвениране покритието е значително по-голямо (1000 пъти или повече), позволяващо по-прецизна оценка на намерените варианти.

Повечето NGS приложения целят намирането на SNVs (single nucleotide variants), но в последните години, с конструирането на множество биоинформатични алгоритми, стана възможна и детекцията на големи структурни хромозомни вариации от NGS данни (220,221). Информация за структурни варианти може да се екстрахира както от цялостно геномни и екзомни NGS данни, така и от данни, получени от таргетно новогенерационно секвениране. За целта се използват няколко различни подхода, всеки от които използва различни алгоритми за определяне, например:

- Покритие на прочитите (read coverage method) - базира се на допускането, че броя прочити на определен геномен район трябва да се бъде повторен определен брой пъти, пропорционален на броя пъти, в които този регион се среща в изходната ДНК проба. Чрез този подход най-често се търсят CNVs от данни, получени чрез таргетно секвениране, но може да се прилага и върху цялостно-екзомни или геномни данни. Съществуват няколко алгоритъма, използващи този подход за определяне на CNVs (222-224).
- Метод на прекъснатите прочити (split-read method) – базира се на принципа на сдвоени краища (pair-end reads), а именно всяка една секвенция, представляваща къс прочит от генома, в единия си край хибридизира напълно с част от референтния геном и служи като „котва“, а с другата съвпада неточно със последователност от изследвания геном, която би могла да се намира на голямо разстояние и да съдържа копиен вариант или BPs на структурна аберация (225).

За детекцията на CNVs се използват различни компютърни алгоритми, базирани на единия от двата подхода. Никой от конструираните до този момент алгоритми обаче не е сподобен да определи целия спектър от структурни варианти в генома с висока специфичност и чувствителност. Например, методите, базирани на покритието на прочитите могат да определят CNVs, но резолюцията им не е адекватна при картиране на точките на счупване. Допълнително възникват трудности при определяне на CNVs от таргетен екзомен анализ поради прекъснатата природа на анализирания геном и високото съдържание на GC повтори. Подходът с прекъснатите прочити показва ниска специфичност в региони с повторени елементи (226). Съществуват комбинирани софтуерни продукти, способни да търсят структурни варианти и чрез двата подхода (227, 228), но като цяло, до днешна дата е невъзможно да се използва един единствен софтуер, покриващ целия спектър от хромозомни структурни вариации. В този смисъл,

определянето на CNVs от NGS изисква внедряване и поддръжка на множество високо специализирани и скъпи биоинформатични софтуерни продукти, което го прави труден и скъп подход за рутинно използване в клинично-диагностичната практика.

1.10. Критерии за оценка и класификация на откритите варианти в генома

Резултатите от генетичния и геномен анализ имат огромно значение както за пациента в контекста на последващи решения относно подходи за неговото лечение и начин на живот, така и за поколението и семейството му. Оценката и интерпретацията на откритите варианти в неговия геном са голяма отговорност на лекаря - изследовател, който трябва да даде правилна генетична диагноза, да прогнозира потенциалната предразположеност към заболяване, да проведе генетично консултиране с цел правилно семейно планиране и да назначи лечение, ако е възможно такова. В повечето случаи, интерпретацията на генетичните резултати бива провеждана от молекулярен генетик, който сравнява геномното съдържание на съответния резултат с наличната литература до момента и прави недвусмислена и достатъчно информативна интерпретация на резултата, съгласувана с публикуваните данни от множество лаборатории по света. За да подпомогне този процес, както и с цел унифициране на критериите за интерпретация на геномни резултати от секвенционен и микрочипов анализ Американския Колеж по Медицинска Генетика (American College of Medical Genetics - ACMG) публикува професионален наръчник и препоръки за оценка и интерпретация на еднонуклеотидни варианти и промени в броя копия от ДНК (229,230).

1.10.1. Оценка на патогенността и класификация на откритите еднонуклеотидни варианти

Предложените критерии за интерпретация и класифициране на секвенционни варианти се базират на информацията, получена от базите-данни, от предикционните програми, функционални изследвания, данни за проведен сегрегационен анализ, допълнителна информация в литературни източници, както и от вида на мутацията (230). Например, мутации със загуба на смисъл, с промяна на рамката на четене, едноекзонни делеции или делеции на множество екзони се считат за недвусмислено увреждащи белтъчната структура и функция и в този смисъл се определят като патогенни. Мутации, които са възникнали *de novo* се считат за патогенни, ако родителите са здрави и няма фамилна история на заболяването, както и ако фенотипа на пациента съвпада с заболяването, асоциирано със съответния ген, в който е намерен варианта. Например, *de novo* мутация в *SCN1A* гена, разположена в трансмембранните домени на Nav.1.1 белтъка, е намерена при пациент с ГТКП и ИД, което предполага изява на DS. Или обратно, пациента има фамилна история на заболяването и намерения вариант сегрегира с фенотипа на всички засегнати членове в семейството. Информацията, получена от функционални анализи са друг съществен критерий за оценка на патогенността, но изследователя трябва да прецени доколко експерименталната среда би могла да наподобява естествената

биологична такава. Например, изследването на ензимната функция директно от биопсирана тъкан от пациента или от моделен организъм дава по-сигурна оценка за патогенност, отколкото експресията на ензима *in vitro*. Известно е, че определени домени от даден белтък са критични за изпълнението на неговата функция и всички мутации с промяна на смисъла в него се определят като патогенни. Тези домени също така не трябва да съдържат бенигнни варианти. Например, missense мутации, засягащи порообразуващите сегменти S4, S5 и S6 с изключително важна роля във функциите на Nav1.1 протеина, водят до изява на тежък DS фенотип, за разлика от мутации, засягащи други сегменти от него и водещи до по-леки форми на епилепсия от GEFS+ спектъра (57,58). Или новооткрита мутация, водеща до друга АК замяна на място, където има установен друг патогенен вариант не е достатъчно условие за класифициране на новия вариант като патогенен. Това се дължи на природата на новозаменената АК и на възможността новата замяна да е по-консервативна в сравнение с известния missense вариант, както и да води до по-различна патология.

- **Наличие на откритие варианти в световните бази-данни и литературни източници**

С развитието на геномните технологии за цялостно геномно и екзомно секвениране се увеличи драстично броя на открити нови еднонуклеотидни варианти в генома на човека, което затруднява преценката на патогенността на всеки един от тях. През последните години се създадох голям брой бази-данни, съдържащи големи масиви информация и с непрекъснато растящ брой варианти, открити в човешкия геном. Базирайки се на информацията публикува в тях, изследователя трябва да прецени и класифицира по най-правилен начин даден вариант. Популационните бази-данни съдържат информация за популационните честоти на даден вариант, получена от секвенирането на голям брой здрави контролни индивиди от една популация, или съвкупност от популации. Трябва да се има предвид, че в резултат от непълната пенетрантност и вариабилна експресивност на някои заболявания, те могат да съдържат и патогенни варианти от генома на привидно здрави индивиди, но неразвили патология. Определянето на популационната честота на варианта дава важна информация относно потенциалната му патогенност. Такива бази-данни са например:

- ➔ Проектът 1000 генома (<http://browser.1000genomes.org>), съдържаща SNPs, намерени при геномно и таргетно секвениране с ниско или високо покритие при 26 популации;
- ➔ Exome Aggregation Consortium (<http://exac.broadinstitute.org/>), съдържаща варианти, намерени при 61 486 екзома от различни популационни изследвания и проекти за специфични заболявания;
- ➔ Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS>), съдържаща варианти, открити при 6 503 екзома от Европейски и Африкански произход;

- ➔ dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), съдържаща варианти (обикновено с размер < 50 бдв) докладвани от различни източници, не винаги съдържа алелни честоти, или информация за източника.

Съществуват и друг вид бази-данни, съдържащи информация за еднонуклеотидни варианти (Single Nucleotide Variants; SNVs), открити при пациенти с различни заболявания, при които е направена оценка за патогенността им. Понякога вариантите са некоректно класифицирани, поради липса на достатъчно информация за тях. Затова, при оценката на даден SNV се използва съвкупността от информацията, налична както в различните бази-данни, така и тази, публикувана в литературните източници. Бази-данни, съдържащи варианти, асоциирани със заболяване са например:

- ➔ ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) - съдържа варианти с оценка на клиничното им значение, както и фенотипа на пациента, при който са намерени.
- ➔ Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM; <http://www.omim.org>) – съдържа информация за всички Менделови заболявания и над 15 000 гена, асоциирани с тях. Основният фокус е изследване на взаимоотношенията генотип - фенотип в контекста на заболявания при човека.
- ➔ Human Gene Mutation Database (HGMD; <http://www.hgmd.org>) – съдържа анотации на варианти, публикувани в литературни източници.

- **Използване на предикционни програми за оценка на патогенността на секвенционните варианти**

За допълнителна преценка на патогенността на различните типове варианти се използват *in silico* предикционни програми, повечето от които са свободно достъпни в интернет. Различните програми използват различни алгоритми, позволяващи предсказване на ефекта на дадена замяна на ниво РНК транскрипт или белтък. В този смисъл, има два типа категории предикционни средства – такива, които предсказват ефекта от сплайс - мутации върху протичането на сплайсинга на РНК и такива, предсказващи ефекта от missense замени в кодиращата част от ДНК върху структурата и функцията на резултатния протеин.

Ефектът на missense замените основно зависи от характеристики като еволюционната консервативност на АК, разположението и ролята ѝ във функционалността на белтъчната структура и биохимичните последствия от замяната на АК. Определянето на една или повече от тези особености на замяната се използва при дизайна на повечето от предикционните алгоритми. Тези алгоритми се характеризират с ниска специфичност, което оказва ефект в повишаването на фалшиво положителните резултати. Най-широко разпространените програми за предсказване ефекта на missense варианти са PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>), SIFT (<http://sift.jcvi.org>), Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org>), HOPE (<http://www.cmbi.ru.nl/hope>).

Също така, разработени са няколко софтуерни продукти за предикция протичането на сплайсинга, или по-точно създаването или загубата на сплайс места в екзон - интронните граници и/или специфични интронни *cis* сплайс-места (231,232). Най-общо, те имат висока чувствителност (90-100%) и умерено ниска специфичност (около 60-80%) в определянето на сплайс - абнормни позиции. Някои от сплайс - предикционните програми са например:

- Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF/>),
- NetGene2 Tool (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>),
- GeneSplicer (<http://www.cbcb.umd.edu/>).

Повечето от предикционните програми използват различни алгоритми за предикция. Следователно, по препоръки от ACMG, определянето на патогенността на даден секвенционен вариант трябва да бъде базирано на информация от няколко предикционни програми, а не използване на само една такава (230).

Американския Колеж по Медицинска Генетика (ACMG) предлага правила за комбиниране на накратко описаните критерии за оценка на секвенционните варианти, като според наличната информация те могат да се класифицират в няколко основни групи: патогенни, вероятно патогенни, бенигнени, вероятно бенигени и варианти с неясно значение (230).

- **Патогенни варианти** - към тази категория спадат така наречените нулеви варианти: мутации с прекъсване на рамката на четене, изместване на рамката на четене, засягане на консенсусно сплайс-място, едно- или няколкоекзонни делеции, причиняващи недвусмислено загуба на функция на генния продукт. Допълнителен критерий за причисляване към тази категория е *de novo* възникването на варианта при липса на фамилна история или косегрегацията му в семейство с няколко засегнати членове с подобен фенотип. Вариантът трябва да липсва в популационните бази-данни или трябва да присъства в повече болни индивиди със сходен фенотип. Също така, трябва да съществуват добре установени *in vitro* и *in vivo* изследвания, доказващи патогенния му ефект върху гена и неговия продукт. Множеството предикционни програми го определят като увреждащ белтъчната структура или нормалния сплайсинг. Мутациите с промяна на смисъла се считат за патогенни, ако водят до замяна на същата АК, както вече доказан патогенен вариант в същата позиция, но заменения нуклеотид е различен (например валин → левцин в резултат както на G>C замяна, така и G>T в същия кодон). Допълнително, missense вариантът трябва да се открива в район/ген, при който мутации с промяна на смисъла са характерна причина за развитие на съответното заболяване.
- **Бенигнени варианти** - алелните им честоти са високи (>5%) в популационните бази-данни (1000 генома, ExAc и други), наблюдава се липса на сегрегация при засегнатите членове на семейството, съществуват публикации за извършен функционален анализ,

в резултат от който не се наблюдава *in vitro* и *in vivo* ефект върху белтъка. Допълнително, повечето от предикционните програми определят варианта като неутрален върху белтъчната функция, или нормалния сплайсинг. Към тази категория спадат синонимните варианти с бенигнен ефект.

- **Вероятно патогенни и вероятно непатогенни варианти** - тези две групи категории са най-широкообхватни и включват SNVs, за които няма достатъчно събрана информация до момента с цел недвусмислено определяне на тяхната патогенност. Тези две категории включват най-често новоткрити варианти с недоказан ефект, които на по-късен етап биха могли да се класифицират като патогенни или бенигнени. За да бъде причислен към една от двете групи даден вариант, по препоръки трябва да покрива поне 90% от критериите за класификация в една от основните две групи (патогенни или бенигнени), но до този момент за него да липсва достатъчно информация за патогенния му ефект, и/или наличната информация в базите-данни и литературни източници е противоречива. В един бъдещ момент от време е възможно да бъде натрупана достатъчно статистическа информация и данни от експериментални изследвания за конкретния вариант и неговата патогенност да бъде преоценена.

1.10.2. Критерии за оценка и класификация на вариациите в броя копия

Съгласно препоръките на ACMG (229), микрочиповете трябва да са с такъв дизайн, че да осигуряват минимално покритие на целия геном с резолюция не по-малка от 400 Kb с по-високо обогатяване с олиго-проби в таргетните райони, съдържащи клинично-значими гени (такива с дозова чувствителност и субтеломерни райони, асоциирани с ИД, изоставане в развитието, аутизъм и вродени аномалии). Препоръките за интерпретация на резултатите са представени в таблица 1. За осъществяването ѝ изследователя трябва да има предвид няколко основни характеристики на дадено CNV. Според препоръките на ACMG, корелации относно размера и значението на CNVs не бива да се правят, тъй като съществуват много големи хромозомни аберации, които са непатогенни по природа, както и много малки такива, които са клинично значими (233-236). Всяка лаборатория сама решава какъв ще е минималния, взет под внимание размер на даден CNV, базирайки се на резолюцията на микрочиповата платформа, която използва и броя пациенти, който изследва. Друга важна характеристика, е съдържанието на гени в абериралия район, дали те са дозово - чувствителни и асоциирани със заболяване, или районът съдържа предимно псевдогени и повторени елементи.

Оценката на откритите CNVs се слага на база сравнение за наличието им в здрави контролни индивиди или в болни пациенти със сходен фенотип, публикувани в литературните източници и/или в различни бази-данни (OMIM, GeneReviews, DGV, DECIPHER, ClinVar, литературни източници и други).

Таблица 1. Препоръки за оценка на клиничното значение на CNV. Според критериите CNV се определят като патогенни, бенигнни или с неясно клинично значение. Адаптирана от Miller et al., 2010 (207).

Основни критерии		Патогенни	Бенигнни
Унаследяване	Идентичен CNV при здрав родител		X ¹
	Променен размер (най-често уголемен) на CNV, унаследена от родител	X	
	Идентичен CNV при болен родител	X	
CNV присъства в базите-данни и литературата	Докладван е в множество публикации или бази - данни като бенигнен вариант, срещащ се при здрави контроли		X
	Припокрива се с аберации от същия тип, размер и локализация, публикувани в бази данни при пациенти с подобен фенотип	X	
	Припокрива се с добре описан микроделеционен/дупликационен синдром	X	
Генно съдържание	CNV съдържа OMIM болестотворни гени	X ²	
	CNV е богат на гени	X	
	CNV е беден на гени		X
Второстепенни критерии ³			
Тип CNV	Хетерозиготна/хомозиготна делеция	X	
	Дупликация, съдържаща гени с неизвестна дозова чувствителност		X
	CNV представлява амплификация	X	
	Лишен е от известни регулаторни елементи с клинично значение		X

Бележки: ¹с някои изключения ; ²CNV трябва да води до същия фенотип, както е докладван като асоцииран със заболяване; ³наблюдавани са изключения за всеки един от критериите.

Най-общо, дадена аберация се счита за патогенна ако преди е описана при пациенти със сходен фенотип, възникнала е *de novo*, съдържа дозово-чувствителни гени и разположението ѝ е в район, свързан с известен микроделеционен/дупликационен синдром. В контекста на вида аберация, делециите са по-болестотворни, тъй като повечето гени показват дозова чувствителност. Въпреки това, някои гени са доза-зависими и в повече от две копия (дупликация или амплификация), тъй като натрупването на техния белтъчен продукт е цитотоксичен, или е възможно дупликацията да прекъсне рамката на четене и в крайна сметка да доведе до синтезата на аберантен продукт.

Дори и с тези препоръки правилна оценка не винаги е възможна, защото в някои случаи съществуват изключения. Например, много патогенни CNVs са редки, нерекурентни явления, което може да означава, че липсва достатъчно информация за тях в литературата, което затруднява оценката им. Също така, редките унаследени CNVs представляват предизвикателство пред изследователя, тъй като биха могли да се унаследяват от здрав родител, т.е. да се наблюдава непълна пенетрантност и вариабилна експресивност, но да са от важно клинично значение за съответния индивид със специфичен генетичен фон (например CNVs в райони 15q11.2, 15q13.3, 16p11.2, 22q11.21 и други). Друг пример е присъствието на втора мутация, недетектируема с микрочиповата технология, при което аберацията има допринасящ ефект върху фенотипа, но сама по себе си не е достатъчна за неговата изява (169). Допълнително, CNVs в некодиращите райони,

които са били считани за непатогенни, поради по-малко очевидния и трудно - проследим патомеханизъм, който предизвикват, могат да продуцират болестен фенотип чрез засягане регулацията на един или няколко гена, отстоящи на хиляди бази разстояние от тях (179).

Подобно на класификацията на секвенционните варианти, съгласно препоръките на ACMG, вариациите в броя копия трябва да се класифицират в три основни категории: патогенни, бенигнени и варианти с неясна клинична значимост.

- **Патогенни варианти** - Това са такива CNVs, при които дуплицираният/делетиран район и/или съдържащите се в него гени трябва недвусмислено да са асоциирани с търсения от изследователя болестен фенотип. Например, в нашето проучване това са райони/гени, геномни пренареждания, които са асоциирани пряко с ЕЕ, ИД, вродени аномалии и/или аутизъм. Патогенността им трябва да бъде подкрепена ясно от достатъчно сигурни данни в литературата, касаещи пациенти с подобен фенотип, които носят същата аберация с подобен размер и локализация, дори и да е известно, че в съответния район съществува непълна пенетрантност и вариабилна експресивност. Също така за съответния CNV трябва съществуват публикувани резултати от сегрегационен анализ, функционални тестове в моделни организми и клетъчни култури, както и данни за липса на варианта в здрави контролни индивиди. Тази категория включва копийни варианти, чийто размер е по-голям и не съответства точно на този, публикуван в литературата, но който покрива минимален интервал с ясно определена клинична значимост.
- **Бенигнени (непатогенни) варианти** - Тази категория включва копийните варианти, които се срещат с висока честота в общата популация. За да бъдат класифицирани като полиморфизми, те трябва да са описани при >1% от нея. Докладвани са в множество прочувания и се срещат в здрави контролни индивиди в базите-данни (например Database of Genomic Variants- DGV). Примери за бенигнени CNVs са тези, които засягат гените, кодиращи слюнчената амилаза (хромозомен район 1p21.1), обонятелните рецептори (разположени в различни хромозомни райони на всички хромозоми) или имуноглобулините (хромозоми 14 и 22) и други. Тяхната мутационна честота е висока и с положителен ефект от гледна точка на еволюцията.
- **Варианти с неясно клинично значение (Unknown Clinical Significance - UCS)** - В зависимост от наличната информация за тях до момента, UCS се подразделят на:
 - Вероятно патогенни UCS – описани са при единични пациенти с подробно - описан фенотип, с добре дефинирани BP са и съдържат гени, които биха имали роля в неговата изява.
 - Вероятно бенигнени UCS – CNV, несъдържащ гени в интервала си, но надхвърля размера, определен като критичен от съответната лаборатория. Допълнително, би могъл да е описан е при малък брой здрави контролни индивиди в наличните бази-данни, но не представлява чест полиморфизъм.
 - Некласифицируеми UCS – например, CNV съдържа гени, но няма никаква информация за това дали са дозово - чувствителни. Копийният вариант е описан в

много противоречащи си публикации и бази-данни и сигурни заключения за неговата патогенност все още няма.

Вариантите, включени в тази категория биха могли да бъдат преоценени в един по-късен етап и да бъдат включени към някоя от останалите категории. Практическото приложение на тази стратегия бива демонстрирано, като една и съща кохорта пациенти бива реанализирана (първо през 2010 и отново през 2012) и получените резултати показват статистически значима разлика в интерпретацията на резултатите (237). Процентът на CNVs, класифицирани като вероятно патогенни се повишава от 19% през 2010 на 31% през 2012 година. Причините за тази разлика са натрупаната нова информация, касаеща тяхната патогенност в литературните данни, детекцията на нови кандидат -гени, разположени в съответния район, както и рекартирането на референтната секвенция на човешкия геном (237).

2. Цел и задачи

2.1. Цел

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

2.2. Задачи

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

3. Материали и методи

3.1. Клиничен материал

В рамките на настоящото проучване бяха изследвани общо 208 пациенти (90 момичета и 118 момчета) на възраст от 0 до 28 години. 98 пациенти са с данни за фамилна история за епилепсия, а 110 са спорадични случаи. В таблица 2 са показани насочващите диагнози при изследваните групи пациенти.

Таблица 2. Насочващи диагнози на пациентите

Насочваща диагноза	Брой пациенти (n=208)
FS+/GEFS+	72
Dravet синдром (DS)	10
Миоклонично - астатична епилепсия (MAE)	10
Детска абсансна епилепсия (CAE)	7
Бенигнени фамилни неонатални конвулсии (BFNC)	13
Неонатална епилептична енцефалопатия 7 (EEEE7)	2
Синдром на GLUT1 дефицит	14
Неизяснена или генетична (идиопатична) генерализирана епилепсия (ГГЕ)	41
Генерализирана епилепсия в комбинация с интелектуален дефицит, разстройства в поведението, дисморфизми, мозъчни аномалии и други синдромни черти	39

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

- Клиника по Детска Неврология, Университетска Болница по неврология и Психиатрия „Св. Наум“, МУ-София, с главен насочващ лекар проф. д-р В. Божинова;
- Клиника по неврология, Университетска болница „Александровска“, МУ-София, с главен насочващ лекар проф. д-р И. Търнев;
- Детска неврологична клиника СБАЛДБ „Проф.Иван Митев“, МУ-София, с главен насочващ лекар проф. д-р И. Литвиненко;
- Клиника по педиатрия и генетични болести, УМБАЛ „Свети Георги“, Пловдив, с насочващи лекари проф. д-р И. Иванов и доц. д-р И. Пачева;
- Педиатрична клиника, Болница „Токуда“, София, България, с насочващ д-р Д. Христова;
- Болница по Педиатрия, Диагностично-консултативен център „Александровска“, МУ-София, с насочващ лекар проф. д-р Е.Симеонов.

По-голямата част от изследванията бяха осъществени по проект Грант ДТК/67/2009 „Съвременни подходи за разкриване генетичните основи на епилепсията“, финансиран от Фонд Научни Изследвания, Министерство на образованието и науката. Потвърдителният анализ чрез количествен PCR в реално време беше проведен в рамките на проекти № МУ359/2015, “Потвърждаване и сегрегационен анализ на потенциално патогенни хромозомни микроаберации при пациенти с епилепсия и умствено изоставане, открити чрез метода на сравнителната геномна хибридизация” и № МУ444/2016 “Количествен PCR в реално време на хромозомни микроаберации, открити при пациенти с комплексни епилептични синдроми чрез микрочипова технология”.

3.2. Биологични проби

От всеки пациент и неговите родители (където е възможно), след предварително подписване на информирано съгласие от родителите и попълване на въпросник от насочващия лекар (**Приложение 1, 2 и 3**), бе взета венозна кръв чрез затворена вакутейнер система при спазване на стандартните процедури за стерилност. За изолирането на ДНК кръвта бе събрана във вакутейнери с EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) (10 мл). След изолирането, ДНК от пациентите и техните семейства бяха съхранени в елуиращ буфер при -80°C в сектор БиоБанка на ЦММ, при стриктно спазване на изискванията за конфиденциалност.

3.3. Преданалитична обработка на пробите

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

Изолирането на ДНК от кръвни лимфоцити с Chemagen полуавтоматичната сепарираща система е базирано на използването на магнитни частици в присъствието на електромагнитно поле (Фигура 8). Магнитните частици се състоят от матрица от поливинилов алкохол, който в последствие се карбоксилира, за да може лесно да свързва лиганди като белтъци и нуклеинови киселини, съдържащи amino - групи. Високото съдържание на магнетит в частицата, съединение на желязото (Fe_3O_4), позволява разделянето на свързаната молекула – лиганд от разтвора на магнитен принцип.

Основни компоненти на системата Chemagic Magnetic Separation Module I (Chemagen) подвижен модул и магнитна глава (Фигура 8). Върху подвижният модул се поставят: контейнер с чисти крайници, епруветки с проби и епруветки с поредица от буфери. Магнитната глава носи метални крайници (родове), които имат способността да се намагнетизират. За изолиране на ДНК се използва специален набор от реактиви, който включва различни буфери, както и магнитни частици (M-PVA Magnetic Beads).



Фигура 8. Chemagen® magnetic separation station (PerkinElmer) система за изолиране на ДНК.

Техниката за изолиране на ДНК се провежда в следните етапи:

- **Получаване на клетъчно-ядрен лизат и разграждане на белтъците и РНК.** В 50 ml конични епруветки се излива между 7 и 10 ml кръв и се добавя 9 ml лизис буфер и 50 μ l протеиназа.
- **Свързване на ДНК с магнитните частици.** Към получения лизат се добавят 25 ml свързващ буфер и 800 μ l до 1ml (в зависимост от количеството кръв) поливинилов алкохол с магнитни частици (M-PVA Magnetic Beads (Perkin Elmer)).
- **Активиране на магнитното поле и миене на ДНК пробите.** В присъствието на активно електромагнитно поле частиците заедно с ДНК се привличат към металните родове на магнитната глава. Така захванати за металните накрайници, пробите биват пренесени в миеш буфер. Следва деактивиране на електромагнитното поле и ротация на накрайниците с цел максимално хомогенизиране на пробите, ново спиране на ротацията, активиране на магнитното поле и прехвърляне на пробите в следващия миеш буфер. Активирането на магнитното поле и миенето се повтаря общо пет пъти в различни по състав миеш буфери (с номера от 3 до 6).
- **Елуиране на ДНК.** Елуиращият буфер деактивира взаимодействието между магнитните частици и ДНК. Елуиращият буфер съдържа 10 mM TRIS-HCl с pH=8.0, аналогичен на TE буфер. Вместо елуиращ буфер може да се използва и dH₂O, но крайния добив ще бъде по-нисък.

3.3.2. Проверка на качеството на ДНК

3.3.2.1. Агарозна електрофореза

Качеството на получената високомолекулна ДНК беше определено посредством агарозна гел електрофореза върху 0.8 % агарозен гел и 1X TBE (TRIS - боратен буфер). Чрез електрофорезата се определя целостта на геномната ДНК и полуколичествено нейната концентрация, като се използват и молекулни маркери. Визуализацията на фрагментите е осъществена посредством използване на етидиев бромид с концентрация 0.05 $\mu\text{l/ml}$. Необходимите реактиви за извършване на агарозна гел електрофореза са представени в таблица 6.

3.3.2.2. Спектрофотометрично определяне на количеството и качеството на ДНК с помощта на NanoDrop (Thermo Scientific)

Методът се основава на специфичното поглъщане на светлина с дължина на вълната $\lambda = 260 \text{ nm}$ от пуриновите и пиримидиновите бази на ДНК и РНК. Абсорбцията при $\lambda = 280 \text{ nm}$ дава концентрацията на белтъците. Чистите ДНК проби имат A_{260}/A_{280} съотношение приблизително 1.8, като стойности под 1.6 показват наличието на примеси от белтъци, а над 2 - примеси от РНК. Съотношението A_{260}/A_{230} дава представа за съдържанието на други контаминиращи вещества, които абсорбират при λ_{230} или λ_{260} . Чистите проби имат съотношение на A_{260}/A_{230} в обхвата 2 - 2.2. Вещества, които поглъщат при λ_{230} са EDTA, въглехидратите и други. При контаминация с тях, съотношението A_{260}/A_{230} е понижено.

3.4. Аналитична обработка на биологичния материал

3.4.1. Намножаване на фрагменти ДНК чрез полимеразна верижна реакция (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Полимеразната верижната реакция е метод, разработен от Kary Mullis през 1985 година. Представлява *in vitro* ензимно размножаване (амплифициране) на определени нуклеотидни последователности в $5' \rightarrow 3'$ посока. ДНК фрагментът, който ще се размножава е ограничен в двата си края от къси нуклеотиди – праймери, комплементарни на $3'$ краищата на ДНК матрицата.

Полимеразната верижна реакция започва с продължителна денатурация, имаща за цел разделяне на двойноверижната ДНК. Амплифицирането на интересувания ни участък се осъществява чрез многократното повтаряне на три стъпки:

- **Денатурация (denaturation)** – термична денатурация, при температура между 90 - 97°C за пълно разделяне на двойноверижната ДНК на еднореижни ДНК матрици, необходими за процеса на амплификация.
- **Хибризация (annealing)** – хибризация между праймерите и комплементарните еднореижни участъци от матричната ДНК. Температурата на хибризацията е строго специфична и се изчислява в зависимост от базовия състав и дължината на праймерите по следната формула:

$$t^{\circ}\text{Cannealing} = A+T \times 2 + G+C \times 4$$

- **Елонгация (elongation)** – изграждане (синтез) на нова верига, комплементарна на матричната ДНК в посока 5'→3'. Температурата на този етап се определя от особеностите на ДНК полимеразата и най-често е около 72°C.
- **Крайна елонгация** - PCR реакцията завършва с крайна елонгация с цел да се осигури цялостно изграждане на някои частично синтезирани ДНК фрагменти.

За всяка PCR реакция са необходими:

- Еднореижна матрична ДНК, получена след топлинна денатурация на геномна ДНК;
- Термостабилна Taq полимераза - за първи път е изолирана от бактерията *Thermus aquaticus* и осъществява процеса на размножаване на определена ДНК последователност. Оптималната температура за синтез на Taq полимеразата е 72°C, а необходимата концентрация на ензима за амплификационната реакция е 1 до 5U.
- Праймери - синтетични олигонуклеотиди с дължина около 18-24 бдв, комплементарни на ограничаващите размножаваната последователност участъци. Оптималната концентрация на праймерите в амплификационната реакция е 0.1–1.0 µM. Праймерите, необходими за амплифициране на всеки един от екзоните на *SCN1A*, *KCNQ2* и *SLC2A1* гените, както и техните температури на хибризация (annealing) са представени в **Приложение 4, 5 и 6**.
- Дезоксирибонуклеотиди (dNTPs) – dGTP, dATP, dTTP, dCTP, задължително условие е четирите dNTPs да присъстват в еквимоларни количества в реакционната смес, като оптималната концентрация е между 20 и 200 µM за всеки нуклеотид.
- 10x реакционен буфер - осигурява pH на средата от 8.3 до 9.0 и необходимите йони за работа на полимеразата. Съдържа 10-50 mM Tris- HCl с pH 8.3 – 9.0; до 50 mM KCl, в някои случаи може съдържа от 0.5 до 5.0 mM MgCl₂.
- Диметилсулфоксид (DMSO) - органично серно съединение, използващо се за подпомагане на денатурацията на ДНК. Фрагменти, съдържащи голямо количество GC (гуанин и цитозин) нуклеотиди, формират вторични структури в ДНК и по този начин нарушават правилното разделяне на двете ДНК вериги по време на денатурация и пречат на последващата хибризация на праймерите. DMSO се свързва с цитозина и

по този начин дестабилизира двойноверижната структура на ДНК, което впоследствие води до увеличаване на добива от PCR продукта. DMSO беше използвано за амплификация на екзони 1 и 16 от *KCNQ2* гена и екзони 1 и 5-6 от *SLC2A1* гена (Таблица 3).

Използваните при PCR реакцията реактиви и условия са представени в **таблицы 3 и 4**. Амплификацията на екзони 5, 6, 7 и 8 от *SLC2A1* гена се извършва заедно в общ PCR фрагмент и поради по-голямата му дължина се използват различни PCR условия, представени в **таблица 5**. Праймерите, използвани за размножаване на всички екзони от гените *SCN1A*, *KCNQ2* и *SLC2A1*, температурите на хибридизация, както и дължината на ампликоните са представени в **Приложения 4, 5 и 6**.

Таблица 3. PCR реактиви, използвани за амплификация на екзоните от *SCN1A*, *KCNQ2* и *SLC2A1*

PCR на екзони 1 и 16 от <i>KCNQ2</i> гена и екзони 1 и 5-6 от <i>SLC2A1</i> гена		PCR на всички останали екзони от <i>SCN1A</i> , <i>KCNQ2</i> и <i>SLC2A1</i>	
PCR buffer (10x)	1 µl	PCR buffer (10x)	1 µl
dNTPs (10 nM)	0.8 µl	dNTPs (10 nM)	0.8 µl
primer F (10 pmol)	0.5 µl	primer F (10 pmol)	0.5 µl
primer R (10 pmol)	0.5 µl	primer R (10 pmol)	0.5 µl
DMSO	0.5 µl	-	-
Prime Taq (5 U/µl)	0.05 µl	Prime Taq (5 U/µl)	0.05 µl
H ₂ O	4.65 µl	H ₂ O	5.15 µl
ДНК матрица	2.0 µl	ДНК матрица	2.0 µl
Краен обем	10 µl	Краен обем	10 µl

Таблица 4. Условия за протичане на PCR реакцията

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	95 °C	10 мин	1
Денатурация	95 °C	30 сек	35
Хибридизация	55- 66°C*	50 сек	
Елонгация	72 °C	50 сек	
Крайна елонгация	72 °C	10 мин	1
Съхранение	10 °C	∞	-

* Температурата на хибридизация се определя експериментално и е различна за използваните при анализите праймери (Приложение 4-6)

Таблица 5. Условия за протичане на PCR реакцията на екзони 5-8 от *SLC2A1* гена

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	95 °C	10 мин	1
Денатурация	95 °C	40 сек	35
Хибридизация	63 °C	40 сек	
Елонгация	72 °C	2 мин	
Крайна елонгация	72 °C	10 мин	1
Съхранение	10 °C	∞	-

3.4.2. Качествен контрол на PCR реакцията

Качественият контрол се осъществява, като се залагат положителна и отрицателна контрола. Като положителна контрола за всяка PCR реакция се използва ДНК, при която е известно, че интересувания ни участък успешно се амплифицира. Липсата на продукт в положителната контрола показва, че амплификационната реакция не е протекла. Като отрицателна контрола се залага проба с всички компоненти на реакцията, с изключение на матрична ДНК, която се замества с dH₂O. Липсата на продукт в отрицателната контрола доказва, че реакционната смес не е замърсена с чужда ДНК матрица.

3.4.2.1. Хоризонтална агарозна електрофореза

Качеството на PCR продуктите се оценява на 2% хоризонтална агарозна електрофореза. Идентифицирането на фрагментите се извършва спрямо подходящ познат молекулен маркер с известна концентрация. Нанесените в агарозния гел ДНК проби се разделят в електрично поле. При слабо алкално рН, фрагментите са заредени отрицателно и се придвижват към положителния полюс (анод). Електрофоретичната подвижност на ДНК фрагментите се влияе силно от състава и йонната сила на използвания буфер. При ниска концентрация на йоните, електричното напрежение е минимално и ДНК фрагментите се придвижват по-бавно. За анализ и разделяне на PCR продукти, най-често се използва TRIS - боратен буфер (1X TBE). Визуализацията на фрагментите е осъществена посредством използване на етидиев бромид с концентрация 0.05 µl/ml и с помощта на UV трансилюминатор при 315 nm дължина на вълната. Резултатите се документират чрез фотодокументационна система. Реактивите, използвани при агарозната електрофореза са представени в таблица 6.

Таблица 6. Използвани реактиви в агарозната гел електрофореза

Използвани реактиви	Състав	Количество	dH2O
5 x TBE buffer (pH=8,0)	90 mM Tris HCl 90 mM борна киселина 1 mM ЕДТА	54 g 27.5 g 4.76 g	до 1000 ml
0.8% агарозен гел	Агароза TBE буфер	0,8 g 20 ml	до 100 ml
2% агарозен гел	Агароза TBE буфер	2 g 20 ml	до 100 ml
Етидиев бромид 10mg/ml	----	1 g	до 100 ml
Разтвор за нанасяне на пробите 10x	0.25% bromphenol blue 15% Ficol или 30% глицерол	0,25 g 15 g 30 g	до 100 ml

3.4.3. Директно секвениране (Секвениране по Sanger)

За директен прочит на нуклеотидната последователност на всички екзони от гените *SCN1A*, *KCNQ2* и *SLC2A1* беше използван метода на секвениране по Sanger. Той е референтен метод за директен ДНК анализ. При него определянето на нуклеотидната последователност на даден ДНК фрагмент става с помощта на автоматични лазерни секвенатори, работещи на принципа на полиакриламидната електрофореза. Методът се основава на свойството на дидезоксинуклеотидите (ddNTP) да прекъсват синтеза на ДНК на мястото на включването им. По този начин те маркират позицията на определена нуклеотидна база. При използването на ddNTP, комбинирано с PCR амплификация, се образуват голям брой фрагменти, които се анализират чрез електрофоретично разделяне според дължината им. Характерното за ddNTP е, че в трета позиция на рибозата липсва хидроксилната група, което не позволява ДНК полимеразата да синтезира ДНК. Получават се много различни по дължина PCR продукти, всеки завършващ с ddNTP. Получените PCR продукти се разделят чрез денатурираща полиакриламидна електрофореза и се визуализират. Разделянето от старта до мястото, на което се фиксира терминаторът с дадено ddNTP, определя мястото на съответния нуклеотид в ДНК секвенцията. Всеки един от ddNTP е маркиран с различно флуоресцентно багрило, излъчващо светлина с различна дължина на вълната. Директното секвениране протича в следните етапи:

- **Намножаване (амплификация) на търсения фрагмент чрез PCR-** PCR реакцията се извършва при оптималните условия за съответните праймери. Получените PCR продукти се оценяват на 2% агарозен гел. За да се премине към секвениране, получените продукти трябва да са чисти, без неспецифични допълнителни продукти.
- **Пречистване на PCR продукта чрез ExoSap-** Получените PCR продукти се пречистват с ExoSAP, с цел премахване на несвързани dNTPs, праймери, соли и неспецифични продукти, които могат да окажат влияние върху по-нататъшните реакции. ExoSAP е разтвор на два хидролитични ензима – бактериална екзонуклеаза I

и алкална фосфатаза, изолирана от скариди (Shrimp Alkaline Phosphatase – SAP), разтворени в буфер. Екзонуклеазата разгражда неизползваните едноверижни ДНК фрагменти и праймери, получени по време на PCR реакцията. Алкалната фосфатаза хидролизира излишъка от несвързани дезоксинуклеотиди. Пречистването с ExoSAP се извършва чрез смесването му в съотношение 1:6 с дейонизирана вода (0,3µl ExoSAP + 1,7µl dH₂O) и директното му добавяне към PCR продукта. Използваните при пречистването реактиви и условия са представени на таблица 7.

Таблица 7. Условия за пречистване на PCR продуктите чрез ExoSAP

Компоненти на реакционната смес		Програма за пречистване на PCR продуктите		
ЕксoSap	0,3 µl	Етап	Температура	Време
H ₂ O	1,7 µl	Пречистване на PCR продукта	37 ⁰ C	30 мин
PCR продукт	3 µl	Инактивиране на ензима	80 ⁰ C	15 мин
Краен обем	5 µl	Съхранение в апарата	4 ⁰ C	∞

- **Секвенционна реакция-** Китът за провеждане на секвенционната реакция Big Dye® Terminator kit v3.1, (Life Technologies), включва ДНК-полимераза, небелязани нуклеотиди и флуоресцентно белязани дидезоксинуклеотиди. Към 3'-края на всеки един от четирите дидезоксинуклеотиди – ddG, ddA, ddT, ddC е свързано различно флуоресцентно багрило. Използваната за секвенирането реакция съдържа Big Dye реакционна смес, пречистен PCR продукт и един от използваните при амплификацията праймери. Секвенционната реакция включва денатурация, хибридизация и елонгация. Използваните при секвенционната реакция реактиви са представени на таблица 8.

Таблица 8. Компоненти и условия на секвенционната реакция

Компоненти на реакционната смес		Програма на секвенционна реакция			
Seq Buffer	2 µl	Етап	Температура	Време	Брой цикли
Big Dye v3.1	0,5/0,7 µl	Начална денатурация	96°C	5 мин	1
Праймер	0,5 µl	Денатурация	96 °C	20 сек	30
dH ₂ O	2/ 1,8 µl	Хибридизация	57 °C	20 сек	
PCR продукт/ ExoSAP смес	5 µl	Елонгация	60 °C	2 мин	
Краен обем	10 µl	Краен синтез	60 °C	5 мин	1
			Съхранение в апарата	10 °C	∞

- **Пречистване чрез преутаяване на секвенционния продукт-** Прави се с цел отстраняване на несвързаните нуклеотиди. В зависимост от броя проби, преутаяването може да се направи в епруветки или на плака. Пречистването на продукта включва два

етапа. Към пробите се добавят 1:1 3М натриев ацетат, 125 mM EDTA и 25 µl 95% етанол. Така приготвените проби се инкубират на стайна температура за 15 минути на тъмно и се центрофугират на 3000 rpm отново на стайна температура. След това се прави допълнително пречистване, като пробите се промиват със 35µl 70% етанол. Следва ново центрофугиране на 1650 rpm за 15 минути, след което се изсушават на стайна температура. Така приготвените утайки се разтварят с 15µl формамид.

- **Електрофоретично разделяне и отчитане на секвенционните реакции-** Секвенционните реакции се обработват и отчитат след нанасяне на автоматичния секвенатор ABI3130xl Sequence Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Крайният резултат е файл - електрофореграма, съдържащ информация за ДНК секвенцията на анализирания проба.

3.4.4. Мултиплексен амплификационен анализ на лигирани проби (MLPA)

При пациентите, при които не открихме точкови мутации, малки делеции/ инсерции чрез метода на секвениране по Sanger, проведохме мултиплексен амплификационен анализ на лигирани проби (Multiplex Ligation Probe Amplification - MLPA) на *SCN1A*, *KCNQ2* и *SLC2A1* гените. MLPA анализът е полуколичествен метод за определяне на брой копия в до 60 ДНК последователности с един мултиплексно базиран PCR. Методиката се използва за откриване на вътрегенни или цялостногенни CNVs. Всяка проба от кита се състои от два уникални олигонуклеотида (сонди), с дължина между 64 и 500 бдв, които завършват с универсална последователност, необходима за последващото едновременно PCR амплифициране чрез една двойка праймери. Сондите са комплементарни на уникален участък от ДНК, който ни интересува. За MLPA анализът е характерно, че не се амплифицира таргетната ДНК, а сондите, хибридизирани върху нея. Двете сонди са подбрани така, че да хибридизират с прицелната геномна секвенция в близост една до друга. Веднъж свързали се с нея, те могат да бъдат последователно лигирани и амплифицирани чрез PCR. Само лигираните сонди ще бъдат намножени впоследствие. Нехибридизиралите сонди не трябва да бъдат отстранявани, тъй като те не могат да бъдат лигирани и намножени. Сондите съдържат и така наречените пълнещи секвенции (stuffer sequences), чрез които те се различават една от друга по дължина и впоследствие могат да бъдат разделени чрез капилярна електрофореза (Фигура 10). Праймерите за PCR са флуоресцентно белязани, което позволява визуализацията и количествения анализ на разделените фрагменти. Освен проби за съответните екзони на анализирания гени, MLPA китовете включват и референтни проби, съдържащи сонди за други участъци от генома, чрез които се определят качеството на провеждане на MLPA експеримента и качеството на изходната ДНК.

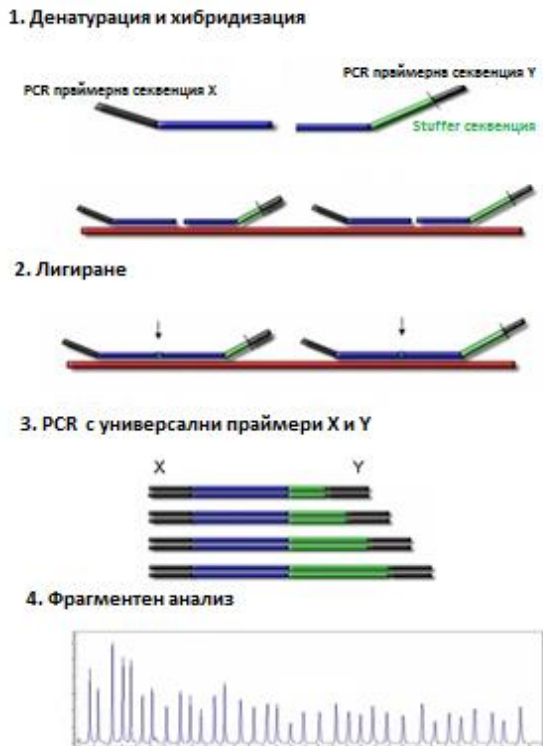
Анализът на получените MLPA резултати включва сравнение на площта на пиковете, представляващи отделните екзони, тази на съседните референтни проби, както и площта на пиковете на референтни контроли, които са подложени на MLPA анализ и електрофоретично разделяне при еднакви условия, успоредно със съответната проба.

Според препоръките на производителя, за всеки експеримент е препоръчително да се използват най-малко 3 референтни контролни проби или на всеки 7 проби една трябва да е референтна контрола. Референтните контроли трябва да са разпределени на случаен принцип сред останалите проби и трябва да отговарят на следните условия:

- Да не са мутантни и да са от изолирани от здрави индивиди - от същия биологичен материал, от който е изолирана и пробата (в случая ДНК от кръв).
- Да бъдат с качество и количество, максимално близко до изследваните проби.

Откритите делеции или дупликации е желателно да бъдат потвърдени с друга независима техника, включително други MLPA сонди за същия участък от генома, особено ако дефекта се отнася за една MLPA сонда.

MLPA анализът е показан схематично на **фигура 9**. Той може да бъде разделен на пет основни етапа: ДНК денатурация и хибризация, лигиране, PCR реакция, разделяне на PCR продуктите чрез капилярна електрофореза и фрагментен анализ на данните.



Фигура 9. Схематично представяне на системния ход на MLPA анализа (mlpa.com)

Анализът за търсене на големи делеции, инсерции и пренареждания в *SCN1A*, *KCNQ2* и *SLC2A1* гените беше проведен с помощта на китове, разработени от фирмата MRC-Holland (Amsterdam, Holland): SALSA MLPA KIT P137-B1 *SCN1A*, SALSA MLPA probemix P166-C1 *KCNQ2* и SALSA MLPA probemix P138-B2 *SLC2A1*, следвайки инструкциите на производителя. Използваната ДНК трябва да бъде с високо качество и концентрация между 50 и 250 ng в 5 µl обем за всяка реакция.

Процедурата е следната: 80 ng геномна ДНК се денатурира и охлажда в 5 µl Tris-EDTA буфер и в последствие се инкубира със смес от проби (сонди), съдържаща по една проба, специфична за всеки един от екзоните на *SCN1A*, *KCNQ2* и *SLC2A1* гените и няколко контролни проби, съдържащи се в кита, които хибридизират с последователности извън гените. След протичане на хибридизацията се извършва лигиране на пробите с лигаза за 15 мин на 65°C. Продуктите на лигазната реакция се амплифицират с помощта на PCR при използване на флуоресцентно белязани праймери. Компонентите на множествения MLPA PCR са представени на **таблица 9**.

Таблица 9. Компоненти, необходими за провеждането на MLPA анализ

Реагенти на MLPA	Състав на реагентите
SALSA Probemix	Специфичен за всеки от трите гена <i>SCN1A</i> , <i>KCNQ2</i> и <i>SLC2A1</i>
SALSA MLPA буфер	KCl, Tris HCl, EDTA, PEG-6000, олигонуклеотиди
SALSA Ligase – 65	Глицерол, EDTA, β-меркаптоетанол, KCl, Tris HCl, детергент, бактериална лигаза
SALSA буфер А	NAD бактериален коензим
SALSA буфер В	Tris HCl, MgCl ₂ , детергенти
SALSA PCR праймери	Олигонуклеотиди, белязани с флуоресцентно багрило (FAM или Cy5), dNTP, Tris HCl, KCl, EDTA, детергенти
SALSA полимераза	Глицерол, детергенти, EDTA, DTT, Tris HCl, KCl, бактериална полимераза

След протичане на PCR реакциите, 0,8 µl от всяка проба се смесват 0.2 µl флуоресцентно белязан стандарт (GeneScan 600 LIZ) и обемът се довежда до 11 µl с дейонизиран формамид. Пробите се денатурират се и се разделят на капилярна електрофореза с помощта на секвенатор ABI Prism 3130 xl.

В настоящото проучване, като референтни контролни проби при MLPA анализа бяха използвани ДНК проби, изолирани от периферна кръв на здрави възрастни индивиди, без данни за епилептични пристъпи и без фамилен история епилепсия и/или изоставане в умственото развитие.

Използваните при MLPA анализа консумативи и условия са представени в **таблица 10**.

Таблица 10. Използвани при MLPA анализа консумативи и условия

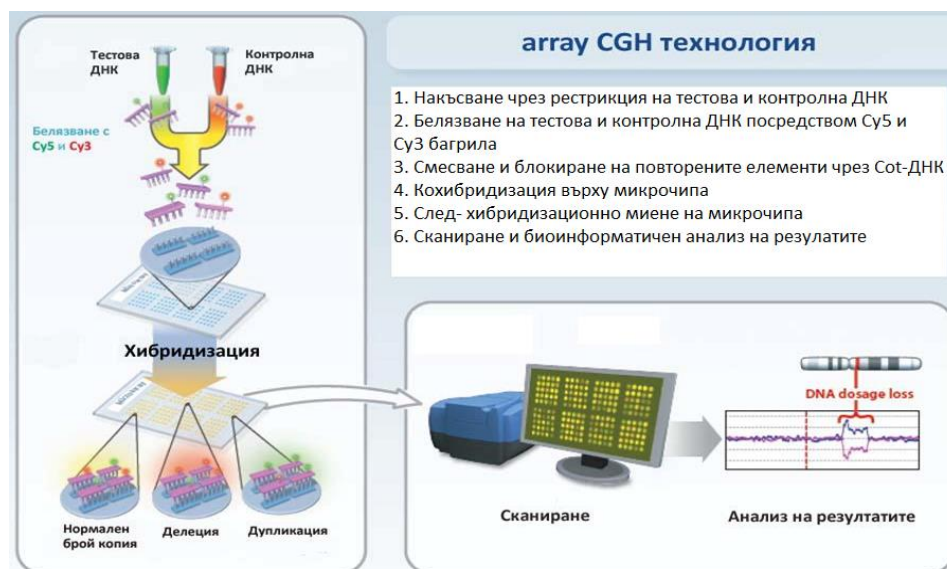
Условия на MLPA анализа					
Компоненти на реакционната смес			Компоненти на реакционната смес		
1 ден			1 ден		
Денатурация			Етап	Температура	Време
ДНК (16 ng/ µl)	5 µl		Денатурация	98 °C	5 мин
			Съхранение в апарата	25 °C	∞
Хибридизация			Етап	Температура	Време
SALSA Probemix	1 µl		Денатурация	95 °C	1 мин
SALSA MLPA буфер	1 µl		Хибридизация	60 °C	18 ч
Общ обем	2 µl		Съхранение в апарата	54 °C	∞
2 ден			2 ден		
Лигазна реакция			Етап	Температура	Време
SALSA буфер А	2 µl		Лигиране	54 °C	15 мин
SALSA буфер Б	2 µl		Деактивиране на ензима	98 °C	5 мин
SALSA Ligase – 65	0,66 µl		Съхранение в апарата	20 °C	∞
dH2O	16,7 µl				
Общ обем	21,36 µl				
PCR реакция			PCR програма		
SALSA PCR праймери	1,3 µl		Етап	Температура	Време
SALSA полимераза	0,35 µl	Брой цикли: 35	Денатурация	95 °C	30 сек
dH2O	5 µl		Хибридизация	60 °C	30 сек
Общ обем	6,65 µl		Елонгация	72 °C	60 сек
Краен обем	35 µl		Краен синтез	72 °C	20 мин
			Съхранение в апарата	15 °C	∞
Условия на капилярната електрофорезата					
Апарат	ABI Prism 3130 xl	Микс за електрофорезата			
		компонент	Количество		
		PCR	0,8 µl		
Флуоресцентно багрило за белязване на праймерите	FAM	LIZ	0,2 µl		
		HI DI Formamide	9 µl		
		Общ обем	11 µl		

3.4.5. Микрочипов анализ чрез метода на сравнителна геномна хибридизация (aCGH)

В рамките на настоящото проучване бе проведен микрочипов анализ чрез метода на сравнителната геномна хибридизация (array Comparative Genomic Hybridization- aCGH) на група пациенти със синдромни епилепсии, непоказали точкови мутации и/или инсерции/делеции, включващи цели екзони в известните, свързани с различни форми на епилепсията гени - *SCN1A*, *KCNQ2*, *SLC2A1*. Целта ни беше да скринираме генома на всеки пациент за така наречените вариации в броя копия (CNVs) - дупликации и делеции, засягащи хромозомни региони, съдържащи един или множество гени. Някои от болестотворните микроаберации са толкова малки, че е невъзможно да бъдат детектирани чрез стандартните цитогенетични техники, каквито са FISH и Гимза-оцветяването на хромозомите. Предимството в използването на aCGH е в неговата резолюция, която достига до 1 Кб, което позволява детекцията на редки микрохромозомни промени, част от които са причина за епилепсията в комбинация с интелектуален дефицит или изоставане в НПП. Освен високата резолюция на микрочиповите технологии, в частност aCGH, чрез тях може да се осъществи скрининг на целия геном в рамките на един експеримент, което го прави и удобен за диагностични цели.

Методологията на aCGH най-общо включва хибридизация на предварително накъсани и белязани с различни флуорохроми (Cy3 и Cy5) тестова и контролна геномна ДНК с предварително синтезирани и отпечатани 60-мерни олигонуклеотидни проби върху стъклена пластинка (микрочип). С помощта на сканираща система различните флуорохромни багрила се възбуждат, след което получените данни за емисионните спектри на двата флуорохрома се документират и анализират – Cy5 за тестовата проба на пациента и Cy3 - за контролната проба. Детекцията на разликите в интензитета на светене на тестовата спрямо сигнала за контролната ДНК дава и промяната в броя копия на отделните региони/хромозоми.

Подготовката на пробите за aCGH включва най-общо пречистване на геномната ДНК; рестрикция (накъсване) на тестовата и контролната ДНК посредством ензими - рестриктази (*RsaI* и *AluI*); белязване на накъсаните ДНК с Cy3 и Cy5 чрез използване на SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 4x180K и SurePrint G3 Unrestricted CGH ISCA v2, 4x180K платформи (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA); пречистване на белязаните ДНК чрез колонки, осигурени от производителя на кита; измерване на концентрацията им и качеството на белязване; смесване на тестовите и контролни ДНК и хибридизацията им с микрочипа; миене чрез специфични буфери на несвързаните фрагменти; сканиране на микрочипа чрез скенер Agilent G2565CA (Agilent Technologies); екстракция на данните чрез Feature Extraction Software (Agilent Technologies); анализ на специфичните профили чрез CytoSure Interpret Software (Oxford Gene Technology, UK) и Cytogenomics Software (Agilent Technologies). Общ изглед на принципа на aCGH технологията е представен на **фигура 10**.



Фигура 10. Схематично представяне на принципа на aCGH технологията. Адаптирана от Theisen, 2008 (238).

Използваните консумативи и реактиви за провеждане на aCGH са показани в таблица 11.

Таблица 11. Използвани консумативи и реактиви за провеждане на aCGH

Компоненти на кит за белязване SureTag Complete DNA Labeling Kit (Agilent Technologies)	Използвани консумативи за прехибридизация и хибридизация
Мъжка и женска контролна ДНК	Олигонуклеотидни микрочипове SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 4x180K и SurePrint G3 Unrestricted CGH ISCA v2, 4x180K
Ензим за рестрикция Alu I	Cot-1-ДНК
Ензим за рестрикция Rsa I	Кит за хибридизация, включващ 2X- RPM буфер и 10X блокиращ агент
Буфер за рестрикция (10X)	Олиго 1 и 2 буфери за промиване на чипа след хибридизация
Говежди серумен албумин (BSA)	Стандартен филтриран и стерилен TE буфер (TRIS+ EDTA)
Ехо-Klenow фрагмент	Покривни стъкла с гумени уплътнители (gasket slides)
Цианин 3-dUTP	Епруветки 0.2 ml
Цианин 5-dUTP	Пластмасов микрочипов държач
Случайни праймери (Random primers)	Метална хибридизационна касета
10X dNTP микс	Колонки за пречистване
Реакционен буфер за белязване (5X)	Вода, свободна от нуклеази

В настоящото проучване използвахме микрочипови платформи SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 4x180K и SurePrint G3 Unrestricted CGH ISCA v2, 4x180K с възможност за едновременно изследване на 4 пациента и 4 контроли, и резолюция от 180Kb = 180,880 броя 60-мерни олигонуклеотидни проби, имобилизирани върху микрочипа. Средната гъстота на пробите за платформа SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 4x180K е 13 Kb с по-висока резолюция от 11 Kb в областите с RefSeq гени (Reference Sequence Database; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>). Средната гъстота на пробите за платформа SurePrint G3 Unrestricted CGH ISCA v2, 4x180K е 25 Kb с по-висока резолюция в ISCA регионите (ISCA: International Standards for Cytogenomic Arrays; <https://www.iscaconsortium.org/>). Техниката на микрочиповия анализ включва следните етапи (фигура 10):

- **Пречистване на ДНК:** чистотата на ДНК е важен фактор за правилното протичане на микрочиповия анализ. За премахване на излишни белтъци и други компоненти, съдържащи се в буферите за изолиране се прилага пречистване чрез колонки на QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) и последваща стандартна преципитация чрез етанол и натриев ацетат (NaAc).
- **Накъсване на тестова и контролна ДНК чрез рестрикция:** Ензимното накъсване на геномната ДНК се прави с цел формиране на по-малки фрагменти, които впоследствие ще са с подходяща дължина за правилно провеждане на процеса на белязване. Накъсването се извършва чрез ензими - рестриктази AluI и RsaI, изолирани от бактерии и разпознаващи специфични последователности от ДНК молекулата, срещащи се на множество места по нейната дължина. Те се свързват със специфичната си последователност и катализират двойноверижното скъсване на ДНК, като в резултат на този процес се получават множество фрагменти с по-малка дължина. За процеса на рестрикция изходното количество на тестова и контролна ДНК е между 500 ng и 1000 ng в обем от 20,2 µl. Той се извършва в PCR апарат, като компонентите и условията за провеждане на рестрикцията са показани на **таблица 12**.

Таблица 12. Компоненти и условия за провеждане на рестрикционната реакция

Компоненти на реакционната смес		Програма на рестрикционната реакция		
H ₂ O, свободна от нуклеази	2 µl	Етап	Температура	Време
Буфер за рестрикция (10X)	2,6 µl	Рестрикция	37 °C	2 часа
Говежди серумен албумин (BSA)	0.2 µl	Инактивиране на ензимите	65 °C	20 мин
Alu I ензим	0,5 µl	Съхранение в апарата	4 °C	∞
Rsa I ензим	0,5 µl	Така накъсаната ДНК може да се съхранява на -20 °C до един месец.		
ДНК	20,2 µl			
Краен обем	26 µl			

- **Белязване на тестовата и контролна ДНК:** Белязването на ДНК се осъществява на принципа на ник (nick) трансляцията. Процесът се извършва чрез бактериална ДНК полимераза, наречена Ехо-Klenow фрагмент и случайни праймери (random primers). Random праймерите хибридизират с всички възможни последователности от ДНК, като така би могла да се бележи всяка ДНК. Чрез добавянето им към реакцията, Ехо-Klenow фрагмент, чрез 5'-3' полимеразната си активност има свойството да добавя единични нуклеотиди към 3'- хидроксилния край на праймера, които впоследствие се свързват с флуоресцентните багрила – цианини, излъчващи в различен спектър на дължината на вълната. Cy5 излъчва в червения спектър при $\lambda = 650 \text{ nm}$, като с него се бележи тестовата ДНК от пациента. Cy3 излъчва в зеления спектър при $\lambda = 550 \text{ nm}$ и с него се бележи контролната ДНК. Преди пристъпване към белязването към накъсаните фрагменти от тестова и контролна ДНК се добавят по 5 μl случайни праймери и се денатурират за 5 мин на 98 °C с цел да се освободи едноверижна ДНК матрица за свързване с праймерите.

Процесът на белязване се извършва отново на PCR апарат, като необходимите реактиви и условия за флуоресцентно белязване са показани в **таблица 13**.

Таблица 13. Компоненти и условия за провеждане на реакцията на рестрикция

Компоненти на реакционната смес		Програма на рестрикционната реакция		
		Етап	Температура	Време
Реакционен буфер за белязване (5X)	10.0 μl	Белязване	37 °C	2 часа
10X dNTP микс	5 μl	Инактивиране на ензима	65 °C	10 мин
Cy5dUTP/Cy3dUTP	3 μl	Съхранение в апарата	4 °C	∞
Ехо- Klenow ензим	1 μl	Забележка: приготвят се две реакционни смеси: една, съдържаща Cy5 за белязване на тестова ДНК и друга, съдържаща Cy3 за белязване на контролна ДНК. Количествата на компонентите в двете смеси са еднакви.		
Рестрикционна реакция+ random праймери	31 μl			
Краен обем	50 μl			

Така белязаната ДНК може да се съхранява на -20 °C до един месец.

- **Пречистване след белязването:** Следва пречистване с колонки с нитроцелулозен филтър, предоставени от фирмата производител.
 - Към всяка проба се добавят 430 μl ТЕ буфер до достигане на обем 480 μl
 - Накапва се в колонката, поставена в 2 ml епруветка и се центрофугира 10 мин на 14000xG

- Филтруваната течност се отлива и процедурата се повтаря с добавяне на нови 480 µl TE буфер и центрофугиране за 10 мин на 14000xG
 - Филтруваната течност се изхвърля заедно с епруветката, а колонката се поставя в нова 2 ml епруветка обърната на 180°. Центрофугира се на 1000xG за една минута и белязаната ДНК се утаява на дъното на епруветката.
 - Така пречистената ДНК се поставя за 5 мин на лед, след което се размесва чрез отпипетиране 10-15 пъти.
- **Измерване на качеството на белязване на пробите:** Степента на инкорпорация на багрилото в тестова и контролна ДНК се определя спектрофотометрично (Nanodrop 2000) чрез измерване на специфичната активност на белязване. Тя се изчислява по следната формула:

$$\text{Специфична активност (SA)}[\text{pmol}/\mu\text{g}] = \frac{\text{концентрация на багрилото } [\text{pmol}/\mu\text{l}]}{\text{концентрация на ДНК от пробата } [\mu\text{g}/\mu\text{l}]}$$

Специфичният добив от белязана ДНК се определя по формулата:

$$\text{Добив } [\mu\text{g}] = \text{Концентрация на ДНК } [\text{ng}/\mu\text{l}] \times \text{Обем на пробата } [\mu\text{l}]/1000 \text{ ng}/\mu\text{g}$$

Белязването се приема за успешно ако SA и добива от белязана ДНК е в рамките на стойностите, показани на **таблица 14**.

Таблица 14. Очаквани добив и специфична активност след белязване и пречистване

Количество ДНК [ng]	Добив [µg]	Специфична активност на белязване на Cy5/Cy3 [pmol/µg]
500	8 до 13	20 до 60
1000	9 до 14	20 до 60

- **Подготовка на пробите за хибридизация - прехибридизационен етап:** Досега тестовата и контролната ДНК са обработени в отделни реакции. След проверка на качеството на белязване, следва комбинирането на тестова и контролна ДНК в една епруветка, като се съблюдава те да са със съизмерима SA и еднакъв пол. Следва подготовка на хибридизационната смес, като преди процеса на хибридизация е необходимо да се инактивират повторените последователности в генома, тъй като те биха дали допълнителен шум по време на сканирането и екстракцията на информация от микрочипа. За тази цел се използва човешка Cot-1 ДНК и блокиращ агент. Реактивите за една реакция и условията за извършване на този етап са показани в **таблица 15**. За стъпката на прехибридизация 71 µl от приготвената смес се накапва в епруветката със комбинирани тестова и контролна ДНК, като очаквания краен обем е 110 µl.

Таблица 15. Реактиви и условия за прехибридационния етап

Компоненти на реакционната смес		Програма на рестрикционната реакция		
		Етап	Температура	Време
Cot-1-ДНК	5 μ l	Денатурация	98 °C	3 мин
10X aCGH блокиращ агент	11 μ l	Хибризация с повторените последователности	37 °C	30 мин
2× HI-RPM Хибридационен буфер	55 μ l	Забележка: Важно е след вадене от PCR апарата да не се позволи на пробата да изстине и да е близко до 37 °C. Затова веднага след приключване на програмата пробите се накапват върху чипа. Задължително се работи в атмосферна среда без озон на тъмно, заради чувствителността на багрилата към светлина и високи количества на озон в атмосферата.		
Общ обем	71 μ l			

- Хибризация:** Следва накапване на 100 μ l от всяка проба върху предметното стъкло с гумен уплътнител, като се избягва образуването на мехури. В настоящото проучване ние използвахме микрочипови платформи SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 4x180K и SurePrint G3 Unrestricted CGH ISCA v2, 4x180K, съдържащи 4 хибридационни полета, които позволяват едновременното изследване на 4 пациента със 4 контроли (**фигура 11**). Микрочипът се поставя с активната страна надолу към покривното стъкло с пробите и по този начин се получава „сандвичева“ структура. Тази структура се монтира в хибридационната касета, която се завърта няколко пъти, за да се отстранят неподвижните мехури. Следва поставяне на микрочиповата касета в хибридационната камера, предварително подгрята на 67°C за 24 часа, която има ротатор позволяващ въртенето на касетата с 20 об/мин.



Agilent 4x180K формат

Фигура 11. Използвана микрочипова платформа Agilent, съдържаща 4 хибридационни полета и позволяваща едновременното изследване на 4 пациента върху микрочипа.

- Промивка на микрочиповете:** След приключване на хибридизацията е необходимо чиповете да се промият с цел да се отстранят несвързани фрагменти и други компоненти на реакцията. Използват се 2 промиващи буфера, осигурени от фирмата производител (**таблица 16**). В стъклени кювети се налива 400 ml от всеки миеш буфер, като буфер 2 е предварително загрят на 37°C. Микрочипът се поставя на стъклен

държач и се потапя последователно и промива при непрекъснато разклащане във всеки един от двата буфера за време, показано на **таблица 16**.

Таблица 16. Необходими разтвори за промиването на микрочиповете

Буфер	Температура	Магнитна бъркалка	Време
Олиго- буфер 1	стайна	Не	Отлепяне на чипа от покривното стъкло
Олиго- буфер 1	стайна	Да	5 мин
Олиго- буфер 2	37 °C	Да	1 мин

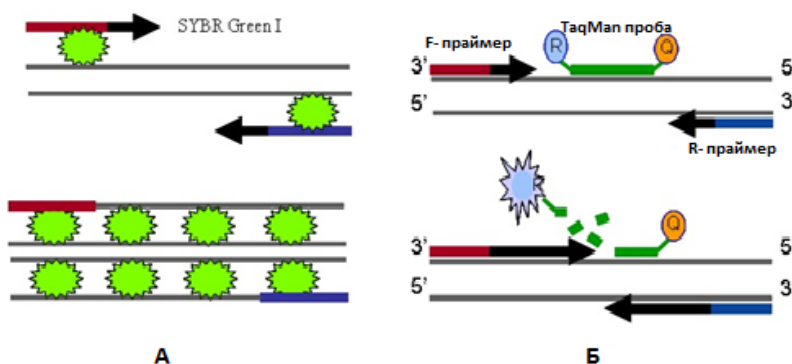
След промиването с миеш буфер 2 стъкленият държач, заедно с чипа се вадят много бавно от разтвора с цел да не се образуват капки по повърността на микрочипа.

- **Сканиране на микрочиповете:** Промитият микрочип се монтира в пластмасов държач и се поставя в скенера. За целите на настоящото проучване използвахме двуканален микрочипов скенер модел G2505C (Agilent Technologies), с $\lambda=550\text{—}610\text{ nm}$ за зеления лазер и $\lambda=650\text{—}750\text{ nm}$ за червения лазер. Сканирането беше с резолюция от порядъка на $3\text{ }\mu\text{m}$, поради високата гъстота на олигонуклеотидите, имобилизирани върху чипа (180,880 олигонуклеотида). Сканирането се извърши с помощта на Scan Control софтуер, версия A.8.4., предоставен от фирмата производител (Agilent Technologies).

3.4.6. Потвърдителен и сегрегационен PCR в реално време (qPCR) на откритите чрез aCGH аберации

Както при всеки диагностичен метод, aCGH резултатите имат нужда от валидиране с друг независим метод. Количественият PCR в реално време (qPCR) е лесен за изпълнение, евтин и точен метод, което го прави подходяща техника за потвърждаване на открити чрез aCGH микрохромозомни промени в сравнение с други използвани методи като FISH и MLPA (Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification). В съчетание с ниската цена и бързина на изпълнение, метода показва и висока чувствителност и специфичност, което го прави подходящ за рутинната клинична практика.

За целите на потвърдителния анализ използвахме Sybr Green технологията. Sybr Green багрилото се свързва (интеркалира) към двойноверижна ДНК и дава флуоресцентен сигнал. По този начин се засичат PCR продуктите, които се акумулират при протичането на PCR циклите. За разлика от TaqMan технологията, където се използва принципа на хибридизация на сонди към уникални последователности от ДНК при Sybr Green багрилото се свързва към всички двойноверижни ДНК молекули, включително и към неспецифичните продукти (**фигура 12**). Поради тази причина е много важно да се оптимизират PCR реакциите за да се получават надеждни резултати.



Фигура 12. Схематично изображение на Sybr Green технологията (А), сравнена с по-високо специфичната TaqMan технология (Б).

Накратко, принципът на действие на SybrGreen технологията е следния:

- 1) Sybr Green I багрилото флуоресцира, когато е интеркалирано (свързано) към двойноверижна ДНК;
- 2) По време на PCR полимеразата амплифицира таргетната последователност, което води до създаването на PCR продукти, наречени ампликони;
- 3) С напредването на PCR циклите се създават все повече ампликони. Тъй като Sybr Green се свързва към всички двойноверижни ДНК, то това води до увеличение на флуоресцентния сигнал пропорционално на количеството PCR продукти.

Използван метод и дизайн на експеримента:

- **Избор на ампликони** - беше избран малък фрагмент като част от засегнатия район с дължина не по-голяма от 250 бдв (оптимално около 150 бдв), както и вътрешен контролен фрагмент на същата или на друга хромозома, за който е известно, че е с нормален брой копия. Праймерите за qPCR анализа бяха проверени чрез *in silico* PCR инструмента на UCSC - University of California Santa Cruz (<https://genome.ucsc.edu/>) за верификация на геномната позиция и проверка за секвенционна хомология с други райони.
- **Оптимизация на условията на амплификация за всяка двойка праймери** – бяха оптимизирани температура на хибридизация, количество от праймерите, количеството ДНК матрица, като наличието на специфичните таргетни ампликони беше проверено на 2% агарозна гел електрофореза.
- **Беше извършен количествен PCR анализ в реално време** чрез използване на Rotorgene апаратура и софтуер (QIAGEN) и SYBR Green технологията за белязване на тестовите и контролни фрагменти. Успоредно с тестовата ДНК от пациента бяха използвани три контролни ДНК от здрави индивиди с проверен нормален брой копия в тестовия и контролния фрагмент. Всяка тестова и контролна ДНК беше анализирана в

три повторения на тестовия фрагмент и 3 повторения на контролния фрагмент (таблица 17).

Таблица 17. Пример за дизайн и разпределение на пробите в qPCR експеримента

1. тест фрагмент–пациент	1. тест фрагмент – контрола 1	1. тест фрагмент- контрола 2	1. тест фрагмент- контрола 3
2. тест фрагмент–пациент	2. тест фрагмент – контрола 1	2. тест фрагмент- контрола 2	2. тест фрагмент- контрола 3
3. тест фрагмент–пациент	3. тест фрагмент – контрола 1	3. тест фрагмент- контрола 2	3. тест фрагмент- контрола 3
1. контролен фрагмент- пациент	1. контролен фрагмент- контрола 1	1. контролен фрагмент- контрола 2	1. контролен фрагмент- контрола 3
2. контролен фрагмент- пациент	2. контролен фрагмент- контрола 1	2. контролен фрагмент- контрола 2	2. контролен фрагмент- контрола 3
3. контролен фрагмент- пациент	3. контролен фрагмент- контрола 1	3. контролен фрагмент- контрола 2	3. контролен фрагмент- контрола 3

Компонентите за изготвяне на PCR микса за всяка реакция, както и условията за провеждане на qPCR анализа бяха проведени по протокол, предоставен от производителя и са представени в **таблица 18**. Използваното количество тестова и контролна ДНК е 2 µl с концентрация 20ng/µl.

Таблица 18. Използвани консумативи и условия за извършване на qPCR анализа

Компоненти на реакционната смес		Програма на qPCR реакцията			
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	10 µl	Етап	Температура	Време	Цикли
праймер F (10pmol)	0.5 µl	Начална денатурация	95 °C	10 мин	1
праймер R (10pmol)	0.5 µl	Денатурация	95 °C	15 сек	40
H2O	12 µl	Хибридизация и елонгиране	60 °C	1 мин	
ДНК	2 µl	Забележка: QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix съдържа Hot Start полимераза, SYBR Green PCR буфер, микс от dNTPs, SYBR Green багрило, ROX багрило за нормализиране на флуоресцентния сигнал.			
Краен обем	25 µl				

- **Анализът на получените резултати** беше извършен чрез метода на относително количествено определяне (Relative Quantification- RQ стойност) на амплифицирания чрез желаните праймери тестов фрагмент в сравнение със същия фрагмент в здрави контролни индивиди, налични в ДНК банката на ЦММ. В допълнение, беше използван

и вътрешен контролен фрагмент с очакван нормален брой копия, чийто RQ стойности бяха определени и в пациента, и в контролните индивиди. За анализ на получените Ct стойности (критичен праг на амплификация) на амплификационните криви беше използван $\Delta\Delta Ct$ метода, чрез който бяха определени специфичния брой копия на тестовия и вътрешно-контролния фрагмент за всеки пациент в сравнение с броя копия от тестовия и вътрешно-контролния фрагмент при всеки от контролните индивиди.

Изчислението на RQ стойностите се извърши чрез следните формули:

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

където калибратор е контролна ДНК с нормален брой копия.

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

Ct- критичен праг на амплификация, през който започва да се отчита флуоресцентен сигнал. Ct стойностите на тестовия и контролния фрагмент при тестовите и контролните ДНК са различни. Тъй като всяка една проба е повторена три пъти, за изчисляване на ΔCt се взимат средните Ct стойности получени за изследвания ген и ендогенната контрола или калибратор.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{тестов фрагмент}) - \Delta Ct (\text{контролен фрагмент})$$

$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, където RQ е relative quantification или относително определяне на броя копия. Стойността RQ показва колко броя копия има даден ДНК фрагмент от пациента в сравнение с калибратора. Калибраторът има RQ стойност 1. За да се определи броя копия от ДНК RQ стойността се умножава по 2. Така калибраторът трябва да има 2 броя копия от всеки изследван фрагмент. Приема се, че проби с RQ стойност под 0,59 ($\ln 1,5$) показват намален брой копия на съответния фрагмент, или делеция, а проби RQ стойности над 1,59 ($\ln 3$) или повече, означават увеличен брой копия (3 или повече копия) от съответния фрагмент, или дупликация (239).

3.4.7. Биоинформатичен анализ на получените резултати

3.4.7.1. Биоинформатичен анализ на резултатите от директното секвениране

При анализа на получените резултати бяха използвани следните софтуерни програми:

FinchTV. FinchTV е лесен за използване инструмент за първична обработка и анализ на малък обем ДНК секвенции (www.geospiza.com). Той се използва за прочит на файлове с хроматограми с едни от най-често използваните формати, като например AB1, SCF или FASTA. FinchTV е най-популярният софтуер за анализ на ДНК последователности, съвместим за Linux, Mac OSX, Windows и Solaris операционни

системи. Програмата позволява да се направи анализ на суровите данни за оценка на качеството на получените секвенции, да се направи BLAST за съвпадения на получения резултат с референтната за съответния ген последователност (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

SeqScape. SeqScape® софтуер е разработен от Thermofisher Scientific (<https://www.thermofisher.com>). Подходящ е за обработка на голям обем ДНК секвенции. Програмата позволява да бъде направен анализ за различен тип мутации и е удобен за откриване на хетерозиготни еднонуклеотидни полиморфизми и хетерозиготни делеции или инсерции, сравнени с референтна секвенция. SeqScape е съвместим с повечето от операционните системи, подържани от Microsoft Corporation, като например Windows NT, 2000, XP и Windows 7.

В настоящото проучване, получените секвенции бяха анализирани с помощта на програмите FinchTV и SeqScape® и сравнени с референтните секвенции, публикувани в публичната база данни Ensembl – референтни секвенции NM_001165963.2 за ген *SCN1A*, NM_001165963.2 за ген *SLC2A1*, NM_172107.3 за ген *KCNQ2* (<https://www.ensembl.org>).

За да се определи ефекта, който намерените молекулни варианти биха имали върху структурата и функцията на съответните протеини бяха използвани компютърните програми PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/>) и PROVEAN/SIFT (<http://provean.jcvi.org/>). Потенциалната патогенност на новооткритите секвенционни варианти бе оценена чрез предиктивната компютърна програма Mutation taster (www.mutationtaster.org/). За определяне на ефекта върху сплайсинга на намерените варианти, засягащи сплайс-местата на екзоните на трите изследвани гена, бяха използвани предикционните алгоритми на NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk>) и Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF3/>). Програмата NetGene 2 позволява откриването на канонични сплайс-места на базата на изкуствено създадени невронни мрежи, докато софтуерът Human Splicing Finder използва 12 различни алгоритъма за идентифициране и предсказване на алтернативни сплайс-донор и -акцепторни места, базирани на PWM матрици, Принципа на Максималната Ентропия, и Метод за Сравняване на Мотиви.

Изключването на честите полиморфизми и идентифицирането на вече съобщени мутации бе извършено чрез проверка на установените варианти в публичните бази данни Ensembl (<http://www.ensembl.org>), 1000Genomes (<http://www.internationalgenome.org/>), Human Gene Mutation Database - HGMD (www.hgmd.cf.ac.uk), Exome Aggregation Consortium (<http://exac.broadinstitute.org/>), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>), както и базата данни за *SCN1A* мутации на Лабораторията по Молекулярна генетика, Университет на Антверпен (<http://www.molgen.vib-ua.be/SCN1AMutations/>). При откриване на нов генетичен вариант или на вече известна мутация, бе извършен сегрегационен анализ в засегнатото семейство, където беше възможен такъв.

3.4.7.2. Биоинформатичен анализ на резултатите, получени от MLPA анализа

Получените профили на пациентите бяха нормализирани и сравнени с профилите на нормални, здрави индивиди чрез използване на два софтуера – GeneMapper и Coffalyser.Net.

GeneMapper е програма, разработена от Thermofisher Scientific (<https://www.thermofisher.com>). Тя се използва за анализ на данни, получени при различни приложения на фрагментния анализ от ABI PRISM® 310, 3100, 3100-Avant™, Applied Biosystems® 3130, 3130xl, 3500, 3500xL Applied Biosystems® 3730 секвенатори, като микросателитен анализ и анализ за генотипиране, загуба на хетерозиготност и други. За работа с GeneMapper софтуер се изисква минимум операционна система Windows XP или 7, при параметри на твърдия диск Intel Pentium processor и минимум 512 MB RAM, оптимална 1GB RAM (<https://www.thermofisher.com>).

CoffalyserNet (MRC- Holland). CoffalyserNet е програма за MLPA анализ, съвместима с файлове, получени директно от капиларни електрофорезни системи, включително ABI файлове като FSA, AB1 и ABI. Програмната библиотека съдържа всички налични до момента MLPA анализи за различни заболявания, разработени от MRC-Holland, а новите приложения могат да се изтеглят директно от сайта на производителя (www.mlpa.com). MLPA анализът протича на два етапа: а) ДНК фрагментен анализ и б) Сравнителен анализ на пробите и оценка на качеството. За оптимална работа на програмата се изисква операционна система Windows 7 или по-висока версия и поне 2GB RAM.

3.4.7.3. Биоинформатичен анализ на резултатите, получени от микрочиповия анализ

Feature Extraction програма (FE) (Agilent Technologies). Генерираните от скенера изображения под формата на .tiff файл, съдържащи емисионните спектри на всеки един клон от олигонуклеотиди върху чипа се превръщат в текстова информация .txt файл чрез Agilent Feature Extraction програма (Agilent Technologies). Той има за цел извличане (екстракция) на данните от интензитетите на светене на багрилата и превръщането им в логаритмични съотношения така, че да са възможни впоследствие анализа и интерпретацията на резултатите. Освен текстовия файл, необходим за анализиращия софтуер, FE програмата генерира и доклад за контрол на качеството (Quality Control - QC report). Той съдържа статистическа информация за това как е протекъл микрочиповия експеримент, неговата възпроизводимост и надеждността на данните. Някои от по-важните параметри в QC доклада са:

- **DLR (Derivative Log Ratio)** – отразява съотношението между интензитетите на флуоресценция на два съседни клона. Това дава представа индиректно за качеството на изследваната ДНК. Два съседно разположени клона би трябвало да имат сходни

интензитети в съотношение 1:1. В този смисъл, нормални стойности на DLR са от порядъка на <20. Високи стойности на DLR показват увеличение на разликата между два съседни олиго-клона, при което е трудно да се анализират по-малки по размер делеции/дупликации.

- **Signal to Noise Ratio (SNR)** - показва колко ясно се отдиференцира интензитета на флуоресценция на съответния клон от фоновия шум. Този параметър отразява качеството на изпълнение на стъпките белязване на ДНК и миене на микрочипа след хибридизация. Отлична стойност на Signal to Noise съотношението е над 100, а за добри стойности се приемат между 30 и 100. При стойност <30 експеримента трябва да се повтори от стъпка повторно миене на чипа, или повторно белязване на ДНК.
- **Негативни контроли (Negative Controls)** – Този параметър отразява степента на неспецифична хибридизация по време на стъпката на прехибридизация. Висока стойност на негативни контроли показва чистотата на използваните буфери най-вече по време на миене на микрочипа. Нормално, тази стойност трябва да е между 50 и 70 броя.

Cytosure Interpret програма (Oxford Gene Technologies) и Cytogenomics програма (Agilent Technologies) – Софтуерни продукти за анализ на извлечените от FE софтуера .txt данни, интерпретация и анотация на намерените aCGH аберации в генома. Анализът на данните се извършва чрез картиране по два референтни геномни секвенции - NCBI36/hg18, (март, 2006) и GRCh37/hg19 (февруари, 2009), като софтуерът предлага лесна смяна на референтната секвенция, според желанието на изследователя. Двата софтуера включват и анотации към публични бази-данни, съдържащи информация за известни синдроми, гени, директна причина или асоциирани със заболяване (OMIM- Online Mendelian Inheritance of Man: <https://www.omim.org> ; GeneCards: <https://www.genecards.org>), бази-данни, съдържащи CNVs, намерени при болни пациенти (DECIPHER: <https://decipher.sanger.ac.uk/>, ISCA Consortium: <http://dbsearch.clinicalgenome.org>, ClinVar: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>), здрави контролни индивиди (Database of Genomic Variants: <http://dgv.tcag.ca>), както и сегментни дупликации в генома, като в него могат да се визуализират линкове към базите-данни, интересувачи специфично изследователя. По този начин, чрез Cytosure Interpret софтуера лесно се извършват генотип-фенотипни корелации и се определя патогенността на съответната аберация.

В настоящото проучване, чрез Cytosure Interpret и Cytogenomics алгоритмите използвахме за сравнение референтна секвенция на генома GRCh37/hg19. Като реални аберации бяха отчетени само тези, при които отклонението на интензитета на поне 4 съседни клона достига статистическа значимост (граница на статистическа значимост $p \leq 0.05$). Отношението между сигналите на светене на тестовата и контролната проба впоследствие се нормализира и превръща в $\log_2$ съотношение, даващо възможност за оценка на броя копия от съответния фрагмент. Логаритмичното съотношение $\log_2$ между интензитетите на флуоресценция на Cy5- белязаните проби и Cy3- белязаните проби между +0,3 и -0,6 отразява нормален брой копия. Стойности <-0,6 показват загуба на генетичен материал в изследвания локус в сравнение с контролата, или делеция.

Стойности на $\log_2 > 0,3$ показват умножаване на генетичния материал в изследвания локус в сравнение с контролната ДНК, или дупликация. С помощта на информацията в публичните бази-данни намерените значими аберации бяха класифицирани в няколко категории според ефекта на действие, както и бяха идентифицирани гените във всеки от засегнатите локуси.

Използвана апаратура

- Автоматизирана система за изолиране и пречистване на ДНК и РНК - Модел: Chemagen, Magnetic Separation Module I (Perkin Elmer);
- ABI PRISM® Автоматичен ДНК секвенатор- модел 3130xl;
- Апарати за PCR амплификация: градиентни PCR апарат- Модел: Bioer Gene Pro (Harlow scientific) и апарат Veriti Thermal Cyclor (ABI);
- Вана за хоризонтална електрофореза (Science-Plus-UK);
- Микровълнова фурна за разтапяне на агарозата (Daewoo KOR 6C27);
- Токоизправител (Science-Plus-UK);
- Фотодокументационна система и UV-транслюминатор с дължина на вълната 312 nm (MiniBisPro-Bio Imaging Systems);
- Спектрофотометри ND 1000 и 2000 (NanoDrop);
- Хладилна центрофуга 5810R (Eppendorf)
- Сух стерилизатор МММ (Exocell);
- Стартови гребени за гелове за електрофореза с размер на зъбците 5x1mm;
- Едноканални пипети с обем: 0.5–10 µl, 2–20 µl, 20–200 µl и 100-1000µl
- Микрочипов скенер G2565CA (Agilent Technology)
- Хибридизационна камера с въртящ ротоп (Agilent Technology)
- Магнитна бъркалка (x1 or x3) (Thermo Scientific)
- Магнитна бъркалка с възможност за нагряване
- Центрофуга MicroCL-21 (Thermo Fisher Scientific);
- Апарат за qPCR Rotorgene Q система, версия 2.0 (Qiagen)
- Ледогенератор модел B20A (Fiochetti)
- Вана за водна баня (Mettmert)

4. Резултати

4.1. Резултати от секвенционния анализ на *SCN1A* гена

4.1.1. Клиничен материал

В настоящото проучване, за изследване на *SCN1A* гена чрез директно секвениране по Сангер бяха включени общо 133 пациенти, от които: 72 пациенти с фокални фебрилни пристъпи с или без еволюция в генерализирана епилепсия с фебрилни гърчове + синдром (GEFS+ синдром), 10 пациенти със съмнение за синдром на Dravet (DS), 41 пациенти с неизяснена (идиопатична) генерализирана епилепсия и 10 пациенти с характеристики на миоклонично-астатична епилепсия (MAE). При 82 пациенти съществува фамилна история за епилепсия, а 51 пациенти представляват изолирани спорадични случаи.

Поради високата честота на съобщени в литературата мутации в *SCN1A* гена при пациенти DS, както и сравнително честото им откриване при семейства с GEFS+ синдром, през последните няколко години в рамките на проект ДТК-09/2009, финансиран от МОН започна насочено събиране на български пациенти с тези диагнози. Сегашното проучване допълва съществуващата ДНК банка в ЦММ, както с GEFS+ случаи, така и с пациенти с други електро-клинични синдроми (вж Материали и методи, **таблица 2**).

Водеща клинична находка в изследваната група пациенти е фебрилно - провокираната епилепсия, характерна за епилепсии от GEFS+ спектъра. При тях пристъпите са предхождани от повишена телесна температура (38°C - 39°C), най- често в резултат от инфекциозно заболяване, или след поставяне на ваксина (ДТК). Обикновено първият гърч е фебрилен, с или без загуба на съзнанието. Наблюдават се и фокални пристъпи, засягащи невронни мрежи, разположени в едната хемисфера, с последваща вторична генерализация.

При пациентите с диагноза GEFS+ началото на пристъпите е между 6- месечна и 2-годишна възраст, като по-рядко се наблюдава начало в по-късен етап от развитието. При фамилните случаи болшинството от засегнати родственици съобщават за единични FS по време на боледуване от инфекциозно заболяване в детството, отшумяващи спонтанно след 5- годишна възраст. За разлика от тях, в повечето случаи индексните пациенти получават разнообразни като характеристика пристъпи - афебрилни ГТКП, атонични, миоклонични и абсансни. При пациентите със съмнение за DS се наблюдава по-ранно начало на пристъпите (между 2- и 12-месечна възраст), като в повечето случаи не съществува фамилна история на заболяването. При DS е характерно, че скоро след първия пристъп се появяват разнообразни афебрилни гърчове, като миоклонично-астатични, абсанси, вторични ГТКП и други. Съобщава се за изпадане в епилептичен статус от няколко минути до няколко часа, което може да доведе до летален изход. Често след началото на пристъпите се наблюдава постепенен регрес в невропсихичното, говорното и двигателното развитие, който се проявява след 2-годишна възраст. Резултатите от невроизобразяващите

методи (ЯМР и КТ) не показват отклонения. Епилепсията е трудно податлива на лечение, в повечето случаи не се постига ремисия на заболяването, а само контролиране на отделни типове пристъпи и/или разреждане на честотата им във времето.

При пациентите в подгрупа ГГЕ се наблюдават разнообразни типове пристъпи, с неясни провокационни фактори, което затруднява лекуващия лекар да постави насочваща диагноза. Началото на пристъпите е между 10- месечна и 11- годишна възраст. Като провокационни фактори най-често се посочват стрес или емоционална възбуда. Пристъпите са разнообразни, най-често генерализирани или с фокално начало и последваща вторична генерализация. Поради отсъствието на обективен провокиращ фактор, се допуска генетична етиология на електро-клиничния синдром. От изследваната група при 21 от пациентите с ГГЕ (51%) съществува фамилна история на заболяването. Останалите са спорадични случаи.

При пациентите от подгрупа МАЕ (или синдром на Doose) се наблюдава начало на пристъпите на 6- месечна до 2- годишна възраст. Характерни пристъпи са комбинация от миоклонични, атонични и атипични абсанси. Заболяването показва генетична хетерогенност, с по-скоро неясна генетична етиология, но са намерени няколко *SCN1A* мутации при спорадични МАЕ пациенти (45, 240, 241). В допълнение, в около 5% от спорадичните случаи на МАЕ се откриват мутации в *SLC2A1* гена (100). Ето защо, тази подгрупа първоначално изследвахме за наличие на патогенни точкови варианти в *SLC2A1* гена, а в последствие преминахме към търсене на точкови мутации в *SCN1A* гена.

4.1.2. Молекулярно–генетично изследване

Чрез PCR амплифицирахме всички 26 екзона, както и всички екзон - интронни граници на *SCN1A* гена (OMIM: 182389, транскрипт: ENST00000375405), използвайки набор от праймери, описани от Claes и съавтори (24). Условиата за амплификация и секвениране бяха оптимизирани, както е показано в Материали и методи, таблици 3 и 4, и Приложение 4. Продуктите на PCR реакцията бяха визуализирани на агарозен гел и подложени на секвениране.

Чрез директно секвениране по Сангер на ген *SCN1A* открихме 18 варианта в 22 пациенти или 15.5% от изследваната група пациенти (Таблицы 19, 20). Молекулни варианти от потенциален интерес бяха намерени при 12 пациенти от общо-изследваната група (9%). От тях с клинично значение, позволяващи да се постави генетична диагноза са осем варианта с патогенен ефект при 9.8% от пациентите с епилепсия от GEFS+ спектъра (GEFS+ и DS пациенти n=82). Варианти с вероятно патогенен ефект бяха намерени при четири пациенти от групата с епилепсии от GEFS+ спектъра (4.9%).

Допълнително, шест от вариантите са с вероятно непатогенен ефект, открити при 10 пациенти от общо-изследваната група (7.5%) (Таблица 20). От тях шест пациенти са с насочваща диагноза от GEFS+ спектъра, а трима са с неизяснена ГГЕ/ИГЕ (Таблица 20). Десет от откритите варианти представляват несинонимни замени (missense), два варианта водят до преждевременно формиране на стоп - кодон и прекъсване рамката на четене

(nonsense), четири варианта засягат канонични сплайс-места (splice-site) и два варианта са съответно едно- и олигонуклеотидни делеции, водещи до изместване рамката на четене (frameshift deletions). Четири от вариантите отсъстват при изследваните родители и са възникнали *de novo*, един вариант е унаследен от болен родител, два варианта се срещат при здрави родственици, а при осем пациента не разполагахме с материал от родителите за извършване на сегрегационен анализ.

Потенциалната патогенност на вариантите с промяна на смисъла и вероятния им ефект върху функциите на белтъка бяха проверени с помощта на предикционни програми PROVEAN/SIFT, Polyphen2 и Mutation Taster (Таблицы 21 и 22). По отношение на сплайс-мутациите, възможността за използване на алтернативно сплайс място беше проверена чрез два софтуерни продукта : NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>) и Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF3/>).

Три от откритите варианти прецизират генетичната диагноза от GEFS+ синдром на DS. Заедно с тях, общо беше поставена генетична диагноза DS на 69.2% от пациентите от подгрупа DS (n=13). Това има изключително важно значение за избора на правилната антиконвулсантна терапия.

При пациентите от подгрупи ИГЕ/ГГЕ и МАЕ чрез директно секвениране не установихме клинично-значими варианти в *SCN1A* гена. Варианти с вероятно непатогенен ефект са открити при 5 пациенти с диагноза GEFS+, 2 пациенти с прости фебрилни пристъпи и 3 пациенти с ИГЕ/ГГЕ (Таблица 20).

Таблица 19. Намерени патогенни варианти чрез директно секвениране на ген *SCN1A*

Патогенни варианти, докладвани в литературните източници и бази данни								
Проба нд	Фено тип	Тип вариант	dbSNP	HGMD	HGVS кДНК номенкла тура	HGVS протеинова номенклат ура	Екзон/ интрон	Унаследяване
548	DS	missence	rs12191898 6	CM115993 CM024307	c.4135G>A	p.Val1379Met	21	de novo
378	GEFS +	nonsense	rs13930071 5	CM024310	c.4532C>A	p.Ser1505Ter	24	N/A
450	DS	splice-site	-	CS096242	c.3879- 1G>T	-	IVS 19	не се намира в майка; баща не е изследван
449	DS	missence	-	CM096160	c.4787G>T	p.Arg1596Leu	25	de novo
446	GEFS +	missence	-	-	c.2804G>C	p.Arg935Pro	15	унаследена от болна майка; намерена при болна сестра

Нови варианти, с очакван патогенен ефект, недокладвани в литературните източници и бази данни								
393	GEFS+	nonsense	-	-	c.4744G>T	p.Glu1576Ter	25	N/A
398	GEFS+	frameshift	-	-	c.2136delC	p.Ser707AlafsTer3	12	N/A
540	DS	frameshift	-	-	c.3837_3843delAATTGTT	p.Iso1280MetfsTer7	19	de novo

N/A- не е проведен сегрегационен анализ, поради липса на материал от родителите

Потъмнено-отбелязаните диагнози от GEFS+ след извършването на секвенционния анализ биват прецизирани на DS.

Таблица 20. Намерени варианти с вероятно патогенен и вероятно непатогенен ефект чрез директно секвениране на ген *SCN1A*

Варианти с вероятно патогенен ефект								
Пробанд	Фенотип	Тип вариант	dbSNP	HGMD	HGVS κДНК номенклатура	HGVS протеинова номенклатура	Екзон/интрон	Унаследяване
499	DS	splice-site	rs796053007	-	c.4252-4A>G	-	IVS 21	N/A
522	GEFS+	missense	rs796053031	-	c.4980G>T	p.Met1654Ile	26	N/A
527	DS	missense	-	-	c.3929T>C*	p.Leu1310Pro	20	de novo
573	GEFS+	splice-site	-	-	c.2383-1G>A*	-	IVS 13	de novo
Варианти с вероятно непатогенен ефект								
477	FS+	splice- site	-	CS09 6242	c.603-91G>A**	-	IVS 4	брат хомозиготен носител; майка и баща- хетерозиготи
516	GEFS+	missense	rs121917906	CM10 8507	c.806G>C	p.Arg27Thr	1	N/A
550	ИГЕ							N/A
553	GEFS+							N/A
420	FS+	missense	rs121918817	CM03 4567	c.1625G>A	p.Arg542Gln	10	унаследенот болен баща
512	ИГЕ							липсва при засегнати родственици
482	GEFS+	missense	rs121918799	CM07 6496	c.3488C>G	p. Thr1174Ser	17	N/A
544	GEFS+							липсва при засегнати майка и сестра
555	ИГЕ	missense	rs121918769	CM09 3056	c.1811G>A	p.Arg604His	11	унаследена от здрав баща; липсва при засегнатата сестра и здрава майка
513	GEFS+	missense	rs121917956	CM08 1420	c.5749C>G	p.Arg1928Gly	26	липсва при клинично здрава майка

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

Таблица 21. Оценка на патогенността на установените „missense” варианти с патогенен и вероятно патогенен ефект в *SCN1A* гена с помощта на предиктивни програми Polyphen2, Provean и Mutation Taster.

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

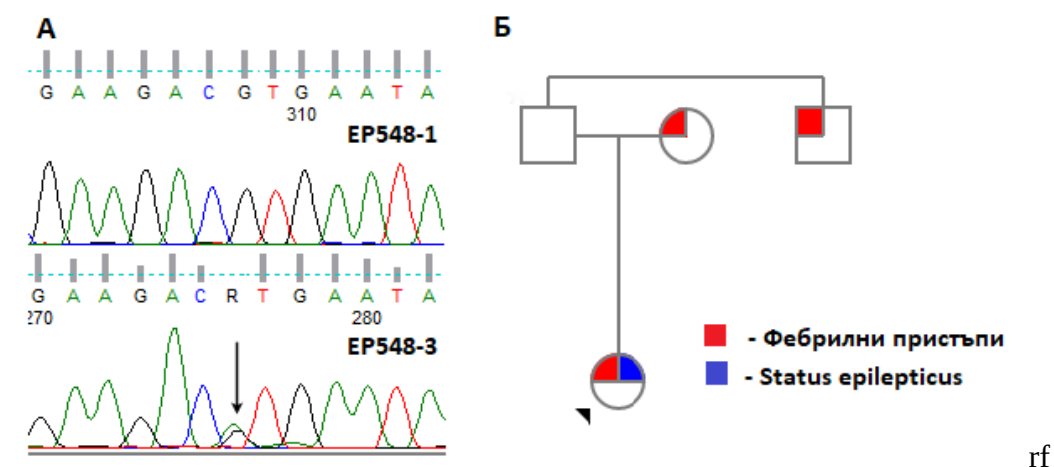
4.1.3. Патогенни варианти в *SCN1A* гена

От откритите общо осем патогенни варианти в *SCN1A* гена три са несинонимни АК замени, две мутации водят до образуване на стоп-кодон, две са делеции с изместване на рамката на четене и един вариант засяга канонично сплайс - акцепторно място. Пет от вариантите са докладвани в литературните източници и бази-данни, а три са нови, неописани досега в литературата.

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

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

Вариантът rs121918986 засяга екзон 21 от *SCN1A* гена е причинен от транзиция на гуанин в аденин в позиция 4153 от кодиращата последователност (GTG→ATG), което води до синтез на АК метионин вместо валин в кодон 1379 (p.Val1379Met) (Фигура 13А). Вариантът беше намерен в хетерозиготно състояние при пациент EP548, момиче на 2 години със суспектна диагноза DS. В анамнестичен аспект, пристъпите започват на 4-месечна възраст с характер на ГТКП, провокирани от висока температура. Впоследствие детето прави два status epilepticus, с продължителност 20 и 30 минути съответно. Всички регистрирани пристъпи по време на хоспитализацията са с начало лява ръка или крак и вторична генерализация. Лечението е с валпроат, към което се наблюдава добър отговор. До момента детето има нормално психомоторно развитие. В семейството съществуват данни за FS+ в детството при майката и брата на бащата, но проведения сегрегационен анализ не доведе до откриването на варианта при тях (Фигура 13Б). Заменената АК валин е с висока еволюционна консервативност в много видове (Фигура 15В). Мутацията не фигурира в ExAc базата-данни, където са публикувани варианти в *SCN1A* гена, намерени в здрави контролни индивиди (<http://exac.broadinstitute.org>).



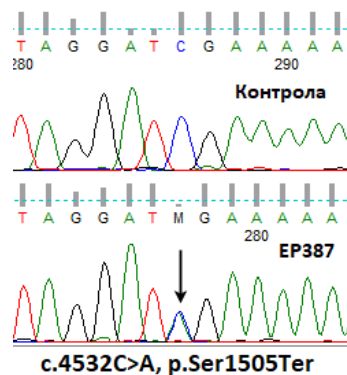
В

SCN1A, <i>H.sapiens</i>	NP_001159435.1	1342	GAIPSIMNVLLVCLIFWLIFSIMGVNLFAGKFYHCINTTTGDRFDIEDVN	1391
SCN1A, <i>P.troglodytes</i>	XP_003309330.1	1342	GAIPSIMNVLLVCLIFWLIFSIMGVNLFAGKFYHCINTTTGDRFDIEDVN	1391
SCN1A, <i>M.mulatta</i>	XP_001101023.1	1342	GAIPSIMNVLLVCLIFWLIFSIMGVNLFAGKFYHCINTTTGDRFDIEDVN	1391
SCN1A, <i>C.lupus</i>	XP_005640320.1	1342	GAIPSIMNVLLVCLIFWLIFSIMGVNLFAGKFYHCINTTTGDMFDITEVN	1391
SCN1A, <i>B.taurus</i>	NP_001180147.1	1331	GAIPSIMNVLLVCLIFWLIFSIMGVNLFAGKFYHCVNTTTGDMFDISEVN	1380
Scn1a, <i>M.musculus</i>	NP_061203.2	1331	GAIPSIMNVLLVCLIFWLIFSIMGVNLFAGKFYHCVNTTTGDIFEISEVN	1380
Scn1a, <i>R.norvegicus</i>	NP_110502.1	1342	GAIPSIMNVLLVCLIFWLIFSIMGVNLFAGKFYHCVNTTTGDTFEITEVN	1391
SCN1A, <i>G.gallus</i>	XP_003641634.1	1349	GAIPSIMNVLLVCLIFWLIFSIMGVNLFAGKFYVCVNTTTDERFEVDQIN	1398

Фигура 13. Вариант с.4135G>A p.Val1379Met в екзон 21 на ген *SCN1A*: **А.** Секвенционен профил при индексния пациент и здравата майка. **Б.** Родословно дърво на семейство 449, с означен носителски статус при изследваните членове. Със стрелка е показан индексния пациент в семейството. **В.** Еволюционна консервативност на заменената АК, сравнена при човек и при няколко други вида.

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

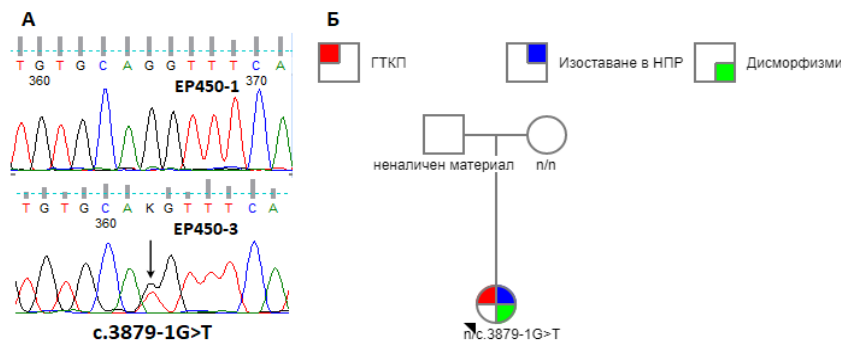
Вариантът rs139300715 е локализиран в екзон 24 от *SCN1A* гена и представлява трансверсия на цитозин в аденин в позиция 4532 от кодиращата последователност, което води поява на стоп кодон (TCG→TAG), прекъсване рамката на четене и преждевременно преустановяване синтезата на белтък в АК място 1505 (Фигура 14). Вариантът беше намерен в хетерозиготно състояние при пациент EP378, момче на 3 години със суспектна диагноза GEFS+ синдром. Началото на пристъпите е на 7-месечна възраст с поява на фокални фебрилно-провокирани пристъпи, които постепенно еволюират в ГТКП. Честотата на пристъпите 2-3 пъти в годината. Детето прави единичен status epilepticus, който бива овладян по време на хоспитализация и лечение. Използваните АЕМ са валпроат и леветирацетам, като в резултат се наблюдава редукция на пристъпите с 50%. Наблюдава се по-забавено моторно развитие в първите месеци от живота. Няма данни за фамилна обремененост. Неврологичният преглед показва леко намален мускулен тонус. Не разполагахме с материал от родителите за извършване на сегрегационен анализ. Мутацията, намерена при нашия пациент не се открива в ExAc базата-данни.



Фигура 14. Вариант c.4532C>A, p.Ser1505Ter в екзон 24 на ген *SCN1A*: Секвенционен профил при индексния пациент и здрава контрола.

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

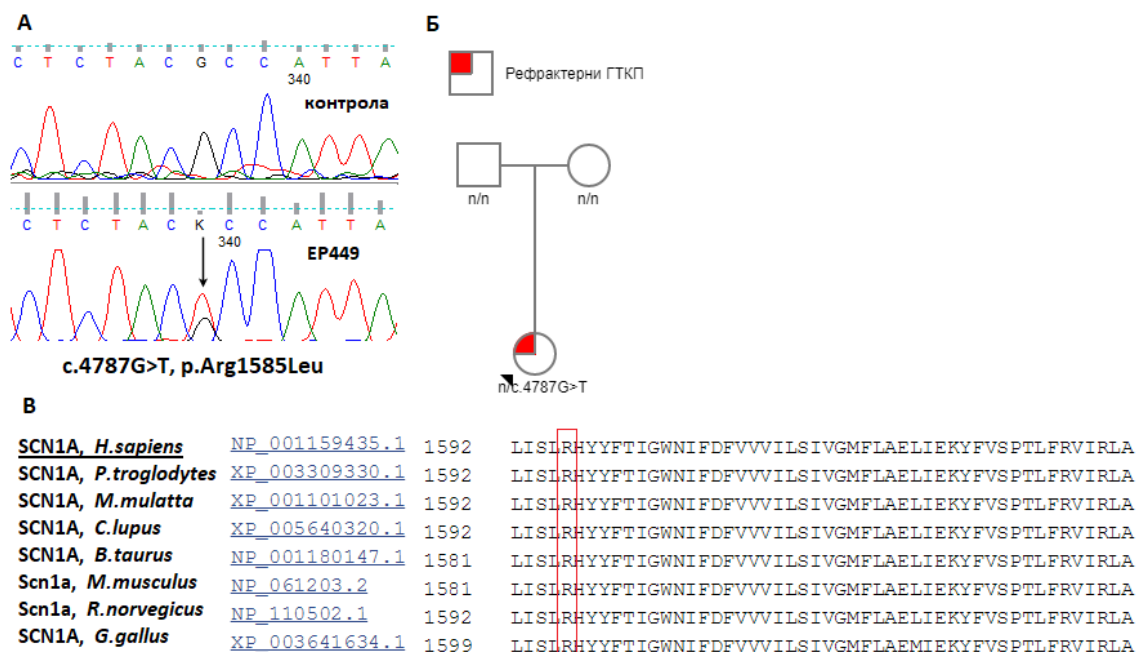
Вариантът c.3879-1G>T засяга гуанин в консервативното сплайс - акцепторно място AG на интрон 19 (Фигура 15А). Той е намерен в хетерозиготно състояние при пациент EP450, момиче на четири години с диагноза DS. На възраст от една година и два месеца започват непровокирани миоклонични и ГТКП, като броят им до момента е общо пет. След старта на пристъпите се наблюдава постепен регрес в развитието, в контекст на говора, както и поведенчески проблеми. Съществува анамнеза за прекаран единичен SE. При детето се наблюдават и други клинични характеристики – дифузно намален мускулен тонус, ниско разположени ушни миди и хипертелоризъм. Главата има стеснен битемпорален диаметър, наблюдава се шийна микрополиадения. Не се регистрират ЯМР отклонения. Лечението с леветирацетам не показва ефект. Секвенционният анализ на *SCN1A* гена при здравата майка разкри, че тя не носи мутацията (Фигура 15Б). Биологичен материал от бащата не бе предоставен, за да установим дали този вариант е унаследен или е възникнал *de novo*. С оглед на допълнителната симптоматика, наподобяваща синдромно състояние, ние проведехме и микрочипов анализ, чрез който не открихме значими структурни хромозомни изменения.



Фигура 15. Вариант c.3879-1G>T в интрон 19 на ген *SCN1A*: А. Секвенционен профил при индексния пациент и здравата майка. Б. Родословно дърво на семейство 449, с означен носителски статус при изследваните членове. Със стрелка е показан индексния пациент в семейството.

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

Вариантът CM096160 е резултат от трансверсия на гуанин в тимин в позиция 4787 (CGC→CTC) от кодиращата част на *SCN1A* гена, което води до замяна на еволюционно-консервативната аминокиселина аргинин с левцин в кодон 1596 (Фигура 16А, В). Мутацията беше намерена в хетерозиготно състояние при момиче на четири години с диагноза DS и без фамилна обремененост (Фигура 16А). Сегрегационният анализ потвърди, че мутацията е възникнала *de novo* (Фигура 16Б). Пристъпите при пациент EP449 са с фокално начало на 3-месечна възраст, с вторична генерализация, провокирани от висока температура и данни за единичен SE. Честотата им е 3-4 пристъпа месечно, като не се повлияват от лечението с валпроат, леветирацетам, оксарбазепин и клоназепам. Към момента психомоторното развитие е нормално. Вариантът не фигурира в ExAc базата-данни.

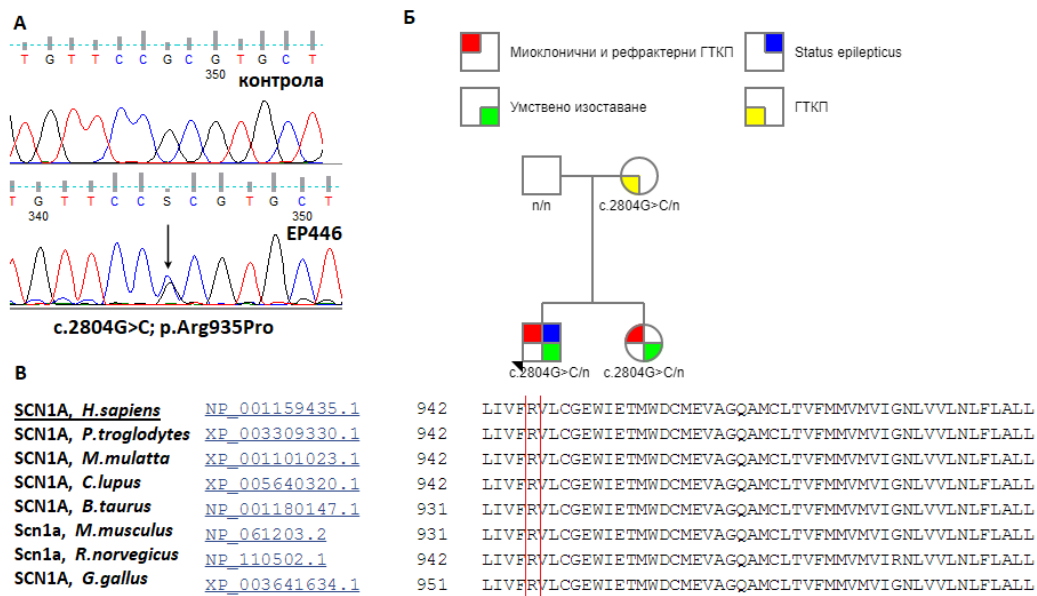


Фигура 16. Вариант c.4787G>T, p.Arg1596Leu в екзон 25 на ген *SCN1A*: **А.** Секвенционен профил при индексния пациент и здрава контрола. **Б.** Родословно дърво на семейство 449, с означен носителски статус при изследваните членове. Със стрелка е показан индексния пациент в семейството. **В.** Еволюционна консервативност на заменената АК, сравнена при човек при няколко други вида.

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

Молекулният вариант е от типа на промяна на смисъла и е локализиран в екзон 15 от *SCN1A* гена. Той се дължи на трансверсия на гуанин в цитозин в позиция 2804 (CGC/CCC) от кодиращата част на гена, в резултат на което се синтезира АК пролин вместо аргинин в кодон 935 (p.Arg935Pro) (Фигура 17А). Вариантът е намерен при пациент

EP446, момче на четири години, родено от нормално протекла бременност и диагноза GEFS+. Началото на пристъпите е на 4-месечна възраст с характер на миоклонични и ГТКП, като честотата им е много висока: 5-6 дневно. След старта им започва спад в развитието, като към момента EP446 има тежък ИД. Детето е преживяло status epilepticus, до момента няма отговор към приложеното АЕМ лечение (валпроева киселина, клоназепам, топирамат). Сегрегационният анализ показва, че мутацията е унаследена от болната майка с история за пристъпи в детството и присъства при засегнатата сестра, също с миоклонични пристъпи, в последствие с вторична генерализация и умерен ИД. Вариантът не се откри при клинично - здравия баща (Фигура 19Б). Заменената АК пролин има висока еволюционна консервативност (Фигура 19В). Предикционните програми Mutation taster, Polyphen и Provean определят варианта като увреждащ белтъчната структура или патогенен.



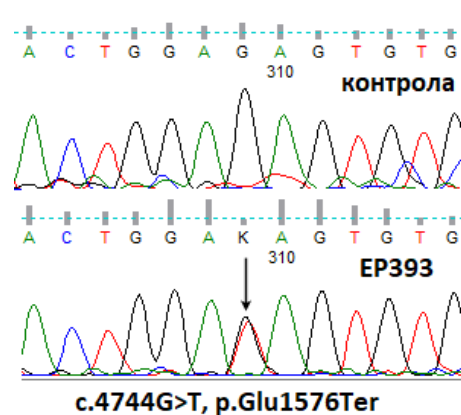
Фигура 17. Вариант c.2804G>C, p.Arg935Pro в екзон 15 на ген *SCN1A*: **А.** Секвенционни профили при индексния пациент EP446, болна сестра и родителите. **Б.** Родословно дърво на семейство 446, с означен носителски статус при изследваните членове. Със стрелка е показан индексния пациент EP446 в семейството. **В.** Еволюционна консервативност на заменената АК, сравнена при човек при няколко други вида.

4.1.3.2. Патогенни варианти, несъобщени в литературните източници

В настоящото проучване чрез директно секвениране на *SCN1A* гена открихме общо три нови варианти, недокладвани в литературните източници и бази-данни, но с очакван патогенен ефект върху функциите на белтъка (Таблица 19). Два от вариантите представляват делеции с изместване на рамката на четене (frameshift: c.2136delC, c.3837_3843delAATTGTT), а един вариант води до поява на предварителен стоп кодон и ранно прекратяване на синтеза на белтък (nonsense: p.Glu1576Ter).

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

Вариантът c.4744G>T засяга екзон 25 от *SCN1A* гена и представлява трансверсия на гуанин в тимин в позиция 4744 от кодиращата последователност, което променя кодон 1576 за АК глутамин в стоп - кодон (GAG→TAG) и води до прекъсване на синтеза на интактен белтък (Фигура 18). Мутацията беше намерена при пациент EP393, момче на четири години и диагноза GEFS+ синдром. Началото на ГТКП е на 7-месечна възраст, провокирани от висока температура. Честотата им е 1-2 пристъпа на всеки три месеца, като настоящото лечение е с валпроат и оксарбазепин, към които няма отговор. Детето е с нормално психомоторно развитие, като не съществуват данни за фамилна обремененост. Поради липса на материал от родителите не проведохме сегрегационен анализ. С оглед на факта, че замаяната води до синтеза на скъсен белтъчен продукт без домен DIV и C-краен домен, оценихме варианта като нарушаващ функциите на белтъка.

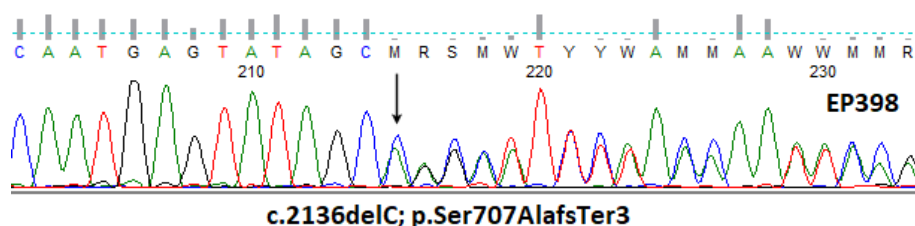


Фигура 18. Електрофореграми на индексния пациент EP393 и здрава контрола. Вариант c.4744G>T, p.Glu1576Ter в екзон 25 на ген *SCN1A*.

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

Установената мутация се намира в екзон 12 от *SCN1A* гена и се дължи на делеция на цитозин в позиция 2136 (GCC/G-), кодон 707 (p.Ser707Alafs). Това води до изместване на рамката на четене и поява на стоп - кодон три нуклеотида в посока 3' - в място 710 (Фигура 19). Резултат от това е синтеза на скъсен белтъчен продукт без домени DII, DIII и DIV, инактивационната цитоплазмена бримка, както и цитоплазмения C - краен домен от белтъка, което определя и нейния патогенен характер. Мутацията установихме при пациент EP398, момиче на девет години и ГТКП без фебрилна провокация. Началото на пристъпите е на 5- месечна възраст, с честота 1-2 ГТКП месечно. Проведеното лечение с диазепам, валпроева киселина, леветирацетам и ламотрижин не е довело до съществено намаляване и изчезване на пристъпите. Детето проявява хиперактивно поведение. Има данни за фамилност в семейството - баща с два фебрилни пристъпа около 2- годишна

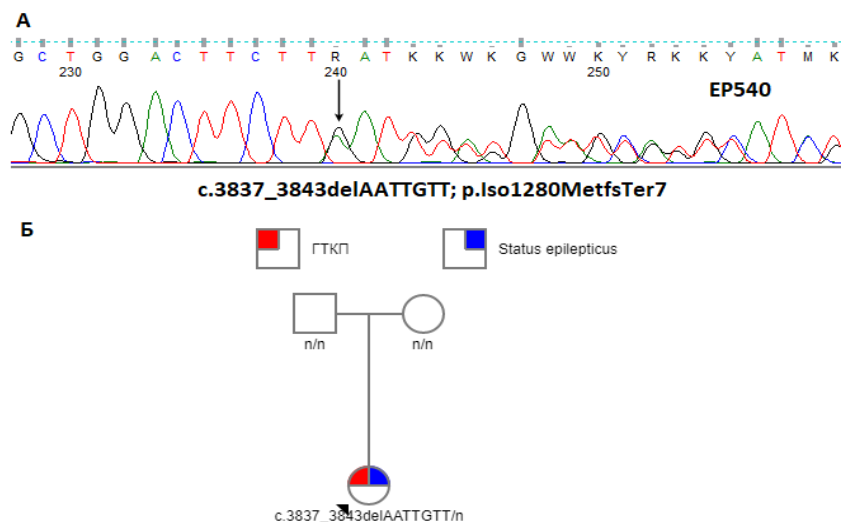
възраст, но не разполагаме с ДНК от родителите, за да проведем сегрегационен анализ с цел установяване на наследственост.



Фигура 19. Електрофореграма на мутация с изместване на рамката на четене p.Ser707AlafsTer3 в екзон 12 от *SCN1A* гена при пациент EP398.

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

Вторият вариант с изместване на рамката на четене се намира в екзон 19 и представлява делеция на 7 нуклеотида от позиция 3837 до позиция 3843 от *SCN1A* гена (AATTGTT/-) (Фигура 20А), като вместо изолевцин се синтезира метионин в кодон 1280 (p.Iso1280Metfs). В следствие на това, седем нуклеотида в посока 3', в място 1287 се появява стоп-кодон и се синтезира скъсен белтъчен продукт без домени DIII, DIV, разположената между тях инактивационна бримка, както и С-крайния домен. Всичко това определя патогенността на открития вариант. Той беше открит при пациент EP540, момиче на една година с диагноза DS. При нея началото на фебрилно провокираните пристъпи е на 7-месечна възраст, с характер на ГТКП и честота от един пристъп месечно. Има данни за прекаран SE и леко изоставане в моторното развитие в миналото. Родителите не съобщават за фамилна обремененост, а проведеният сегрегационен анализ установи, че варианта липсва при тях (Фигура 20Б).



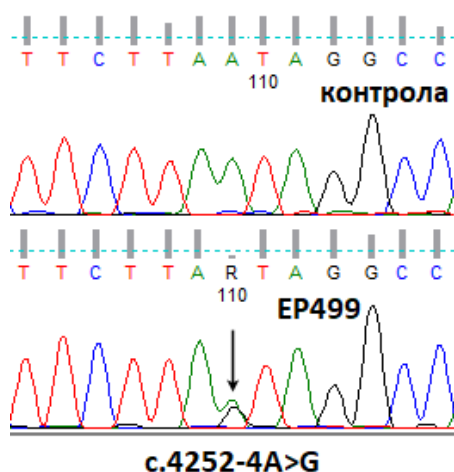
Фигура 20. Молекулен вариант с c.3837_3843delAATTGTT, p.Iso1280MetfsTer7 в екзон 19 на ген *SCN1A*:
 А. Секвенционен профил при индексния пациент. Б. Родословно дърво на семейство 540, с означен носителски статус при изследваните членове. Със стрелка е показан индексния пациент в семейството.

4.1.4. Варианти с вероятно патогенен ефект

Чрез директно секвениране на *SCN1A* гена открихме четири варианта в изследваната група пациенти, които класифицирахме като варианти с вероятно патогенен ефект. Два от вариантите представляват мутации от типа промяна на смисъла (р. Met1654Ile, р. Leu1310Pro), а два засягат сплайс – акцепторните места в различни райони от зреещата иРНК (с. 4252-4A>G, с. 2383-1G>A) (Таблица 19). Един missense вариант (р. Leu1310Pro) и един сплайс - акцепторен вариант (с. 2383-1G>A) са нови, неописани досега в обществено достъпните бази-данни и литературни източници.

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

Вариантът с.4252-4A>G е от тип сплайс-място мутация и представлява транзиция на консервативен нуклеотид аденин в гуанин в сплайс-акцепторното място на интрон 21 (Фигура 21). Беше открит при пациент EP499, момиче на шест години с диагноза GEFS+. Началото на фебрилно–провокираните ГТКП е на 5-годишна възраст, като честотата им е 3-4 пристъпа годишно. Лечението с валпроат и леветирацетам до момента няма ефект. Не съществуват данни за фамилна обременост и не разпологахме с материал от родителите за провеждане на сегрегационен анализ. Възможността за използване на алтернативно сплайс - място беше проверено чрез предикционната програма Human Splicing Finder. Анализът на секвенцията показва възможността за използване на алтернативно сплайс - акцепторно място 50 нуклеотида навътре в екзон 22 (Раздел Дискусия, Фигура 59). Вариантът е описан в базите-данни като вероятно патогенен.

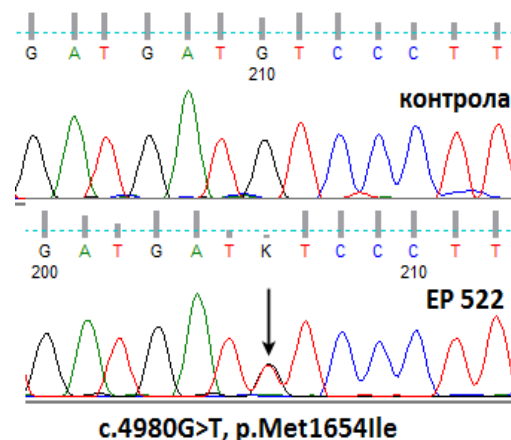


Фигура 21. Вариант с.4252-4A>G, rs796053007 в интрон 21 на ген *SCN1A*: Секвенционен профил при индексния пациент EP499 и изследвана контрола.

- **Вариант c.4980G>T, p.Met1654Ile, rs796053031 при пациент EP522**

Вариантът c.4980G>T е локализиран в екзон 26 от *SCN1A* гена. Резултат е от трансверсия на гуанин в тимин в позиция 4980 от кодиращата последователност (Фигура 22) и като резултат се синтезира АК изолевцин вместо метионин в кодон 1654. Открит е при пациент EP522, момиче на три години с диагноза GEFS+ синдром. Началото на фебрилно - провокираните ГТКП е на една година и осем месеца, като честотата им е един пристъп на четири месеца. Детето е преживяло единичен SE с продължителност 10 минути. Наблюдава се нестабилна походка със залитане във всички посоки. Лечението с валпроат дава добър отговор.

Съществуват данни за фамилна обремененост: майка с един FS в кърмаческа възраст, братче със съмнение за парциална епилепсия и установена чрез ЯМР киста в областта на амигдалата. Бабата по майчина линия е с диагноза епилепсия от 6- годишна възраст, като последния регистриран пристъп е на 30 години. До момента не е изпратен материал от родителите, за да се уточни носителския статус при тях с цел допълнително изясняване патогенността на открития вариант. Вариантът rs796053031 не е описан досега в литературата, но е публикуван в базата да ClinVar, където е определен като вероятно патогенен. Предикционните програми също го оценяват като вероятно патогенен (Таблица 20).



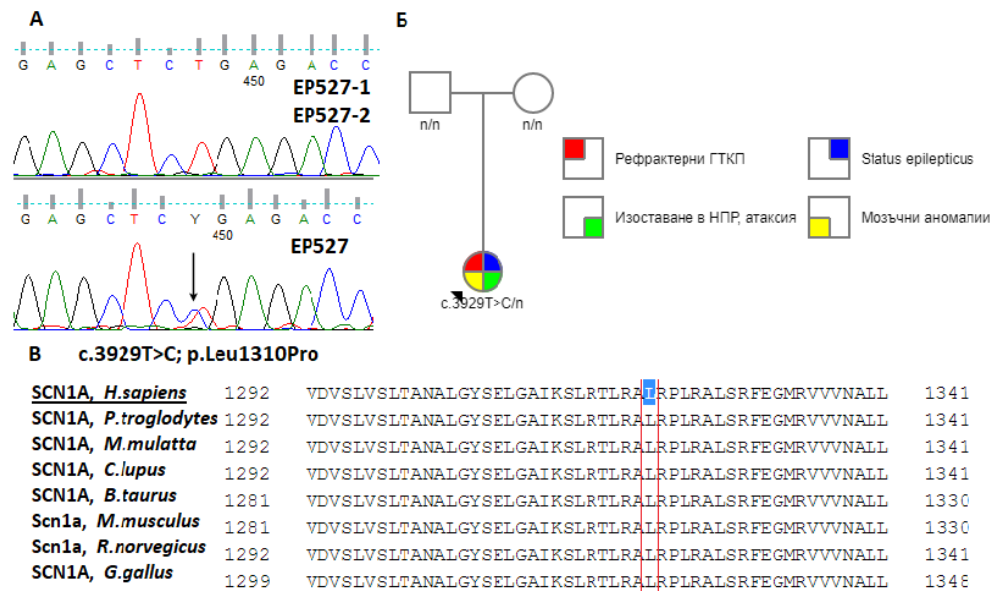
Фигура 22. Вариант c.4980G>T, p.Met1654Ile в екзон 26 на ген *SCN1A*; Секвенционен профил при индексния пациент EP522, сравнен с профила на здрава контрола.

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

Вариантът е от тип промяна на смисъла и е локализиран в екзон 20 от *SCN1A* гена. Резултат е от транзиция на тимин в цитозин в 3929 позиция от кодиращата последователност (Фигура 23A) и като резултат се синтезира пролин вместо левцин в кодон 1310 (CTG/CCG). Той е установен при пациент EP527, момче на две години с типична клинична изява на DS. Роден е преждевременно с асфиксия и лекостепенна дилатация на латералните мозъчни вентрикули. Началото на пристъпите е на 9- месечна

възраст, с характер на фебрилно провокирани ГТКП. Честотата им е 1-2 пристъпа месечно, като се наблюдават и три SE. Скоро след старта на ГТКП започва да се наблюдава забавяне в развитието, моторни проблеми и атаксия. Проведеният ЯМР показва асиметрия на двата хипокампа. Наблюдаваните пристъпи при детето са с терапевтична резистентност, тъй като лечението с няколко вида медикаменти (диазепам, оксарбазепин, клоназепам, метилпреднизолон, леветирацетам) не дава резултат. Соматичният статус включва микрополиадения и дисморфичен фациес - изпъкнали фронтални тубери, високо чело, лява очна цепка по-голяма от дясната, глава с квадратна конфигурация, ниско разположени ушни миди.

Вариантът не се откри при родителите (Фигура 23Б). Заменената АК е с висока еволюционна консервативност при няколко вида (Фигура 23В). В допълнение, трите предикционни програми Mutation taster, Polyphen и Provean го определят като вероятно патогенен (Таблица 20). Тези наблюдения, в комбинация с неговото *de novo* възникване заключихме, че той би могъл да е причината за епилептичния фенотип при EP527.

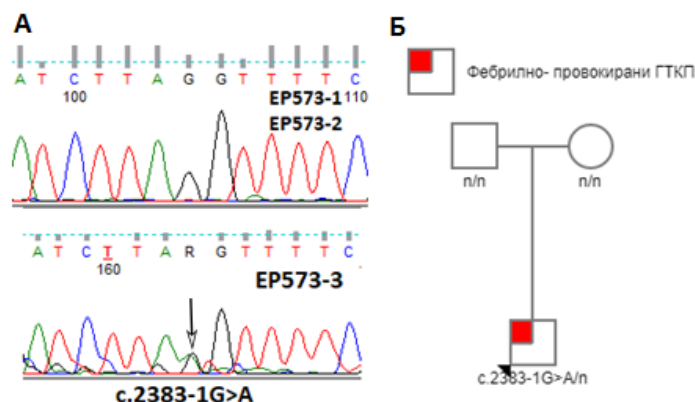


Фигура 23. Вариант c.3929T>C, p.Leu1310Pro в екзон 20 на ген *SCN1A*: **А.** Секвенционни профили при индексния пациент и клинично здравите родители. **Б.** Родословно дърво на семейство 527, с означен носителски статус при изследваните членове. Със стрелка е показан индексния пациент EP527 в семейството. **В.** Еволюционна консервативност на заменената АК, сравнена при човек при няколко други вида.

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

Вариантът c.2383-1G>A е нов, неописан до този момент в литературните източници и засяга каноничното сплайс - акцепторно място AG на интрон 13 от *SCN1A* гена (Фигура 24А). Той беше намерен при пациент EP573, момче на две години с диагноза GEFS+ синдром. Началото на ГТКП е на една година и пет месеца, като до момента няма отговор към проведеното лечение (валпроат, леветирацетам). Към момента детето е с нормално

психомоторно развитие. Няма данни за фамилна обремененост. Вариантът не беше открит при клинично-здравите родители (Фигура 24Б). Анализът на алтернативните сплайс-места чрез предикционни програми NetGene2 и Human Splicing Finder показва, че с най-висока степен на вероятност би могло да се използва AG динуклеотид, разположен 23 нуклеотида навътре в екзон 14 (Раздел Дискусия, Фигура 60).



Фигура 24. Вариант c.2383-1G>A в интрон 13 на ген *SCN1A*: **А.** Секвенционни профили при индексния пациент EP573 и клинично - здравите родители. **Б.** Родословно дърво на семейство 573, с означен носителски статус при изследваните членове. Със стрелка е показан индексния пациент EP573 в семейството.

4.1.5. Варианти с вероятно непатогенен ефект

В резултат от настоящото проучване бяха открити общо шест варианта с вероятно непатогенен ефект в 10 пациенти от изследваната група (7,5%). Три от тях са рекурентни, наблюдаващи се при повече от един пациент, а три варианта са открити при единични пациенти. Пет от вариантите представляват несинонимни замени с промяна на смисъла, а един засяга канонично място, участващо в зреенето на предматричната РНК (Таблица 22).

Таблица 22. Оценка на патогенността на установените „missense” варианти с вероятно непатогенен ефект в *SCN1A* гена с помощта на предиктивни програми Polyphen2, Provean и Mutation Taster.

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

4.1.5.1. Рекурентни варианти с вероятно непатогенен ефект

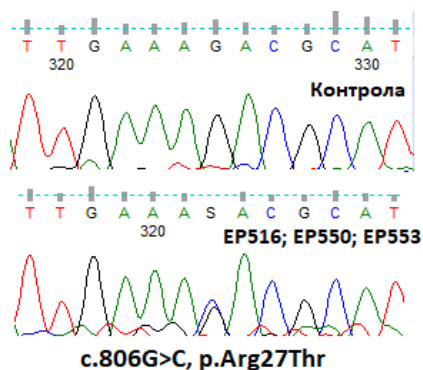
- **Вариант c.806G>C, p.Arg27Thr, rs121917906**

Вариантът rs121917906 се намира в екзон 1 от *SCN1A* гена и е резултат от трансверсия на гуанин в цитозин в позиция 80 от кодиращата последователност (AGA>ACA) (Фигура 25). Това води до замяна на аргинин с тирозин в кодон 27 (p.Arg27Thr). Вариантът беше открит при трима пациенти от нашата група: EP516, EP550 и EP553. Пациент EP516 е момче на седем години от ромски произход с диагноза GEFS+ синдром и изоставане в НПР. Началото на фебрилно - провокираните ГТКП е на 2-годишна възраст, като до момента няма ефект от проведеното лечение с валпроева киселина. Няма данни за фамилна обремененост.

Пациент EP550 е момче на пет години също от ромски произход с диагноза ИГЕ. Детето е родено от патологична бременност с кървене между III и VII месец, с асфиксия непосредствено след раждането и съмнение за фетален алкохолен синдром. Началото на непровокираните ГТКП е на 10-месечна възраст, детето е прекарало единичен SE. Допълнително се наблюдава изоставане в НПР с невъзможна самостоятелна походка, както и детска церебрална парализа с квадрипареза и хиперрефлексия. Ефект от досегашното лечение с леветирацетам, валпроат и клоназепам няма. Родителите не съобщават за фамилна обремененост.

Пациент EP553 е момиче на три години от ромски произход с диагноза GEFS+ синдром. Началото на фебрилно - провокираните пристъпи е на 11-месечна възраст, с характер на ГТКП, като до момента са общо пет с продължителност от 1-5 минути. Психомоторното развитие е нормално. Има данни за фамилна обремененост - майка и баща с единичен фебрилен пристъп в детството.

В нито едно от трите семейства не проведохме сегрегационен анализ за допълнително изясняване на патогенността на варианта, поради непредоставяне на материал от родителите. В допълнение, предикционните програми дават противоречиви оценки относно патогенността му (Таблица 22).



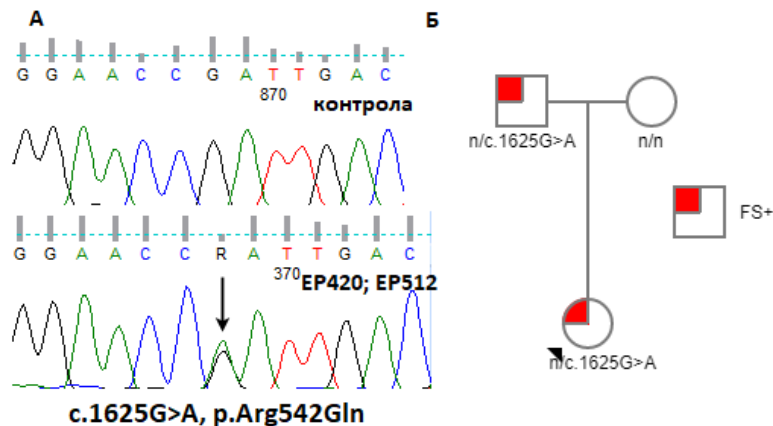
Фигура 25. Вариант c.806G>C, p.Arg27Thr в екзон 1 на ген *SCN1A*: **А.** Секвенционен профил при пациенти EP516, EP550 и EP553, сравнени със здрава контрола.

- **Вариант c.1625G>A, p.Arg542Gln, rs121918817**

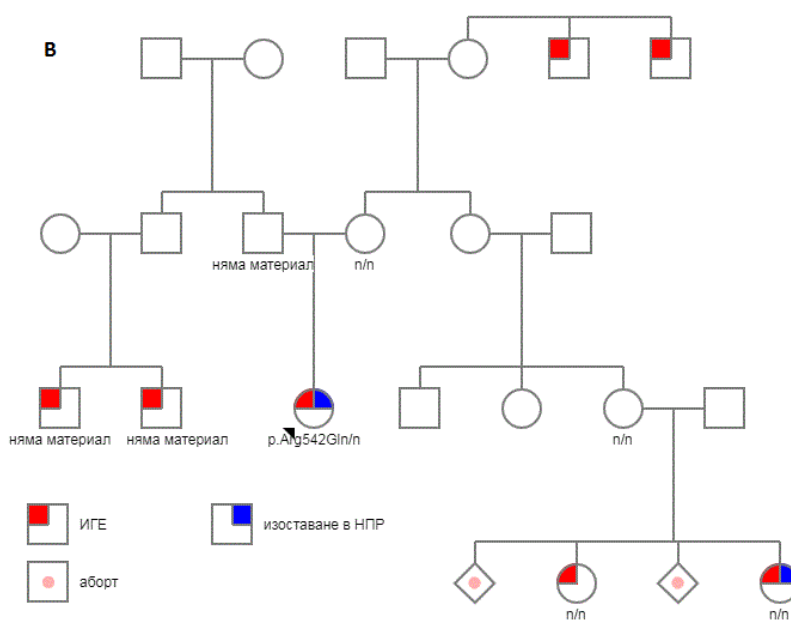
Вариантът rs121918817 се намира в екзон 10 от *SCN1A* гена и се дължи на транзиция на гуанин в аденин в позиция 1625 от кодиращата последователност (Фигура 26). Това води до замяна на аргинин с глутамин в кодон 542. Заменената аминокиселина е част от DI-DII - свързващия участък на протеина. Вариантът беше открит при двама пациенти от изследваната група: EP420 и EP512.

Пациент EP420 е момче на шест години от ромски произход с диагноза FS+. Старта на фебрилно-провокираните ГТКП е на една година. Възрастта на хоспитализация е 2-годишна възраст, където в допълнение на пристъпите, се наблюдава нестабилна походка на широка основа. Има данни за фамилна обремененост: бащата е с единичен FS в детска възраст. Сегрегационният анализ в семейството показва, че варианта е унаследен от него, докато при клинично-здравата майка липсва.

Пациент EP512 е момиче на седем години от ромски произход и диагноза ИГЕ. Началото на ГТКП е на 10-месечна възраст като до момента има прекаран единичен SE. Допълнително се наблюдава изоставане в НПР. Лечението с валпроат дава добър отговор - наблюдава се 50% намаляване честотата на пристъпите. Фамилната анамнеза включва родственици по бащина и майчина линия с данни за епилептични пристъпи. Вариантът не сегрегира в семейството - отсъства при майка, първа братовчедка на майката и нейните деца (Фигура 26B). Не разполагахме с материал от бащата и неговите родственици, за да проведем сегрегационен анализ при тях.



Фигура 26. Вариант c.1625G>A, p.Arg542Gln в екзон 10 на ген *SCN1A*: **А.** Секвенционни профили пациенти EP420 и EP512, сравнени със здрава контрола. **Б.** Родословно дърво на семейство 420, с означен носителски статус при изследваните членове. Със стрелка е показан индексния пациент EP420 в семейството. **В.** Родословно дърво на семейство 512, с означен носителски статус при изследваните членове. Със стрелка е показан индексния пациент EP512 в семейството.

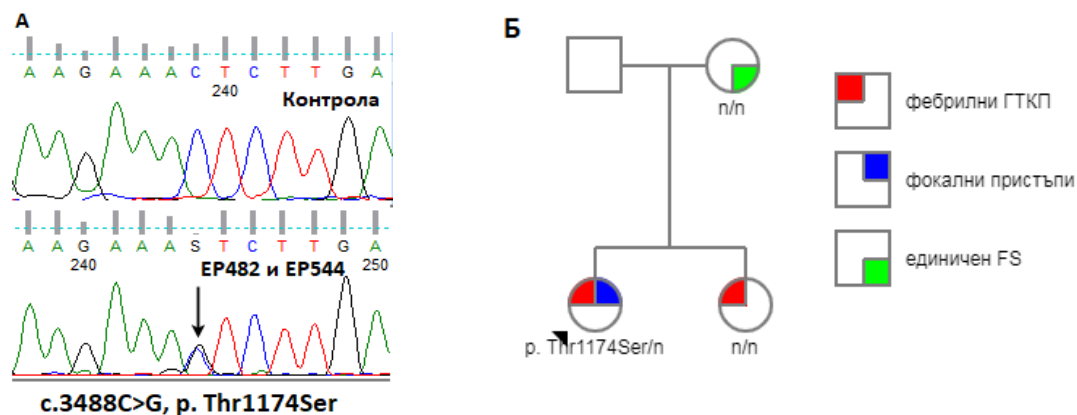


- **Вариант c.3488C>G, p. Thr1174Ser, rs121918799**

Вариантът rs121918799 е локализиран в екзон 17 от *SCN1A* гена. Дължи се на трансверсия на цитозин в гуанин в позиция 3488 от кодиращата последователност (Фигура 27А), което води до синтез на АК серин вместо треонин в кодон 1174 (p. Thr1174Ser). Вариантът беше намерен при двамата пациента от изследваната група: EP482 и EP544.

Пациент EP482 е момиче от български произход и диагноза GEFS+ синдром. Дебютът на пристъпите е на 8-месечна възраст с генерализиран атоничен гърч, който в последствие еволюира в ГТКП. Честотата на пристъпите е три пъти месечно, като има данни за прекаран единичен SE. Наблюдава се нормално НТР. Отговорът към лечението с валпроат и леветирацетам е добър. Има фамилни данни за епилепсия: първи братовчед с единичен FS+, но не проведехме анализ за носителство в семейството, поради липса на материал от членовете му.

Пациент EP544 е момиче на шест години, родено недоносено след майчино-фетална инфекция и кървене. В неонаталния период получава няколко афект-респираторни пристъпи, след което на фона на висока температура се появява фебрилен ГТКП и парциални пристъпи с адверзия на очите. В миналото е имала задръжка в развитието – по-късно проговорила и започнала да сядва, но в момента НТР е нормално. Няма ефект от настоящото лечение (валпроат, леветирацетам). Съществуват данни за фамилна обремененост: майка с единичен FS, по-малка сестра със съмнение за GEFS+ синдром. Проведеният сегрегационен анализ не показва наличие на варианта при тях, той не сегрегира в семейството (Фигура 27Б). В допълнение, предикционните програми единодушно определят варианта като неутрален към белтъчната структура и функция (Таблица 22).



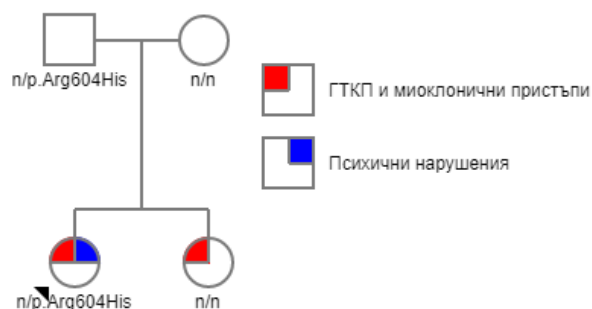
Фигура 27. Вариант c.3488C>G, p. Thr1174Ser в екзон 17 на ген *SCN1A*: **А.** Секвенционен профил при пациенти EP482 и EP544, сравнени със здрава контрола. **Б.** Родословно дърво на семейство 544, с означен носителски статус при изследваните членове. Със стрелка е показан индексния пациент EP544 в семейството.

4.1.5.2. Нерекурентни варианти с вероятно непатогенен ефект

- **Вариант c.1811G>A, p.Arg604His, rs121918769 при пациент EP555**

Вариантът се намира в екзон 11 от *SCN1A* гена и е резултат от транзиция на гуанин в аденин в позиция 1811 от кодиращата последователност (CGT/CAT) (Фигура 29А). Това води до замяна на АК аргинин с хистидин в кодон 604 (p.Arg604His).

Открит е при пациент EP555, момиче на 29 години със съмнение за ювенилна миоклонична епилепсия: ЈМЕ. Първият пристъп е ГТКП на 11-годишна възраст, придружен със силно главоболие в комбинация с миоклонични пристъпи. Провокационен фактор се посочва стрес и психическо натоварване. В допълнение, пациентката има психически отклонения при наличие на нормално интелектуално развитие (получава паник - атаки, диагноза обесивно-компулсивно разстройство), които контролира с прием на медикаменти. По отношение на епилепсията, лечението е с валпроат и ламотрижин, които водят до 50% намаляване на пристъпите, но не и до пълното им изчезване.

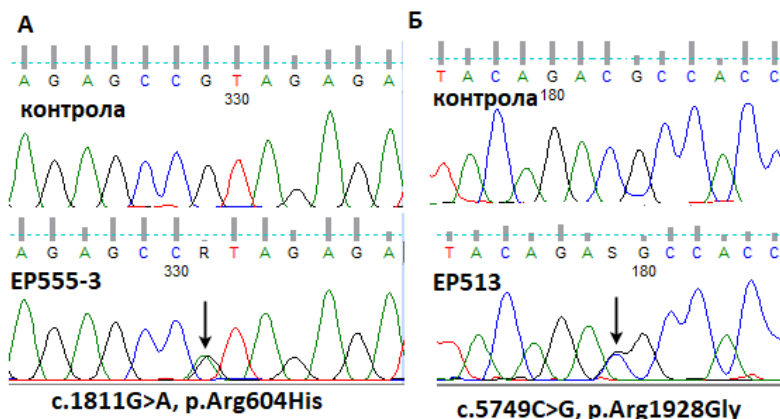


Фигура 28. Родословно дърво на семейство 555, с означен носителски статус при изследваните членове. Със стрелка е показан индексния пациент EP555 в семейството.

Има данни за фамилност: по-малка сестра с миоклонични и ГТКП с начало в по късна възраст - 18 години. Проведеният анализ при родствениците показва, че варианта не сегрегира с клиничния фенотип в семейството: отсъства при засегнатата сестра и здрава майка, а е унаследен от здрав баща (Фигура 28).

- **Вариант c.5749C>G, p.Arg1928Gly, rs121917956 при пациент EP513**

Вариантът е локализиран в екзон 26 от *SCN1A* гена и е резултат от трансверсия на цитозин в гуанин в позиция 5749 от кодиращата последователност (CGC/GGC) (Фигура 29Б), което води до синтез на АК глицин вместо аргинин в кодон 1928 (p.Arg1928Gly). Беше открит при пациент EP513, момиче на седем години с диагноза атипична епилепсия и съмнение за GEFS+ синдром. Първият пристъп е с характер на ГТКП на 5-годишна възраст, провокиран от висока температура. Впоследствие се появяват и миоклонии. Съществуват фамилни данни за епилепсия в семейството: брат на бабата по бащина линия с FS+ с начало на 2- годишна възраст и продължителност на пристъпите две години. Проведеният сегрегационен анализ не откри варианта при клинично-здравата майка. Не разполагахме с материал от бащата, за да проведем анализ за носителство при него. Допълнително, предикционните програми дават противоречиви оценки относно патогенността на p.Arg1928Gly (Таблица 22).



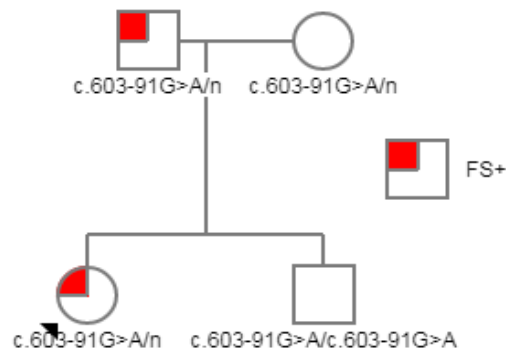
Фигура 29. Секвенционни профили на пациенти EP555 и EP513, сравнени със здрава контрола. **А.** Вариант c.1811G>A, p.Arg604His в екзон 11 на ген *SCN1A* при EP555. **Б.** Вариант c.5749C>G, p.Arg1928Gly при пациент EP513.

- **Вариант c.603-91G>A, CS096242 при пациент EP477**

Молекулярният полиморфен вариант е локализиран в интрон 4 и засяга консенсусно донорно сплайс-място, необходимо за правилното зреење на иРНК. Вариантът беше намерен в пациент EP477, момиче на четири години с изява на фебрилно-провокирани ГТКП с начало на 1- годишна възраст. Съществуват фамилни данни за епилепсия в семейството: баща с фебрилни пристъпи и текущо лечение с валпроат. Проведеният

сегрегационен анализ показва, че варианта се намира в хетерозиготно състояние при него, както и при здравата майка, а в хомозиготно състояние - в клинично здравия брат на пробанда (Фигура 30).

По литературни данни, намереният интронен вариант не е достатъчна причина за изява на епилептични пристъпи, но се явява рисков фактор за развитие на FS+ (Раздел Дискусия; 242,243).



Фигура 30. Родословно дърво на семейство 477, с означен носителски статус при изследваните членове. Със стрелка е показан индексния пациент EP477 в семейството.

4.2. Резултати от MLPA анализа на *SCN1A* гена

Директното секвениране по Сангер не може да детектира цялостно екзонни делеции/дупликации, както и по-големи промени в броя копия от фрагменти, съдържащи целия ген. За тази цел използвахме метода на мултиплексен амплификационен анализ на лигирани проби (MLPA).

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

4.3. Резултати от секвенционния анализ на *SLC2A1* гена

4.3.1. Клиничен материал

В настоящото проучване, за изследване на *SLC2A1* гена чрез директно секвениране по Сангер бяха включени 14 пациенти със съмнение за GLUT1 дефицит, 10 пациенти с ИГЕ/ГГЕ в комбинация с интелектуален дефицит или изоставане в НПР, 10 пациенти с МАЕ и седем пациенти с детска абсансна епилепсия (CAE) (n=41). Подгрупа CAE се характеризират с наличие на генерализирани абсанси със старт в детска възраст (около

четири години) без данни за допълнителни невропсихиатрични проблеми. При подгрупа ИГЕ/ГГЕ, се включват пациенти с изява на различни типове непровокирани пристъпи, в това число и абсанси, както и изоставане в ННР и/или когнитивно поведенчески проблеми без ясна етиология. При подгрупата със съмнение за GLUT1 дефицит се наблюдават най-характерните за синдрома черти, но не и пълния спектър от типична GLUT1 DS симптоматика – основно генерализирани абсанси, ГТКП, миоклонични пристъпи, микроцефалия, ИД, а понякога и моторни проблеми.

4.3.2. Молекулярно-генетично изследване

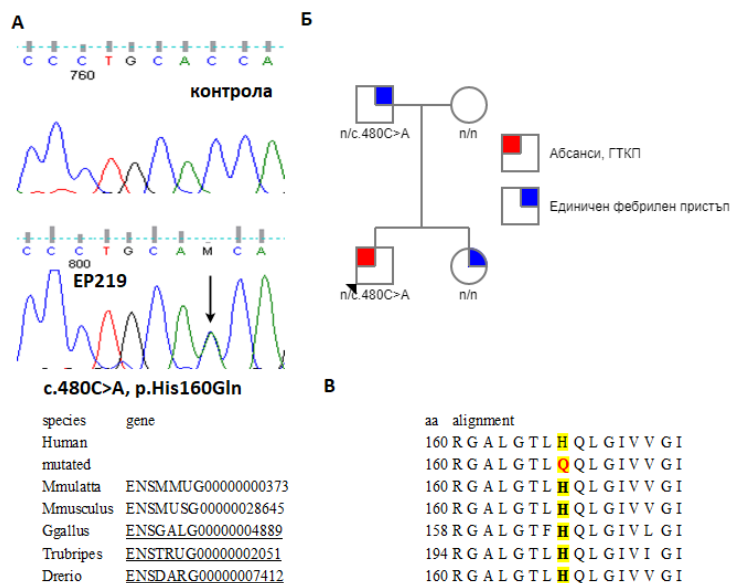
В рамките на настоящото проучване беше проведен секвенционен анализ на всичките 10 екзона, както и екзон - интронните граници от *SLC2A1* гена (OMIM: 138140, транскрипт: ENST00000426263.8). Условиата за амплификация и секвениране бяха оптимизирани, както е показано в Раздел Материали и методи, таблици 3, 4 и 5, използвайки праймери, чийто секвенции са показани в **Приложение 6**. Всички генерирани последователности от гена бяха сравнени с референтна секвенция NM_006516 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Намерените варианти бяха проверени в наличните обществени бази-данни ExAc, ClinVar, dbSNP, HGMD. Ефектът върху белтъка, както и патогенността на новооткритите варианти беше оценен чрез използването на предикционните програми Polyphen2, Provean/SIFT и Mutation Taster. В резултат от настоящото проучване, открихме две неописани досега в литературата точкови мутации при двама пациенти с различен фенотип от изследваната група: една трансверсия от тип промяна на смисъла (missense) и един вариант, водещ до прекъсване на рамката на четене (nonsense).

- **Вариант с.480C>A, p.His160Gln при пациент EP219**

Мутацията с.480C>A засяга екзон 4 от *SLC2A1* гена и е резултат от трансверсия на цитозин в аденин в 480 позиция от кодиращата последователност (Фигура 31А), с което се синтезира АК глутамин вместо хистидин в кодон 160 (CAC→CAA). Вариантът е открит при пациент EP219, момче на 13 години с електро-клинични данни за САЕ/ЈМЕ. Заболяването започва на 10- годишна възраст, когато родителите забелязват втрещаване, детето става неконтakтно в продължение на 1-2 минути, след което се наблюдава обръщане на главата и потрепване на крайниците, стегната челюст, периорална цианоза, с последващо главоболие, сънливост и отпуснатост за кратко.

Съществуват данни за епилепсия в семейството - баща с един FS+ в детството и сестра с единичен FS+ през първата година от живота. Проведеният сегрегационен анализ показва, че p.His160Gln е унаследен от бащата, но не присъства в засегнатата сестра (Фигура 31Б). Той засяга еволюционно консервативна АК (Фигура 31В) и е неописан

досега в литературата и базите-данни. В допълнение, предикционните програми единодушно го определят като увреждащ белтъчната структура.

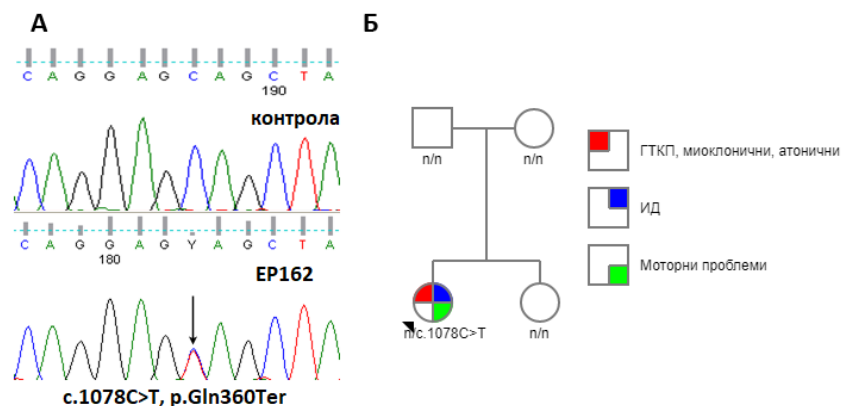


Фигура 31. Вариант c.480C>A, p.His160Gln в екзон 4 на ген *SLC2A1*: **А.** Секвенционен профил при индексния пациент, сравнен със здрава контрола. **Б.** Родословно дърво на семейство 219, с означен носителски статус при изследваните членове. Със стрелка е показан индексния пациент EP219 в семейството. **В.** Еволюционна консервативност на заменената АК, сравнена при човек при няколко други вида.

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

Вариантът засяга екзон 9 от *SLC2A1* гена и е резултат от транзиция на цитозин в тимин в позиция 1078 от кодиращата последователност (Фигура 32А). В резултат се променя кодон 360 за АК глутамин в стоп-кодон (CAG/TAG) и като резултат се прекъсва рамката на четене, необходима за синтеза на интактен белтък.

Вариантът беше намерен при пациент EP162, 12- годишно момиче с изява на разнообразни пристъпи и изоставане в НПР. Заболяването започва на възраст от две години с поява на непровокирани ГТКП 1-3 пъти дневно, в комбинация с миоклонични и атонични пристъпи. В допълнение се наблюдават понижен мускулен тонус, тремор и лека атаксия. Детето е имало затруднения в училище, лек ИД и депресивни състояния. Анализът на концентрацията на глюкоза в кръвта, сравнена с тази в цереброспинална течност (ЦСТ) показва ниско съотношение ЦСТ/кръвна глюкоза= 0.38 mmol/l. Лечението с валпроат и топирамат не показва съществен ефект - към днешна дата пациента има редки атонични пристъпи. Няма данни за фамилна обремененост. Проведеният сегрегационен анализ показва, че вариантът липсва при здравите родители (Фигура 32Б).



Фигура 32. Вариант c.1078C>T, p.Gln360Ter в екзон 9 на ген *SLC2A1*. **А.** Секвенционен профил пациент EP162, сравнен със здрава контрола. **Б.** Родословно дърво на семейство 162, с означен носителски статус при изследваните членове. Със стрелка е показан индексния пациент EP162 в семейството.

4.4. Резултати от MLPA анализа на *SLC2A1* гена

За търсене на екзонни делеции и дупликации в *SLC2A1* гена включихме 13 пациенти от подгрупа GLUT1 DS, при които не бяха открити патогенни точкови варианти. MLPA анализът при тях не установи наличие на промени в броя копия, засягащи *SLC2A1* гена.

4.5. Резултати от секвенционния анализ на *KCNQ2* гена

4.5.1. Клиничен материал

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

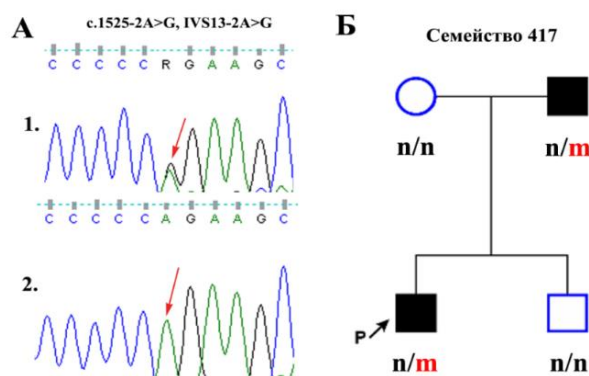
4.5.2. Молекулярно – генетично изследване

Като първа стъпка в настоящото проучване, бяха амплифицирани и секвенирани по метода на Сангер всички 17 екзона и екзон-интронни граници от *KCNQ2* гена (OMIM: 602235) (транскрипт ENST00000359125.6). Използвахме набор от праймери (Приложение 5), публикувани от Claes и съавтори (244), като условията за амплификация и секвениране бяха оптимизирани, както е показано в Раздел Материали и методи, таблици 3 и 4. Продуктите на PCR реакцията бяха визуализирани на агарозен гел и подложени на секвениране.

В резултат от секвенирането по Сангер открихме два точкови варианта в *KCNQ2* гена – непубликуван досега сплайс-място вариант и известна мутация с промяна на смисъла при двама пациенти от изследваната група.

• Вариант с.1525-2A>G, IVS13-2A>G в семейство 417

В настоящото проучване беше открит нов хетерозиготен сплайс-акцепторен вариант с.1525-2A>G, IVS13-2A>G, засягащ сплайс-акцепторното място на интрон 13 в *KCNQ2* гена (Фигура 33А). Вариантът беше намерен при момче на една година, родено от втора нормално протекла бременност и раждане. На втория ден след раждането получава единичен клоничен пристъп с продължителност от няколко секунди. На следващия ден получава втори пристъп със същите характеристики, в комбинация с цианоза, които прогресират в ГТКП. След назначаване на лечение с фенobarбитал, пристъпите постепенно изчезват. Проведеният сегрегационен анализ при семейство 417 показва, че сплайс - вариантът е унаследен от бащата, с данни на BFNC в неонаталния период, постепенно изчезнали в по-късните етапи от живота. Вариантът липсва при клинично здравите майка и по-малък брат (Фигура 33Б).

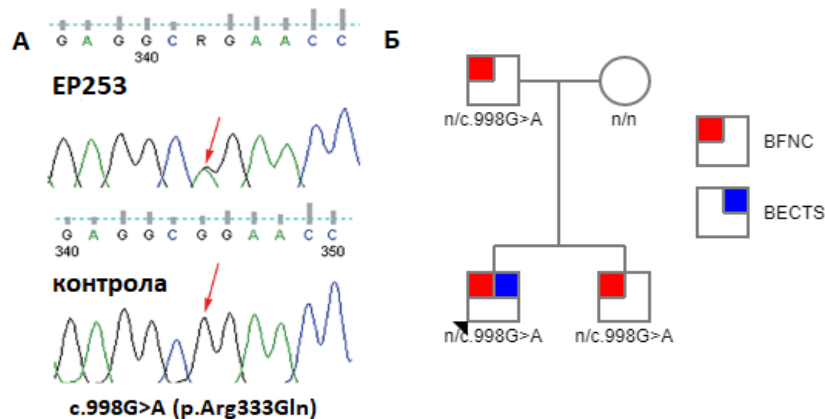


Фигура 33. А. Електрофоретичен профил на мутацията с.1525-2A>G, IVS13-2A>G при 1. Пациент 417 и 2. здрава контрола. **Б.** Сегрегационен анализ на семейство 417; Със стрелка е показан индексния пациент ЕР417; **n**- нормален алел; **m**- мутантен алел.

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

Вариантът е от типа промяна на смисъла, засяга екзон 7 от *KCNQ2* гена, резултат от транзиция на гуанин в аденин в позиция 998 от кодиращата последователност (Фигура 34А), което води до синтеза на АК глутамин вместо аргинин в кодон 333 (CGG→CAG). Вариантът беше намерен при 7-годишно момче, родено от патологично протекла бременност с рекурентен генитален херпес. На 4-месечна възраст започват парциални тонично-клонични пристъпи в комбинация с цианоза и девиация на очите. Заради по-късния старт на пристъпите се поставя диагноза BFNC. Постепенно пристъпите стават по-чести с продължителност от няколко секунди до една минута. Лечението с валпроат, оксарбазепин и диазепам не дава съществени резултати. В последствие се наблюдава отшумяване на пристъпите, докато на възраст от една година и 10 месеца настъпва единичен пристъп с цианоза след удар в главата. Следващият пристъп настъпва на 3-годишна възраст, когато по време на сън се наблюдава стягане на ръцете в юмруци и издаване на стенещи звуци. Тези два последователни пристъпа са с Роландова характеристика. Следва лечение с карбамазепин, след което се наблюдава постепенното им изчезване.

Съществуват данни за фамилна обремененост в семейството: баща с неонатални конвулсии в детството, постепенно отшумели в по-късните етапи от живота и по-малък брат с диагноза BFNC. Проведеният сегрегационен анализ показва наличие на варианта при тях и отсъствието му при здравата майка (Фигура 34Б).



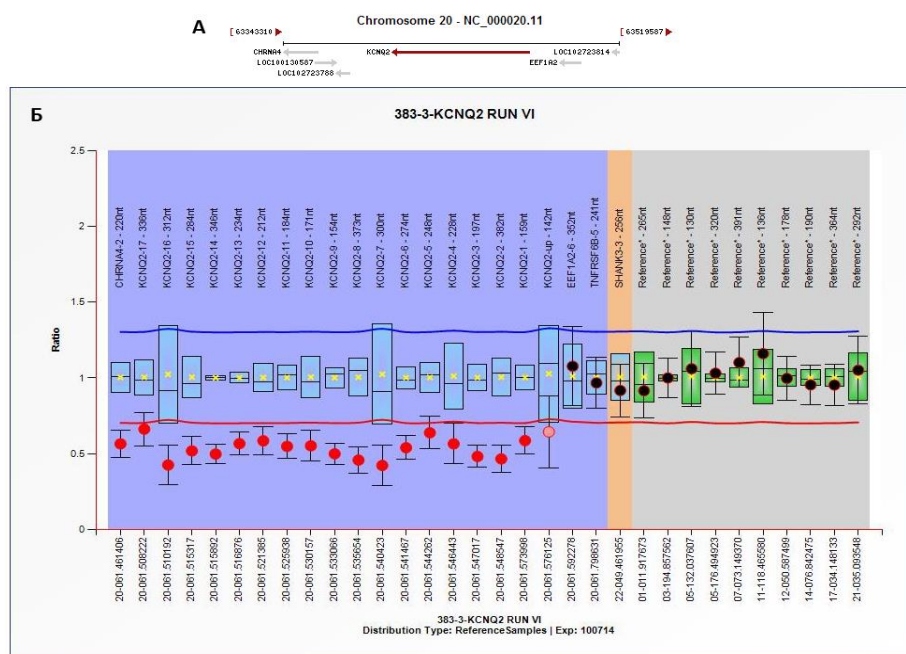
Фигура 34. Вариант c.998G>A, p.Arg333Gln в екзон 7 на ген *KCNQ2*. **А.** Секвенционни профили при индексния пациент и здрава контрола. **Б.** Родословно дърво на семейство 253, с означен носителски статус при изследваните членове. Със стрелка е показан индексния пациент EP253 в семейството.

4.6. Резултати от MLPA анализа на *KCNQ2* гена

Пациентите, при които не бяха установени точкови мутации и/или малки инсерции/делеции при секвенирането на ген *KCNQ2*, бяха включени в изследване за търсене на по-големи делеции/инсерции, обхващащи цели екзони на *KCNQ2* или целия ген, чрез метода MLPA.

Беше установена една хетерозиготна делеция на целия ген *KCNQ2* (20q13.3), при пациент EP383 с BFNC (Фигура 35Б). Делецията е възникнала *de novo*, тъй като родителите на пациента притежават по две копия на *KCNQ2* гена. Пациент EP383 е момиче на една година, родено от нормално протекла бременност. На 5-дневна възраст получава фокален тонично-клоничен пристъп с цианоза, девиация на очите и главата и продължителност от около една минута. През следващите 24 часа подобни конвулсии се повтарят 10 пъти. След лечение с фенobarбитал пристъпите постепенно изчезват. Пациент EP383 има нормално психомоторно развитие.

Фрагментният MLPA анализ показва, че делецията вероятно започва от *KCNQ2* гена, тъй като сондата, която хибридизира в ген *EEF1A2*, разположен в 5'-посока спрямо *KCNQ2* и в близост до него, е в 2 копия. Тя обаче се простира извън *KCNQ2* гена, тъй като се установява по едно копие, както на сондите за 17-те екзона на *KCNQ2* гена, така и на сондата, която хибридизира в ген *CHRNA4*, разположен в 3'-посока спрямо *KCNQ2* (Фигура 35А,Б). Впоследствие беше извършен микрочиповия анализ на сравнителна геномна хибридизация (aCGH) с цел установяване на размера и границите на делецията, който показва, че тя е с размер 411 Кб и засяга осем OMIM гена, два от които са свързани с електро-клиничен фенотип (Раздел Дискусия, Фигура 66).



Фигура 35. А. Схематично разположение на гените в хромозомен район 20q13.3. **Б.** Резултат от MLPA анализ в ген *KCNQ2* при пациент EP383 с делеция в хромозомен район 20q13.3.

4.7. Резултати от микрочиповия анализ

4.7.1. Подбор на пациенти

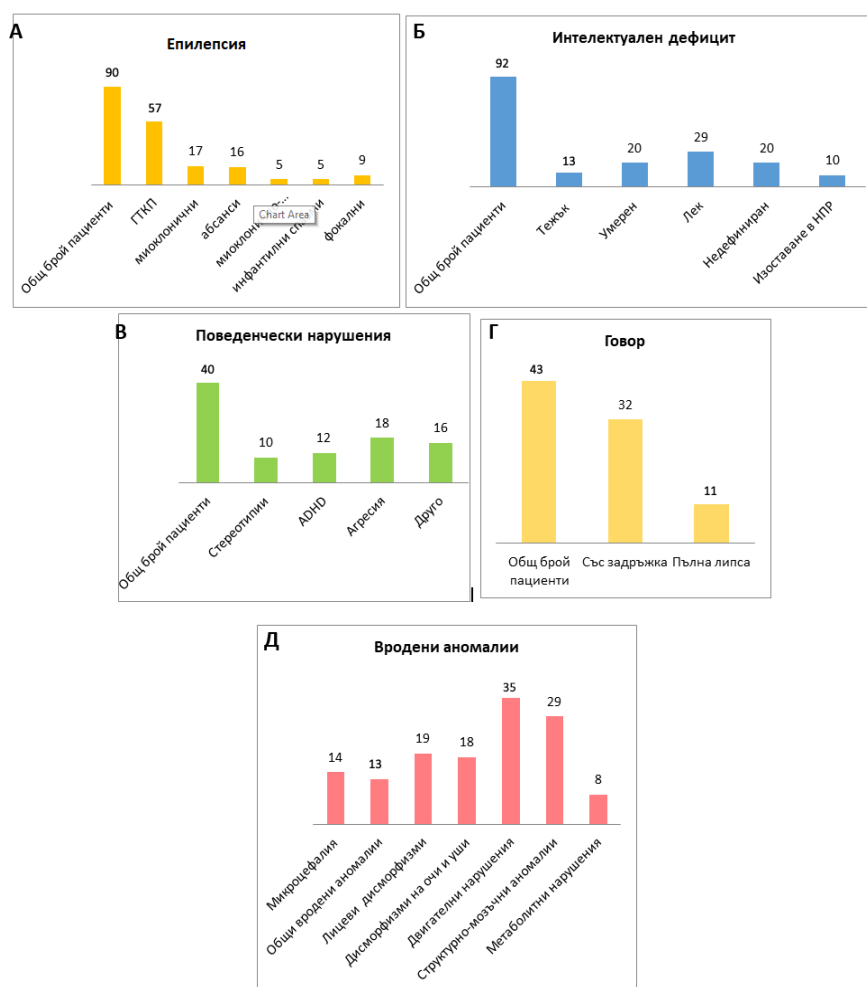
При пациентите с тежки синдромни състояния, при които освен епилепсията се наблюдават и допълнителни синдромни черти, засягащи различни системи, бе проведен микрочипов анализ чрез метода на сравнителна геномна хибридизация - aCGH (array Comparative Genomic Hybridization) за търсене на големи геномни промени в броя копия (Copy Number Variations - CNVs). Тези небалансирани промени представляват загуба (делеции) или придобиване (дупликации) на генетичен материал от хромозомите и могат да засегнат както един, така и множество гени, отговорни за нормалното ембрионално развитие и/или гени, играещи роля в генерирането, предаването на нервния импулс и комуникацията между отделните неврони. Пациентите, при които се наблюдава придобит регрес в НПП след началото на пристъпите бяха изследвани за *SCN1A* точкови мутации и вътрегенни делеции, за да се изключи вероятността за DS. Пациентите с изява на абсансни пристъпи, както и проблеми с моториката и наличие на различен по тежест ИД бяха скринирани за точкови мутации и/или вътрегенни промени в броя копия в *SLC2A1* гена чрез директно секвениране и/или MLPA, за да се изключи възможността за GLUT1 DS или друг електро-клиничен синдром, асоцииран с мутации в този ген. Друга част от пациентите бяха насочени директно за извършване на микрочипов анализ, поради наличието на по-тежък синдромен фенотип (Таблица 23).

Таблица 23. Брой подобрани пациенти и извършени анализи при тях

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

В микрочиповия анализ бяха включени 93 пациенти (50 момчета и 43 момичета) на възраст между една и 22 години. Петдесет и четири от пациентите бяха събрани в рамките на настоящото проучване, а 39 бяха селектирани от ДНК банката на ЦММ, събрани в

предишни години. Те бяха подбрани на базата на два основни критерия: наличието на епилептични пристъпи и интелектуален дефицит с или без наличие на вродени аномалии и поведенчески проблеми. При 47 пациенти (51%) има данни за фамилна обремененост в семейството за епилепсия и/или ИД, а 46 пациенти (49%) представляват спорадични случаи. Почти всички имат разнообразни по тип епилептични пристъпи (97%) и различна степен на ИД (99%), поведенчески проблеми от аутистичния спектър (43%), общи и лицеви дисморфизми (53%), забавена реч или пълната ѝ липса (46%), микроцефалия (15%), двигателни нарушения (38%) и структурно-мозъчни аномалии (31%) (Фигура 36А,Б,В,Г,Д). В изследваната група най-разпространения тип пристъпи е ГТКП (66%), следвани от миоклоничните (20%) и абсансите (18%) (Фигура 36А). Оценката на IQ показва лека форма на ИД при 32% от пациентите, умерен ИД при 22%, тежък ИД при 14%, неопределен по тежест ИД при 21% от пациентите и 11% малки деца на възраст под 2 години с изоставане в НПР (Фигура 36Б).



Фигура 36. Типове клинични фенотипове и разпределението им по брой пациенти, в които се срещат. Забележка: при повечето пациенти се срещат повече от една клинична характеристика от съответната категория.

4.7.2. Молекулярно-генетично изследване

В резултат от микрочиповия анализ чрез метода на aCGH открихме патогенни вариации и такива с неясно клинично значение в 23 от общо 93 пациенти от изследваната група (24.7%). От тях общо 15 патогенни или вероятно патогенни копийни варианти бяха открити в 14 пациенти (15.1%). Осем CNVs са асоциирани с известен микроделеционен или дупликационен синдром, позволяващи да се постави генетичната диагноза при 8.6% от пациентите в настоящото проучване. Вероятно патогенни CNVs, неасоциирани с известен синдром, но от потенциален интерес за бъдещи проучвания бяха намерени при седем пациенти от изследваната група (7.5%) (Таблица 24). Три дупликации бяха класифицирани като такива с неясно клинично значение и вероятно непатогенен ефект (Unknown Clinical Significance – likely benign UCS), а шест аберации – като UCS, неподлежащи на подкласификация (no subclassification UCS), съгласно критериите за класификация на Американския Колеж по Медицинска Генетика (229). Те бяха открити при общо девет пациенти от изследваната група (9.7%) (**Приложение 7**). Сигурно патогенните аберации бяха открити при шест момчета и две момчета, докато вероятно патогенните UCS бяха открити при пет момчета и две момчета (EP405 и EP424). Пациент EP424 носи две делеции – една, засягаща район, свързан с микроделеционен синдром и друга вероятно патогенна UCS (Таблица 25). Част от пациентите бяха скринирани предварително за наличие на патогенни варианти в *SCN1A* гена (n=7; пациенти EP424, EP385, EP539, EP498, EP327, EP381, EP419), в *SLC2A1* гена (n=2; пациенти EP166, EP223), а пет пациенти бяха директно изследвани чрез микрочипов анализ, поради наличието на комплексно синдромно състояние, включващо допълнителни вродени аномалии (n=5; пациенти EP270, EP437, EP324, EP405, EP222). Всички вероятно патогенни UCS не бяха открити в базата-данни DGV, съдържаща CNVs, открити в здрави контролни индивиди от общата популация. Вероятно непатогенните UCS и тези, които не подлежат на подкласифициране бяха намерени при пет момчета и четири момчета от изследваната група.

Впоследствие намерените аберации, представляващи клиничен интерес (сигурно патогенни и вероятно патогенни UCS) бяха потвърдени чрез количествен PCR в реално време. За целта бяха използвани ДНК от здрави контролни индивиди, при които е прието, че са с нормален брой копия в изследваните райони. Техните профили бяха сравнени с профилите на интересувашите ни тестови фрагменти от изследваните пациенти. Там, където съществува дублицирано копие от тестовия фрагмент, се наблюдава достигане на логаритмична фаза на амплификация в по-ранните цикли от qPCR експеримента (например Фигура 44). Там, където наблюдавахме делетирано копие от интересувашия ни фрагмент, достигането на логаритмичната фаза на амплификация става в по-късен цикъл от qPCR експеримента, в сравнение с броя цикли, необходими да натрупване на продукт при контролните индивиди и вътрешните контролни фрагменти (например фигура 38Б). Анализът на получените резултати се извърши с помощта на $\Delta\Delta C_t$ метода на относително количествено определяне (Relative Quantification- RQ стойност).

Таблица 24. Сигурно патогенни и вероятно патогенни геномни пренареждания при 14 пациента, открити чрез aCGH

Пробанд	aCGH резултат (ISCN,2013 (393)) (GRCh37/hg19)	Размер (Mb)	Унаследяване	RefSeq гени	OMIM гени	Оценка на патогенността
166	17q12(34,360,846-36,216,399)x3	1.856	N/A.* засегната сестра носител	33	ACACA, CCL3L3, HNF1B, PIGW	патогенна
424	1p36.33(1,157,375-1,706,192)x0	0.549	N/A	35	B3GALT6, DVL1, ATAD3A, TMEM240	патогенна
	16p13.3(571,779-798,340)x1	0.227	N/A	28	STUB1, CCDC78	вероятно патогенна
539	2q24.3q31.1(164,807,751-170,315,525)x1	5.51	de novo	30	GALNT3, TTC21B, SCN1A, SCN9A, ABCB11, LRP2, SCN2A	патогенна
437	2q24.1q24.3(159,156,845-167,711,717)x1	8.555	N/A	55	ITGB6, IFIH1, SCN2A, GALNT3, TTC21B, SCN1A, SCN9A	патогенна
270	1p34.2(43,251,879-43,416,139)x1	0.165	de novo	6	ERMAP, SLC2A1	патогенна
324	6q26(162,707,603-163,050,403)x3	0.343	de novo	1	PARK2	патогенна
385	7p22.3(83,325-1,008,710)x1	0.925	N/A	12	FAM20C HEATR2	патогенна
498	7q31.1(111,194,597-111,333,959)x1	0.139	N/A	IMMP2L	-	патогенна
405	15q13.3(32,016,364-32,514,980)x3	0.499	N/A; засегнат брат носител	2	CHRNA7 OTUD7A	вероятно патогенна
223	9q33.1(119,303,085-119,990,036)x3	0.687	N/A	5	TRIM32, ASTN2	вероятно патогенна
327	6p25.1(5,259,570-5,359,994)x0	0.100	унаследена от майка	2	LYRM4; FARS2	вероятно патогенна
222	10q21.3(68,181,834-68,292,471)x1	0.111	N/A	1	CTNNA3	вероятно патогенна

381	15q13.1(29,096,386-29,498,094)x3	0.402	унаследена от майка; баба хетерозиготен носител	1	APBA2	вероятно патогенна
409	15q22.31(64,242,830-65,570,262)x1	1.32	N/A	25	PPIB, ACP33, MTFMT, KBTBD13, CILP, CSNK1G1	вероятно патогенна

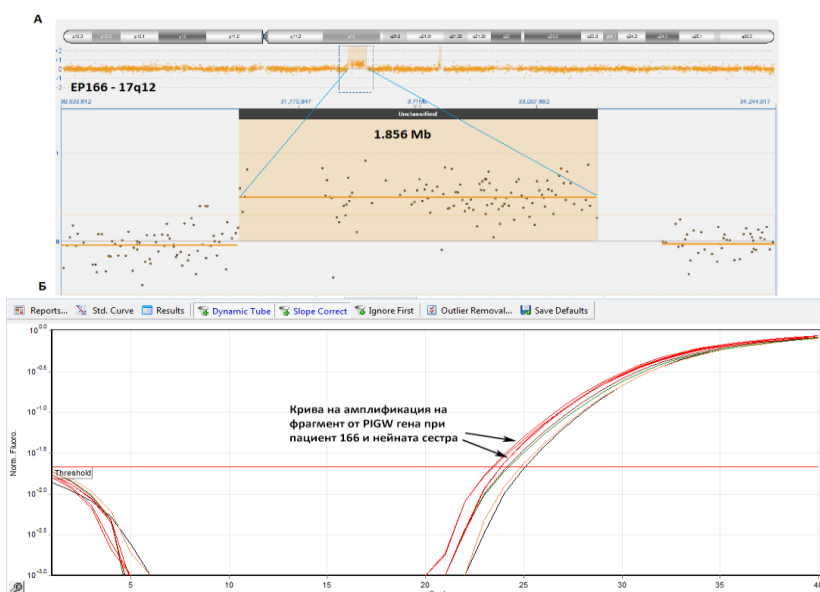
*не е проведен сегрегационен анализ при родителите, поради липса на материал от тях

4.7.2.1. Патогенни хромозомни микроаберации

• Пациент EP166

Момиче на 10 години с изява на епилептични пристъпи, лек ИД, задръжка в развитието на речта и поведенчески проблеми. В резултат от aCGH анализа открихме 1.856 Мб дупликация в 17q12 региона (Таблица 24, пациент 166; Фигура 37А): arr[hg19]17q12(34,360,846-36,216,399)x3. Детето е с лека степен на ИД и абсансни ГТКП, умерени по тежест паметови затруднения, личностови нарушения – нервна, неспокойна, нетърпелива, раздразнителна, агресивна. Вниманието е неустойчиво, с недостатъчна концентрация и превключваемост, наблюдават се стереотипии. Предварително проведенят секвенционен анализ не доведе до откритие на патогенен точков вариант в *SLC2A1* гена.

Потвърдителният qPCR показва, че дупликацията присъства и при засегнатата сестра, също с абсансна епилепсия (Фигура 37Б). Съществува фамилност за заболяването в семейството - освен двете сестри с епилепсия, тяхното братче има ИД, но той, както и родителите, не предоставиха материал за провеждане на сегрегационен анализ.



Фигура 37. А. Геномен профил на район 17q12 при пациент EP166, анализиран чрез Cytosure Interpret Software (OGT). **Б.** Криви на амплификация чрез qPCR анализ на тестов фрагмент от *PIGW* гена, част от 17q12 региона и контролен фрагмент от *GNA12* гена при пациент 166 и нейната сестра сравнени с профилите на контролни здрави индивиди.

- **Пациент EP424**

Момиче на шест години с диагноза криптогенна парциална епилепсия и леко нарушение в НПР. Секвенирането на *SCN1A* гена не доведе до откритие на патогенен вариант. Проведеният aCGH анализ показва наличие на 549 Кб хомозиготна делеция в 1p36.33 района (Фигура 38А; Таблица 24, пациент 424): arr[hg19]1p36.33(1,157,375-1,706,192)x0. В допълнение, при EP424 установихме 227 Кб хетерозиготна делеция в район 16p13.3 с вероятно патогенен ефект: arr[hg19] 16p13.3(571,779-798,340)x1 (Фигура 38Б). Двете делеции бяха потвърдени чрез qPCR анализ (Фигура 38В). Пациентката е адаптирана, поради което не бе възможно провеждане на сегрегационен анализ при родителите.

Епилептичните пристъпи се появяват на 26- дневна възраст на фона на респираторна инфекция, провокирани от висока температура. В последствие, между 6-месечна и 4- годишна възраст се проявяват при заспиване и събуждане шест гърча без фебрилна провокация с наличие на цианоза и апнея. Всички пристъпи са с продължителност от около една минута. Пациентката има леко изоставане в НПР, локомоторна статична атаксия със залитане във всички посоки, лека спастичност в стъпалата двустранно, както и поведенчески проблеми: хиперактивно поведение, полуразбираема реч, говори за себе си в трето лице.

- **Пациенти EP437 и EP539**

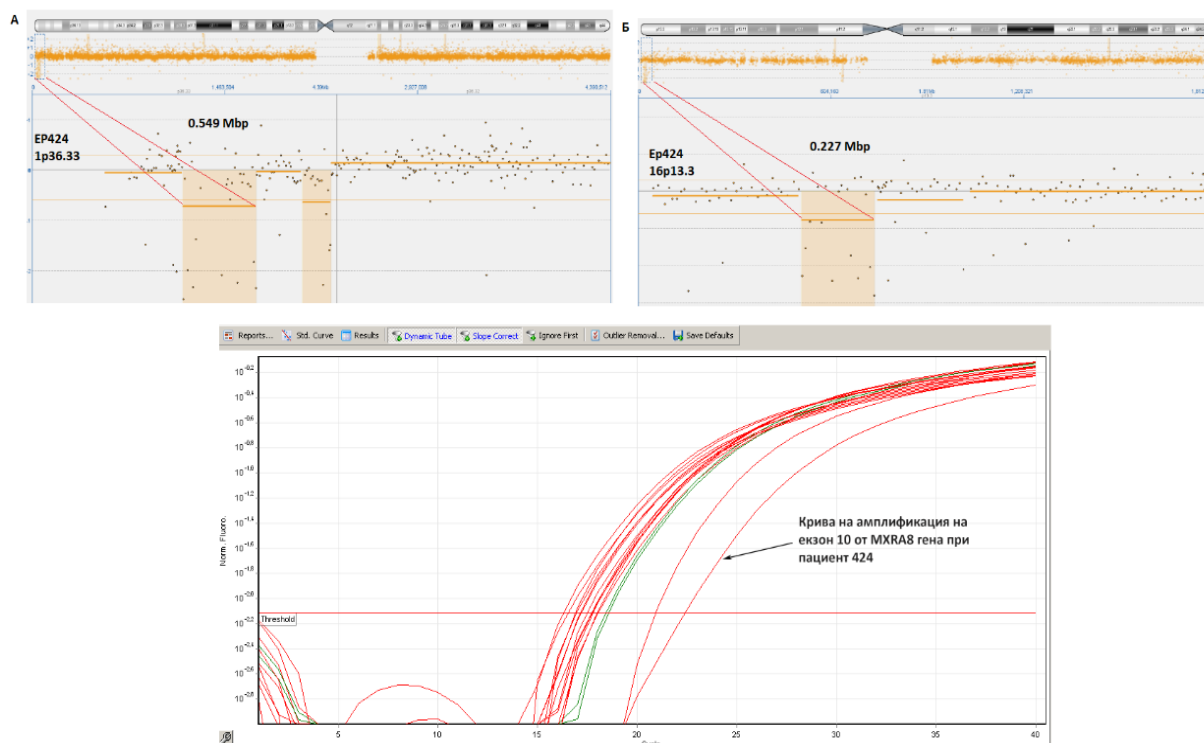
При пациенти EP437 и EP539 чрез aCGH бяха открити делеции, засягащи райони 2q24.1q24.3 и 2q24.3q31.1, разположени върху дългото рамо на хромозома 2 с размери 8.55 Мб и 5.51 Мб съответно: arr[hg19]2q24.1q24.3(159,156,845-167,711,717)x1 (Таблица 24, пациент EP437; Фигура 39А) и arr[hg19]2q24.3q31.1(164,807,751-170,315,525)x1 (Таблица 24, пациент EP539; Фигура 39Б). Впоследствие и двете делеции бяха потвърдени чрез количествен PCR в реално време (Фигура 39В).

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

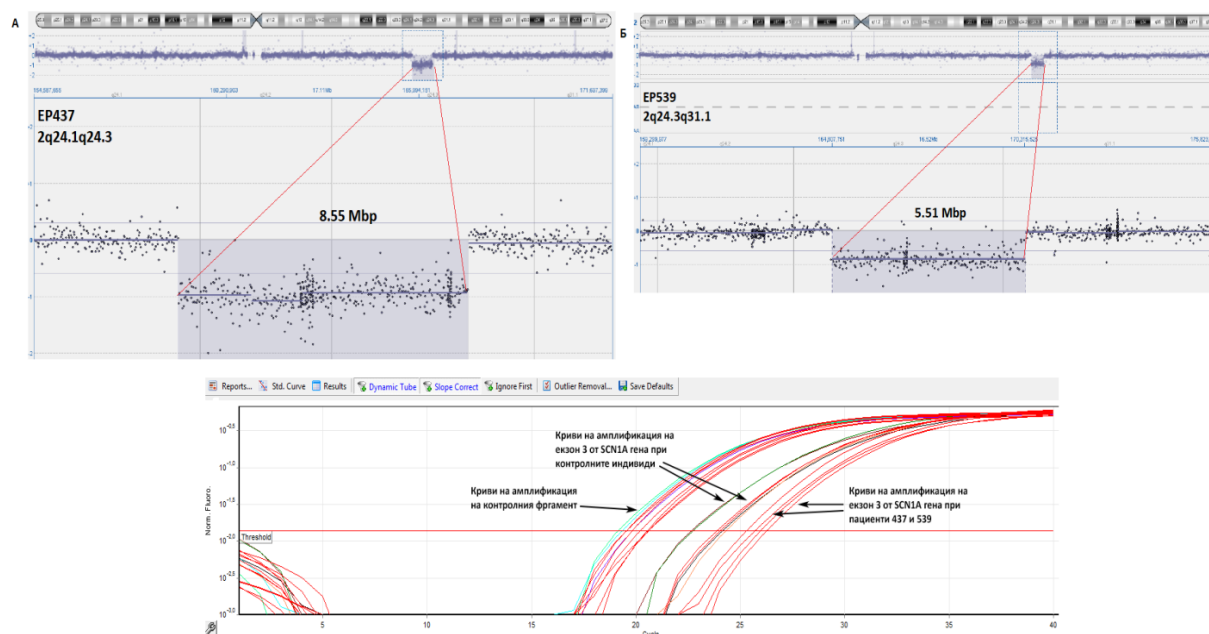
Пациент EP539 е момиче на две години с медикаментозно-резистентна епилепсия, съмнение за епилептична енцефалопатия и леко изоставане в НПР. Проведеният ЯМР разкрива изтъняване на корпус калозум във всичките си отдели, разширени субарахноидни пространства, данни за незавършена миелинизация, както и атрофични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

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

Първоначално изследвахме пациентката в ЦММ за точкови мутации в *SCN1A* гена в рамките на проект Грант: ДТК09/2009, като резултата бе отрицателен. Поради леко повишените нива на лактат е изказано съмнение за метаболитно заболяване, като проведените метаболитни изследвания в друга лаборатория също са отрицателни. Една от диференциалните диагнози е пиридоксин-зависима епилепсия, поради което е проведен молекулярно-генетичен анализ на *ALDH7A1* гена, който не води до откриване на патогенен вариант. Впоследствие се провежда таргетно екзомно секвениране в чуждестранна лаборатория за търсене на точкови мутации и/или малки инсерции и делеции в 97 гена, свързани с различни форми на ранна детска епилептична енцефалопатия (ЕИЕЕ), което също е отрицателно. Родителите се свързаха с ЦММ за втори път, при което ние извършихме микрочипов анализ, който разкри наличието на хетерозиготна делеция в район 2q24.3q31.1, засягащ SCN- генния клъстер (Фигура 39Б).



Фигура 38. Геномен профил на хромозоми 1 и 16 при пациент EP424, анализирани чрез Cytosure Interpret Software (OGT). **А.** Делеция в хромозомен район 1p36.33. **Б.** Делеция в хромозомен район 16p13.3. **В.** Криви на амплификация чрез qPCR анализ на тестов фрагмент от *MXRA8* гена, част от 1p36.33 региона и контролен фрагмент от *GNA12* гена при пациент 424 и при контролните индивиди.



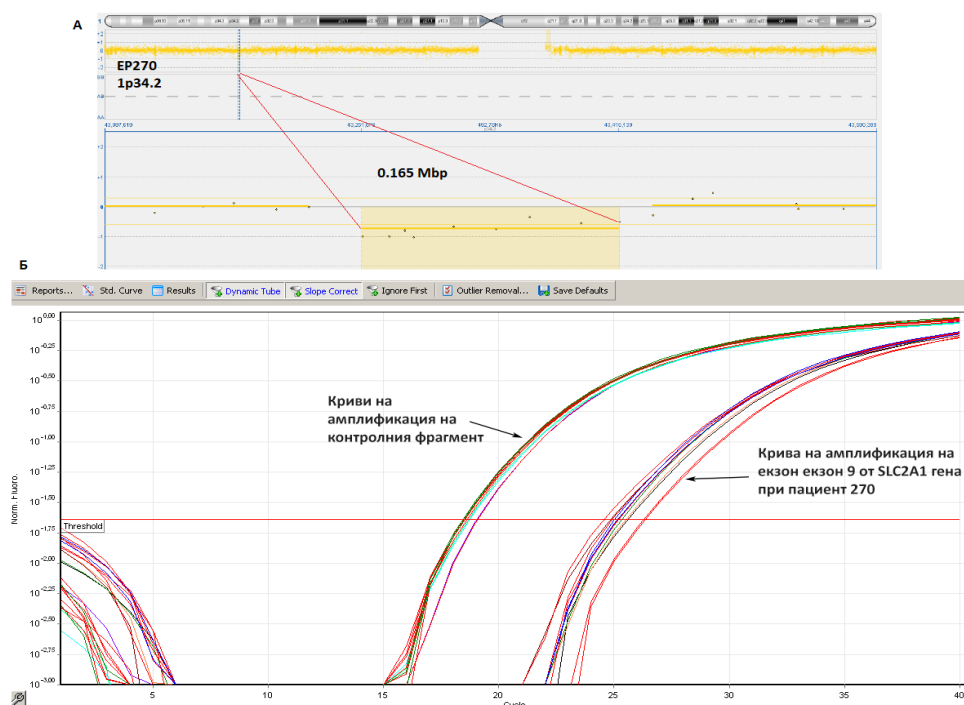
Фигура 39. Геномен профил на райони 2q24.1q24.3 и 2q24.3q31.1 при пациенти EP437 и EP539, анализирани чрез Cytosure Interpret Software (OGT). **А.** Делеция в 2q24.1q24.3 при EP437. **Б.** Делеция в 2q24.3q31.1 при EP539. **В.** Криви на амплификация чрез qPCR анализ на тестов фрагмент от *SCN1A* гена, част от 2q24 региона и контролния фрагмент от *GNA12* гена при пациенти 437 и 539, както и при контролните индивиди.

• Пациент EP270

Чрез aCGH беше намерена и микроделеция в 1p34.2 с размер 165 Кб, засягаща *SLC2A1* гена (Таблица 24, пациент 270; Фигура 40А): arr[hg19]1p34.2(43,251,879-43,416,139)x1. Делецията беше намерена при момче на 13- годишна възраст със диагноза метаболитна енцефалопатия, вродена катаракта и изказано съмнение за нарушен глюкозен толеранс при нормални нива на глюкоза в плазма. Пациентът е роден от втора патологично протекла бременност (контракции, вирусни инфекции на майката) с вродена катаракта и микрофталмия, впоследствие коригирани хирургично. Налична е фамилна обремененост за доброкачествена хематурия. На 5- месечна възраст се появяват абсансни ГТКП, впоследствие и миоклонични, и миоклонично-астатични пристъпи. Наблюдава се постепенен регрес в НПР. Пациент EP270 показва нарушена походка, атаксия, конвергентен страбизъм, гинекомастия. Морфологично се наблюдава асиметричен гръден кош с изпъкване на дясната гръдна половина, както и хиперпигментиран участък на гърба с размер 3 см. Проведеният ЯМР показва наличие на двустранна темпорална дисплазия. В допълнение, пациентът има данни за затлъстяване, хиперхолестеролемия и горно-гранични нива на лактат.

Една от суспектните диагнози е митохондриална енцефалопатия, като проведените изследвания не водят до откриване на патогенни точкови мутации или

делеции/дупликации в митохондриалната ДНК. В допълнение, изказано е съмнение за GLUT1 DS, с оглед на отчасти припокриващите се характеристики с класическата форма на синдрома, но не е проведено изследване на цереброспинална течност за наличие на хипогликорахия. Ние извършихме секвенционен анализ на *SLC2A1* гена като не открихме патогенни точкови варианти в него. Поради допълнителните синдромни характеристики, наблюдаващи се при EP270 (асиметричен гръден кош, очни и структурно-мозъчни аномалии) и нехарактерни за GLUT1 DS, ние предположихме, че става въпрос за микроделеционен/дупликационен синдром и проведохме микрочипова aCGH. Последващият потвърдителен qPCR показва, че делецията е в хетерозиготно състояние и е възникнала *de novo* (Фигура 40Б).

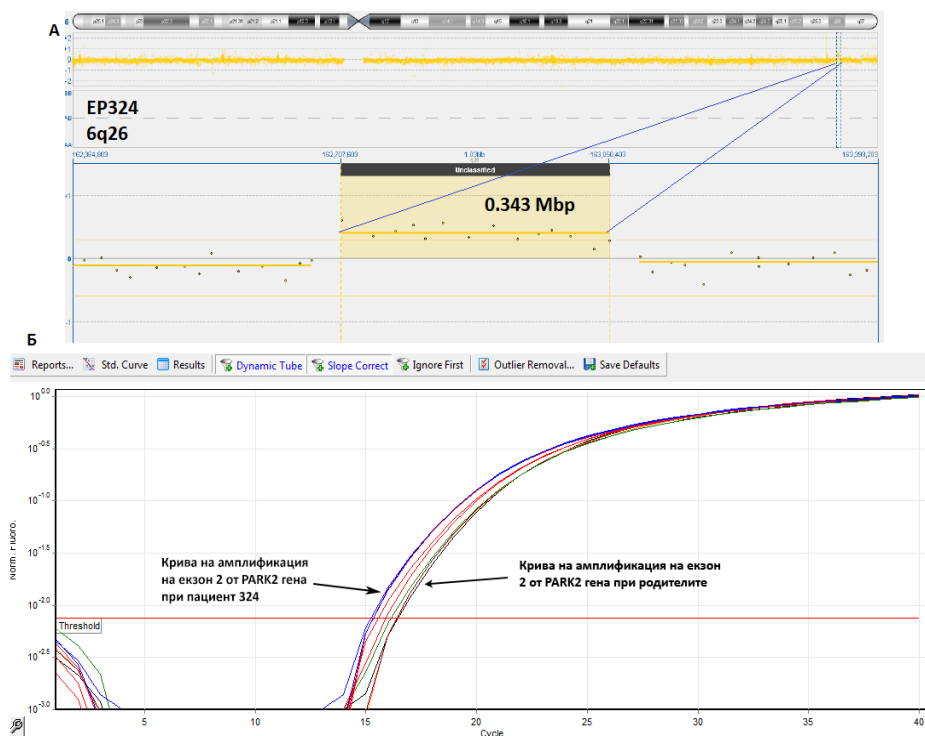


Фигура 40. А. Геномен профил на район 1p34.2 при пациент EP270, анализиран чрез Cytosure Interpret Software (OGT). Б. Криви на амплификация чрез qPCR анализ на тестов фрагмент от *SLC2A1* гена, част от 1p34.2 региона и контролния фрагмент от *GNA12* гена при пациент 270 и неговите родители.

• Пациент EP324

При пациент EP324, 17- годишно момче с данни за фамилна обремененост за епилепсия открихме 343 Кб инtragenна дупликация в 6q26 региона, засягащ екзон 2 от *PARK2* гена (Таблица 24, пациент EP324; Фигура 41А): arr[hg19]6q26(162,707,603-163,050,403)x3. Пациентът е имал разнообразни по тип епилептични пристъпи: рефрактерни ГТКП, абсанси, миоклонични, миоклонично-астатични. Има тежък ИД и пълна липса на говор. В допълнение, показва аутистични черти, както и моторни стереотипии, слаб мускулен тонус, има краниофациален дисморфизъм и предна капилярна

ангиоматоза. Сегрегационният анализ чрез qPCR разкри, че дупликацията не присъства при родителите (Фигура 41Б).



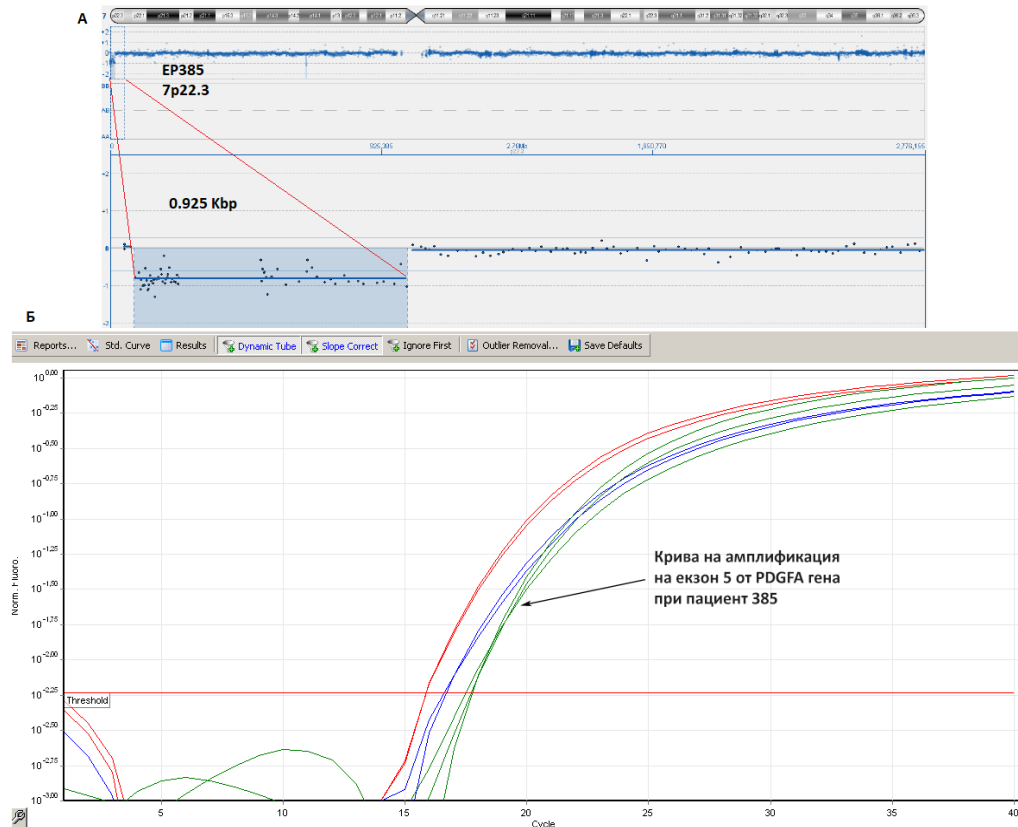
Фигура 41. А. Геномен профил на район 6q26 при пациент EP324, анализиран чрез Cytosure Interpret Software (OGT). **Б.** Криви на амплификация чрез qPCR анализ на тестов фрагмент от *PARK2* гена, част от 6q26 региона и контролния фрагмент от *GNA12* гена при пациент 324, неговите родители и контролните индивиди.

• Пациент EP385

Чрез метода на aCGH открихме хетерозиготна делеция в терминалната част на 7p22.3 района с размер 925 Кб, засягаща 9 OMIM гена (Таблица 24, пациент 285; Фигура 42А): arr[hg19]7p22.3(83,325-1,008,710)x1. Делецията бе намерена при 5-годишно момиче без фамилна история за епилептичен синдром, родена с асфиксия от първа патологично протекла бременност с кървене, гестационен диабет и тиреоидит на Хашимото.

През първата година се наблюдават краткотрайни пристъпи с тонично-клоничен характер и отклоняване на погледа настрани и нагоре, както и миоклонии. След началото им, детето е изоставало в НПР, като в момента не ходи самостоятелно. Проявява хиперактивно поведение, автоагресия и не говори. Има намален мускулен тонус. Компютърната томография (КТ) на главен мозък показва умерена корова атрофия фронто-темпоро-париетално, дясно и фронтално кортикална дисплазия, изменения, наподобяващи мезиална склероза, разширени задни рога на страничните вентрикули, както и слабо увеличен обем на дясна cella media.

Поради изявата на ГТКП в комбинация с постепен регрес в НПР, първоначално ние проведохме анализ на *SCN1A* гена, който не доведе до откритие на патогенни точкови варианти. След проведения като втора стъпка микрочипов анализ, намерената микроделекция беше потвърдена чрез PCR в реално време (Фигура 42Б). Родителите не бяха на разположение за провеждане на сегрегационен анализ.

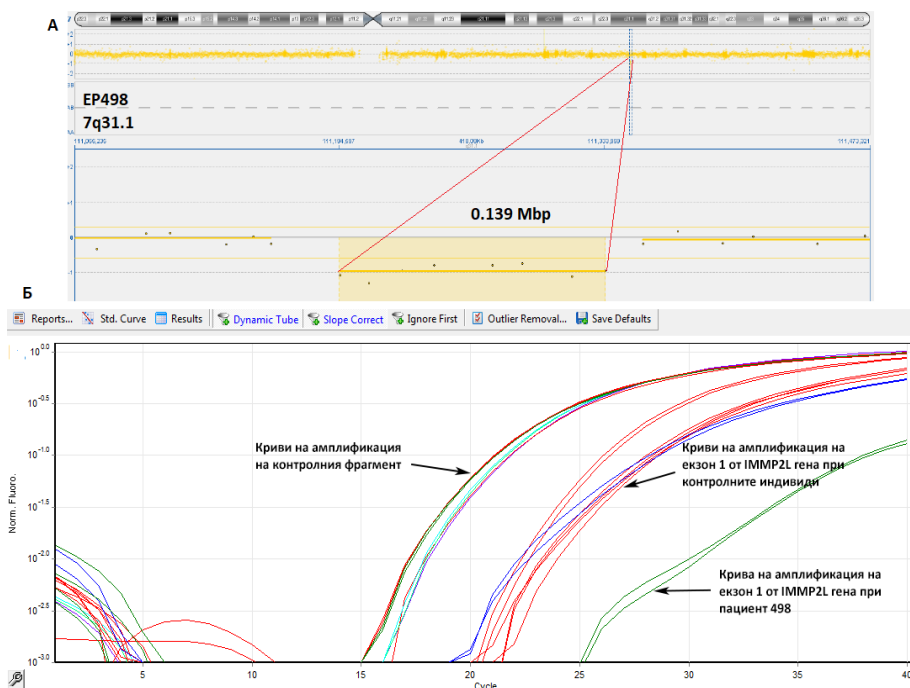


Фигура 42. А. Геномен профил на район 7p22.3 при пациент EP385, анализиран чрез Cytosure Interpret Software (OGT). Б. Криви на амплификация чрез qPCR анализ на тестов фрагмент от *PDGFA* гена, част от 7p22.3 региона и контролния фрагмент от *GNA12* гена при пациент 385 и контролните индивиди.

• Пациент EP498

При момиче на четири години беше открита 139 Кб хомозиготна делеция в район 7q31.1, засягаща първите два екзона на *IMMP2L* гена (Таблица 24, пациент 498; Фигура 43А): $\text{arr[hg19]7q31.1(111,194,597-111,333,959) \times 0}$. Пациентката е от трета нормално протекла бременност с нормално НПР до третия месец, след което получава пристъпи с характеристика на тонично-клонични, а впоследствие и инфантилни спазми с терапевтична резистентност. Първоначалният секвенционен анализ на *SCN1A* гена не доведе до откриване на патогенни точкови варианти. Проведеният ЯМР показва лека фронтална корова атрофия, като скоро след това бива отчетен и регрес в НПР.

Пациентката е с микроцефална конфигурация на главата, лицеви дисморфизми, стереотипии и поведенчески проблеми (агресия и автоагресия, ADHD), задръжка в развитието на речта и намален мускулен тонус, атаксия. Липсва фамилна обремененост. Проведеният потвърдителен qPCR показва, че делецията е в хомозиготно състояние (Фигура 43Б).



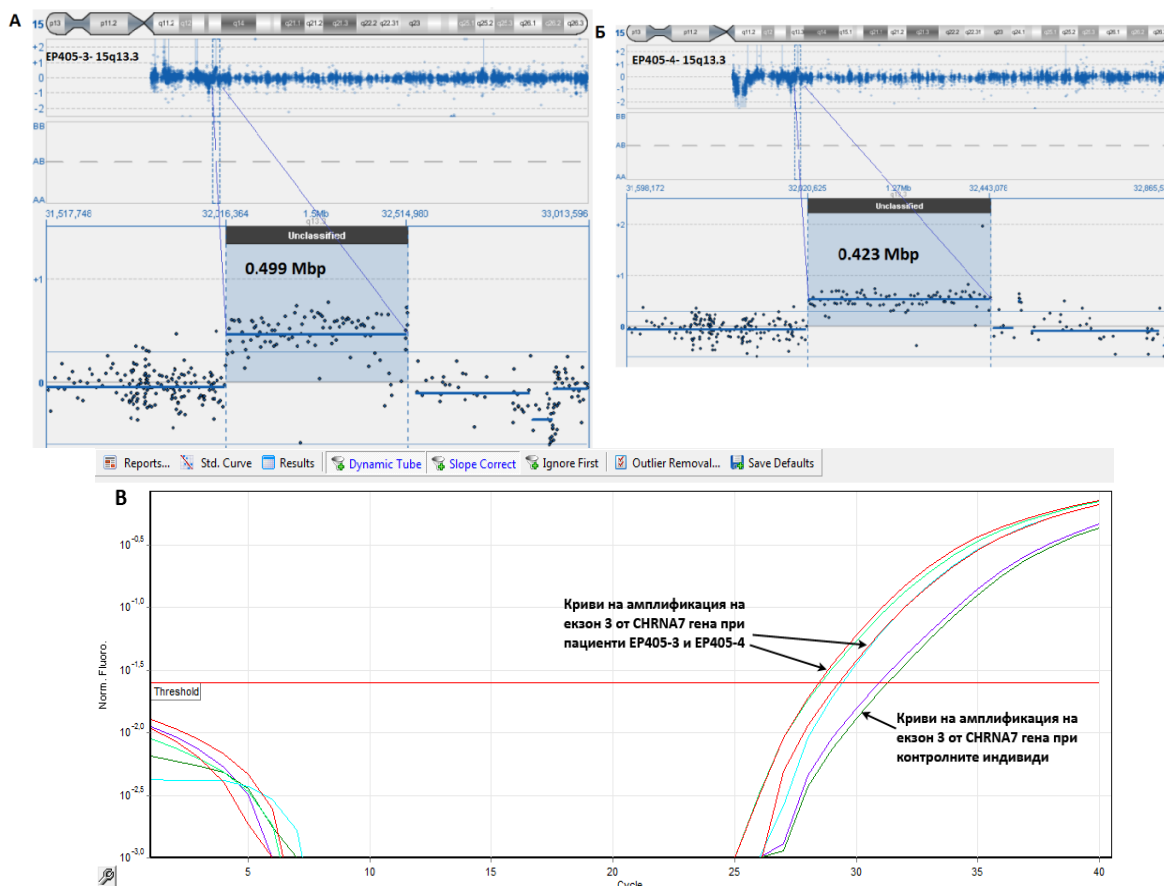
Фигура 43. А. Геномен профил на район 7q31.1 при пациент EP498, анализиран чрез Cytosure Interpret Software (OGT). Б. Криви на амплификация чрез qPCR анализ на тестов фрагмент от *IMMP2L* гена, част от 7q31.1 региона и контролния фрагмент от *GNA12* гена при пациент 498 и контролните индивиди.

4.7.2.2. Аберации с неясно клинично значение и вероятно патогенен ефект

• Пациент EP405

Момиче на 12 години с изява на епилептичен синдром и изоставане в НПР. Микрочиповият анализ идентифицира 499 Кб дупликация в 15q13.3 района, засягаща целия *CHRNA7* ген (OMIM: 118511): arr[hg19]15q13.3(32,016,364-32,514,980)x3 (Таблица 24, пациент 405; Фигура 44А). Пациент EP405 е с изоставане в НПР, забелязано след възраст от шест месеца. Не посягала към играчки, към момента не седи, не ходи, не е имала говор. От 2-годишна възраст започнали ГТКП с примигване на очите и автоматизми. Допълнително се наблюдават високо небце, изразена хипермобилност на ставите, генерализирана мускулна хипотония, поради която е невъзможен самостоятелен стоеж. Дупликацията беше открита и при по-големия брат на 17 години, показващ сходни

клинични характеристики: изоставане в НПР, епилептичен синдром, липса на реч, без развита походка, високо небце, изразена хипермобилност на ставите, генерализирана хипотония, ротиран гръден кош, долихоцефалия. За разлика от EP405, при него дупликацията е с по-малък размер (423 Кб) и засяга първите четири екзона от *CHNRA7* гена (Фигура 44Б). Дупликацията беше потвърдена с qPCR и при двамата сиблинги (Фигура 44В).

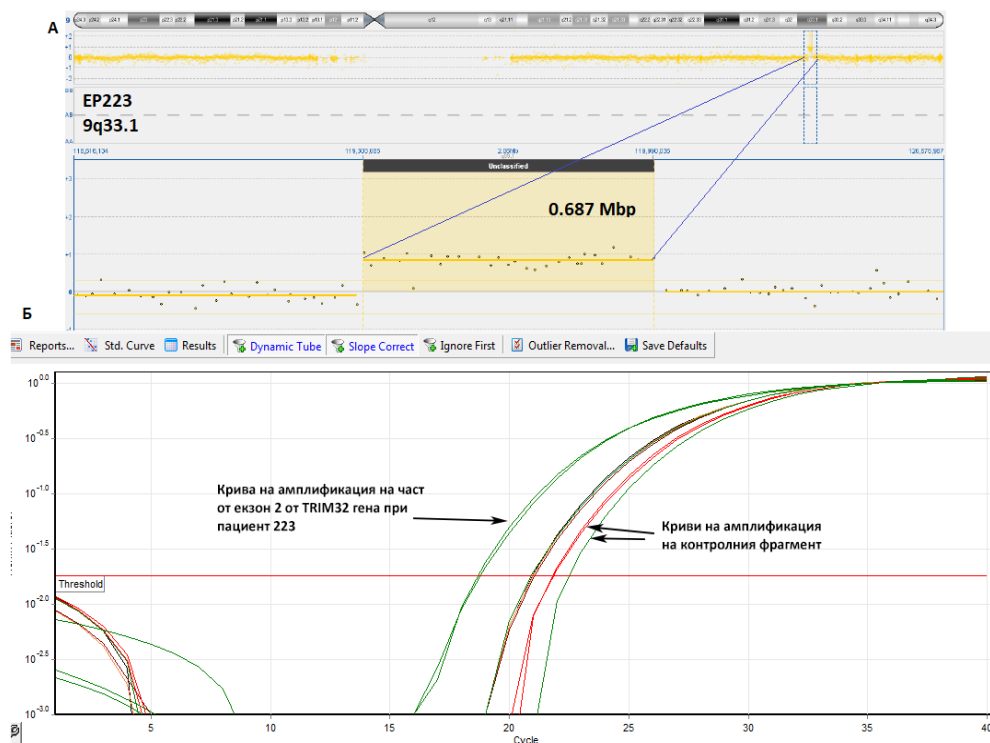


Фигура 44. Геномен профил на район 15q13.3 при **А.** пациент EP405-3 и **Б.** нейния брат, анализирани чрез Cytosure Interpret Software (OGT); **В.** Криви на амплификация чрез qPCR анализ на тестов фрагмент от *CHNRA7* гена, част от 15q13.3 района при пациент 498 и контролните индивиди.

• Пациент EP223

При пациент EP223 чрез aCGH открихме 687 Кб дупликация в 9q33.1 района (Таблица 24, пациент EP223; Фигура 45А), засягаща част от гена *ASTN2* и целия *TRIM32* ген: arr[hg19] 9q33.1(119,303,085-119,990,036)x3. Пациент EP223 е момче на 14 години с диагноза ИГЕ/ГГЕ и епилептични синдроми, с фамилна анамнеза за епилепсия при баща и баба по бащина линия. В анамнестичен план се наблюдават три ГТКП и вероятно абсансни пристъпи в рамките на три месеца, след което започва да наддава на тегло, като към

днешна дата е с избыток - телесно тегло 75 кг. Соматичният статус включва по-големи ниско разположени ушни миди, хиперпигментация вляво на гърба и мекотъканна формация на бедрото вдясно. В неврологичен аспект детето показва лека форма на ИД. Предвид наднорменото тегло и ИД проведехме секвенционен анализ на *SLC2A1* гена, който не показва наличие на патогенни точкови варианти. Дупликацията беше потвърдена чрез qPCR (Фигура 45Б), но не разполагахме с материал от родителите за извършване на сегрегационен анализ.

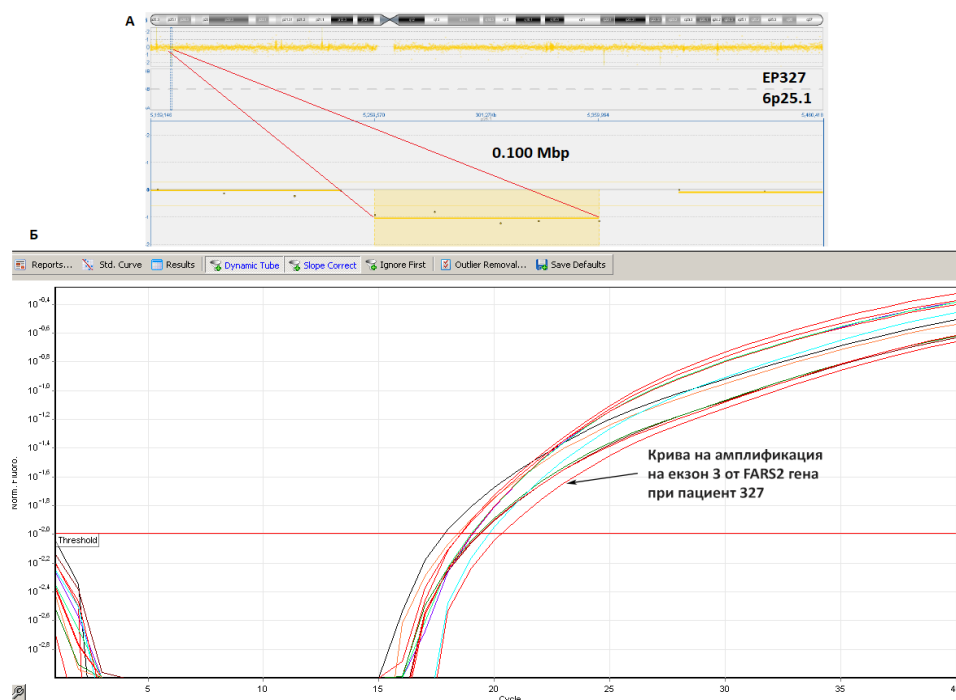


Фигура 45. А. Геномен профил на район 9q33.1 при пациент EP223, анализиран чрез Cytosure Interpret Software (OGT). **Б.** Криви на амплификация чрез qPCR анализ на тестов фрагмент от *TRIM32* гена, част от 9q33.1 региона и контролния фрагмент от *GNA12* гена при пациент 223 и контролните индивиди.

• Пациент EP327

Девет годишно момче с диагноза миоклонично-астатични пристъпи и ГТКП с терапевтична резистентност, заедно със смесена форма на детска церебрална парализа и тежък ИД. Епилептичните пристъпи започват на 6- месечна възраст, провокирани от висока температура на фона на многократни респираторни инфекции. След преболедуване от морбили на пет години, пристъпите зачестили, детето спряло да ходи самостоятелно и пристъпвало несигурно, водено за ръка, преустановило изговарянето на няколкото думи, които казвало самостоятелно дотогава. Предвид регреса в интелектуалното развитие беше проведен анализ на *SCN1A* гена при съмнение за DS, но не бяха открити патогенни точкови мутации или вътрегенни делеции/дупликации.

Пациентът показва агресивно поведение след всеки пристъп и не говори. Интелектуалното функциониране е в границите на тежкото изоставане (IQ<30), той е необучаем. В неврологично отношение е с невъзможна самостоятелна, атактична походка, прави впечатление за апраксия. Наблюдават се и микроцефална конфигурация на главата, както и хипертрихоза. КТ данните показват леко разширени субарахноидни пространства. Чрез микрочипов анализ беше открита 100 Kb делеция в район 6p25.1, засягаща *FARS2* гена, унаследен от здравата майка (Таблица 24, пациент EP327; Фигура 46А): arr[hg19]6p25.1(5,259,570-5,359,994)x1. Проведеният потвърдителен qPCR анализ показва, че делецията е в хетерозиготно състояние (Фигура 46Б).

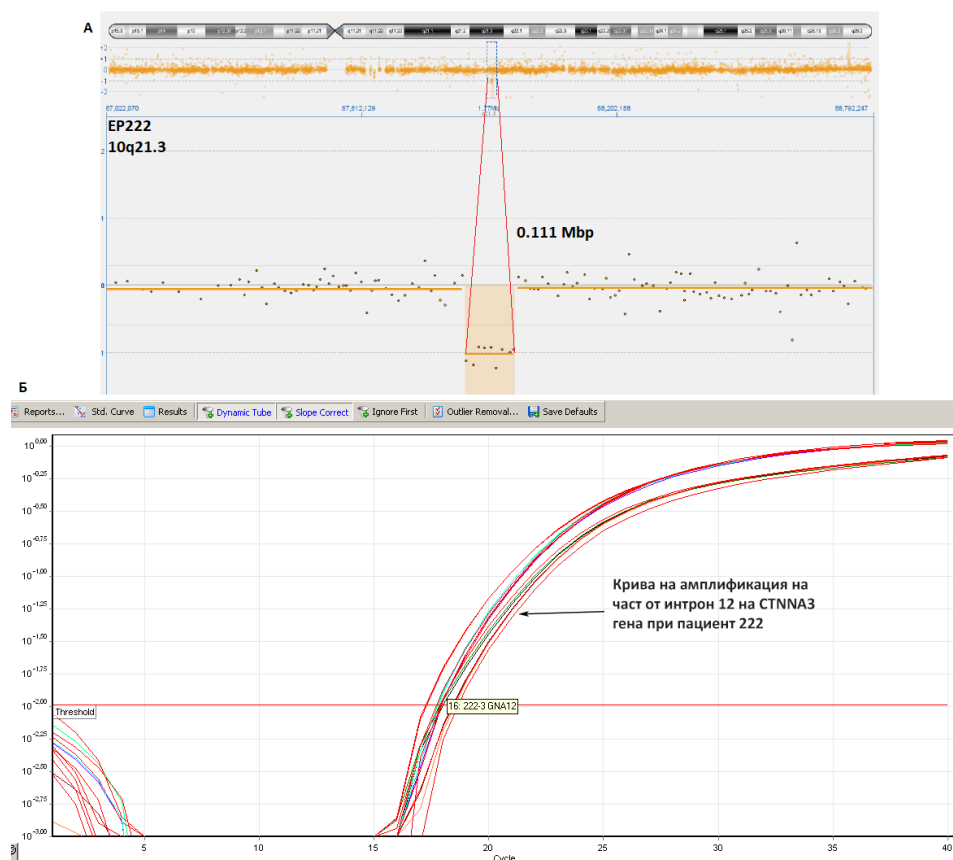


Фигура 46. А. Геномен профил на район 6p25.1 при пациент EP327, анализиран чрез Cytosure Interpret Software (OGT). Б. Криви на амплификация чрез qPCR анализ на тестов фрагмент от *FARS2* гена, част от 6p25.1 региона и контролния фрагмент от *GNA12* гена при пациент EP327 и контролните индивиди.

• Пациент EP222

При момче на 12 години с диагноза редки ГТКП и умерен към тежък ИД беше открита хетерозиготна делеция, засягаща екзон 11 от *CTNNA3* гена, разположен в хромозомен район 10q21.3 (Таблица 24, пациент EP222; Фигура 47А): arr[hg19]10q21.3(68,181,834- 68,292,471)x1. Пациентът е роден от патологично протекла бременност с асфиксия и непосредствено след това развил респираторна инфекция. Изоставал в НПР, като към момента има диагностицирана умерена степен на ИД. Говор липсва, наблюдава се анартрия (чуват се само отделни звуци). Показва и агресивно поведение, стереотипни

движения, има страхови изживявания. Съществува фамилна история за епилепсия: майка и по-малък брат с единичен FS на около 1-годишна възраст. Предвид фамилната обремененост, лекия ИД и началната форма на корова атрофия на майката, е необходимо изследване за унаследяване на *CTNNA3* делецията при нея и по-малкия брат след предоставяне на биологичен материал от тях.

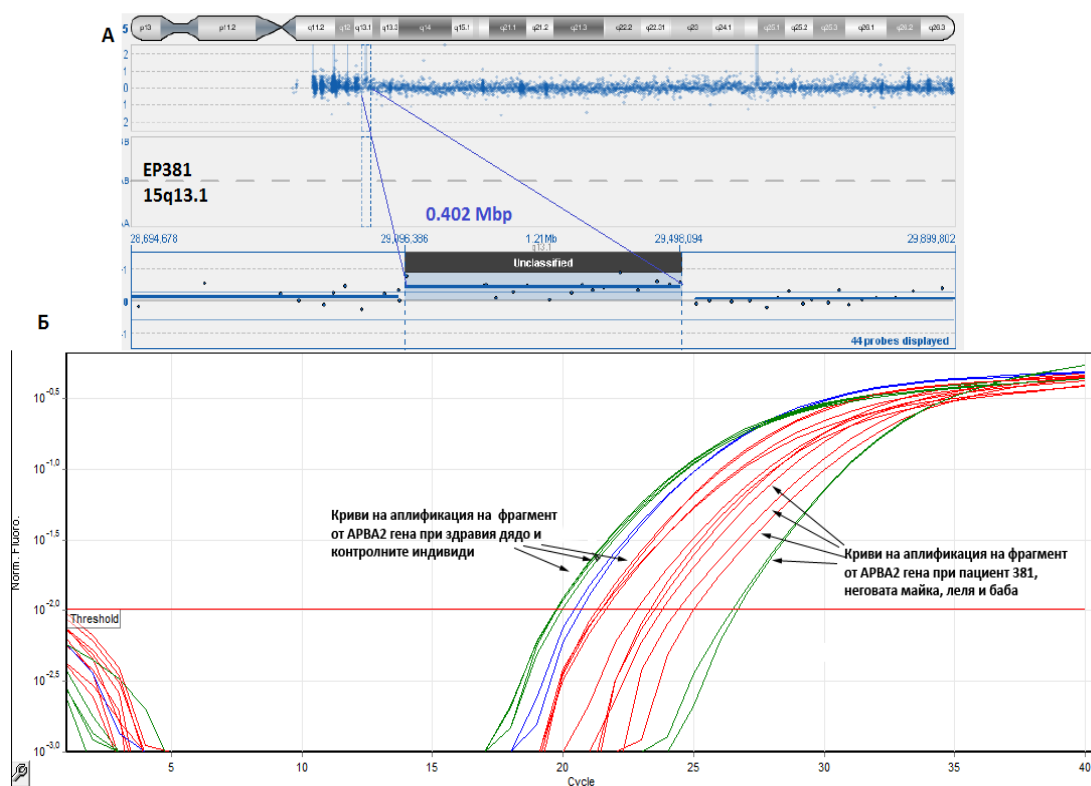


Фигура 47. А. Геномен профил на район 10q21.3 при пациент EP222, анализиран чрез Cytosure Interpret Software (OGT). **Б.** Криви на амплификация чрез qPCR анализ на тестов фрагмент от *CTNNA3* гена, част от 10q21.3 региона и контролния фрагмент от *GNA12* гена при пациент 222 и контролните индивиди.

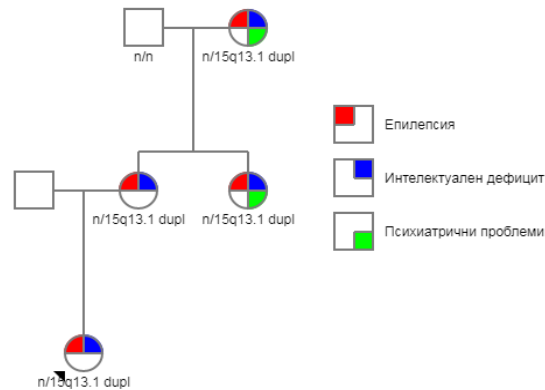
• Пациент EP381

Момче на 7-годишна възраст от турски произход и диагноза ИГЕ/ГГЕ. До 7-месечна възраст е бил в дом за деца, лишени от родителска грижа и поради този факт няма информация за този период. На три години има изява на два последователни ГТКП по време на сън. Детето е с изоставане в НПР от раждането и в момента има тежък ИД, както и липсва говор. Соматичният статус включва микроцефалия, къс филтрум, а в неврологично отношение: понижен мускулен тонус.

Детето е родено от първа бременност на майката, която е с епилепсия и е приемала антиконвулсант по време на бременността (карбамазепин). В този смисъл, съществува фамилна обремененост по майчина линия с АД унаследяване: освен епилепсията, майката има лек ИД; сестра на майката и баба по майчина линия с епилепсия в юношеска възраст и различен по тежест ИД с вероятни психични отклонения. Секвенционният анализ на *SCN1A* гена не доведе до идентифицирането на патогенен вариант. Затова проведохме микрочипов анализ, чрез който открихме 402 Кб дупликация 15q13.1 региона, засягащ изцяло ген *ARBA2* (Таблица 24, пациент EP381; Фигура 48А): arr[hg19]15q13.1(29,096,386-29,498,094)x3. Проведеният qPCR анализ впоследствие показва, че дупликацията сегрегира с клиничния фенотип в семейството: открива се при всички засегнати членове на семейството (майка, леля, баба) и липсва при клинично - здравия дядо (Фигури 49Б, 51).



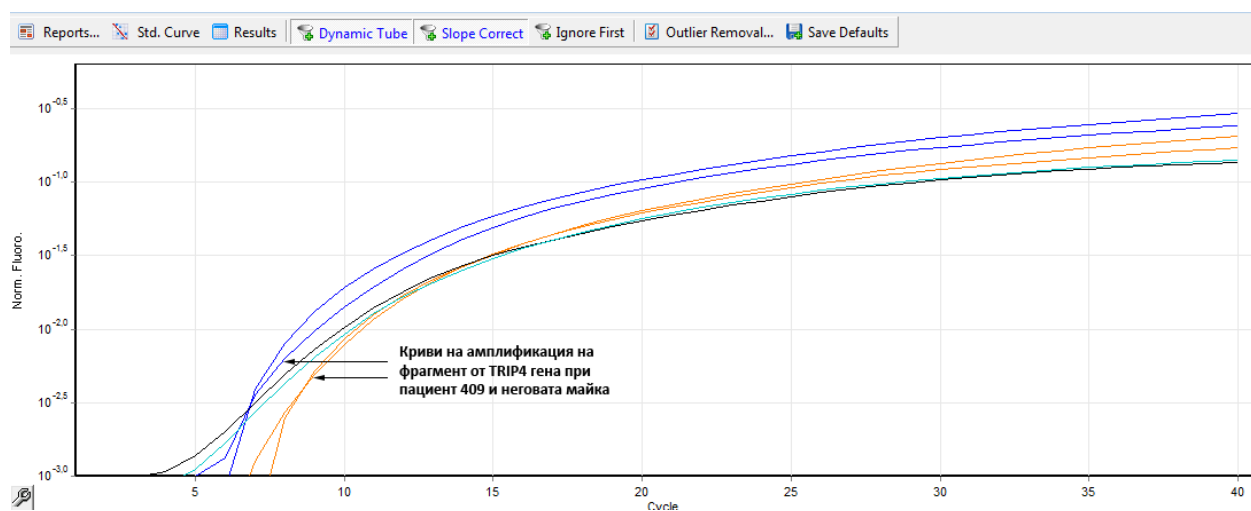
Фигура 48. А. Геномен профил на район 15q13.1 при пациент EP381, анализиран чрез Cytosure Interpret Software (OGT). **Б.** Криви на амплификация чрез qPCR анализ на тестов фрагмент от *ARBA2* гена, част от 15q13.1 региона и контролния фрагмент от *GNA12* гена при пациент 381, неговите родственици и контролните индивиди.



Фигура 49. Родословно дърво на семейство 381, с означен носителски статус при изследваните членове. Със стрелка е показан индексния пациент EP381 в семейството.

• Пациент EP409

Момче на 16 години, с изява на комплексни парциални пристъпи и от 3-годишна възраст без отговор към лечението с различни антиконвулсанти. Има умерен ИД, дефицит на вниманието с хиперактивност, прояви на агресия. Соматичният статус включва "café au lait" петна вляво на корема и на бедрото вдясно, както и две петна на ляво бедро. Има конвергентен страбизъм в ляво, невротични тикове. КТ данните показват калцификати в лява малкомозъчна хемисфера. Пациентът беше изследван за мутации в *SCN1A*, в който не се откриха патогенни варианти. Микрочиповият анализ разкри хетерозиготна делеция с неясен клиничен ефект с размер 1.33 Mbp, засягаща 15q22.31 региона (Таблица 24, пациент EP409): arr[hg19] 15q22.31(64,242,830-65,570,262)x1. Майката е с данни за епилептични пристъпи, които се изявяват и по време на бременността. Сегрегационният qPCR показва отсъствието на делецията при нея (Фигура 50).



Фигура 50. Криви на амплификация чрез qPCR анализ на тестов фрагмент от *TRIP4* гена, част от 15q22.31 региона и контролния фрагмент от *GNA12* гена при пациент EP409 (оранжева крива), неговата майка (синя крива) и контролните индивиди.

5. Обсъждане

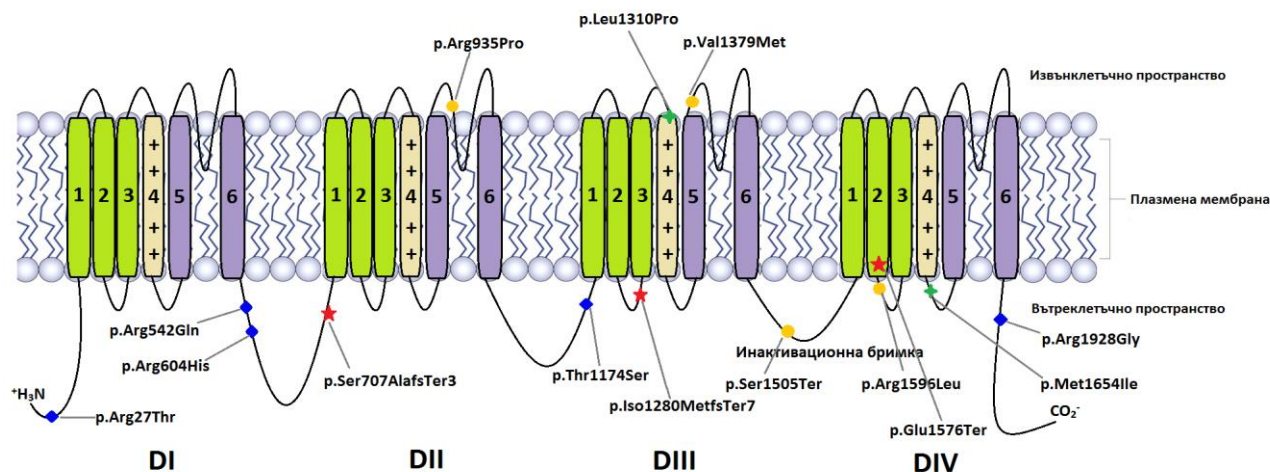
5.1. Обсъждане на резултатите от секвенционния анализ на *SCN1A* гена

В резултат от настоящото проучване чрез секвениране по Сангер на *SCN1A* гена открихме общо 18 точкови варианти при 22 пациенти от изследваната група (Резултати, Таблица 19). От тях 12 варианти са с патогенен и вероятно патогенен ефект в 9% от пациентите. Сред тези варианти осем са патогенни, позволяващи да се постави генетична диагноза на 9.8% от пациентите с епилепсии от GEFS+ спектъра, а четири варианта са с вероятно патогенен ефект при 4.9% от пациентите с GEFS+ епилепсии и с потенциален интерес към бъдещи проучвания. От вариантите с патогенен и вероятно патогенен ефект пет са нови, открити в настоящото проучване и недокладвани до този момент в литературните източници (p.Glu1576Ter, p.Ser707AlafsTer3, p.Iso1280MetfsTer7, p.Leu1310Pro, c.2383-1G>A). В допълнение, бяха открити шест варианта с вероятно непатогенен ефект при 10 пациенти от изследваната група.

Патогенните варианти включват пет известни мутации и три нови, непубликувани досега в литературата, намерени при пациенти с епилепсия от GEFS+ спектъра. Според типа си, патогенните варианти представляват три известни missense мутации, засягащи извънклетъчните линкери между сегменти S5 и S6 на домен DIII (p.Val1379Met) и DII (p.Arg935Pro) и вътреклетъчния свързващ участък между сегменти S2 и S3 на домен DII (p.Arg1596Leu) (Фигура 51, жълто отбелязани мутации). Две мутации са с прекъсване на рамката на четене (nonsense), като едната е известна (p.Ser1505Ter), а другата е нова, недокладвана досега в литературата (p.Glu1576Ter) (Фигура 51). Две мутации водят до изместване на рамката на четене (frameshift) и са неописани досега в литературните източници (p.Ser707AlafsTer3, p.Iso1280MetfsTer7). И двете са разположени в интрацелуларни свързващи участъци от структурата на Nav1.1 белтъка (Фигура 53, червено отбелязани мутации). Една мутация представлява патогенен известен сплайс-място вариант, засягащ сплайс - акцепторното място на интрон 19, намерена при пациент с диагноза DS (c.3879-1G>T). Патогенните варианти бяха открити при четири пациенти със суспектна диагноза DS и четири пациенти с по-леките форми на епилепсия от GEFS+ спектъра. При трима от тях бяха открити два патогенни nonsense варианти и един променящ рамката на четене, което позволи прецизиране на диагнозата от GEFS+ на DS. По този начин беше открита генетичната причина за заболяването при 69.2% от пациентите с DS.

Вероятно патогенните варианти са четири, като два от тях са новооткрити в настоящото проучване. Единият от тях е missense вариант, разположен в непосредствена близост до частта от протеина, навлизащ в клетъчната мембрана и изграждаща волтажния сензор S4 на домен DIII (p.Leu1310Pro), и бе открит при пациент с DS. Другият нов вариант засяга сплайс - акцепторното място на екзон 14 бе намерен при пациент с GEFS+ синдром (c.2383-1G>A) (Фигура 51). Двата известни варианта с вероятно патогенен ефект са един missense вариант (p.Met1654Ile), разположен в линкерния регион на S4-S5 от домен

DIV, намерен при пациент с GEFS+ синдром, и сплайс-акцепторен вариант (с.4254-4A>G), открит при пациент с диагноза DS.



Фигура 51. Схематична структура на Nav1.1. протеина, изграден от четири хомоложни домена (DI- DIV), всеки от които с шест трансмембранных сегмента (S1–S6). Сегменти S5 и S6 (лилаво) изграждат пората на канала, а сегмент S4 (жълто) представлява волтажния сензор, изграден от положително заредени АК. Сегменти от S1, S2 и S3 (зелено) имат структурна роля. Вътреклетъчната бримка между S6 от DIII и S1 от DIV изгражда инактивационния изход (гейт), необходим за бързата инактивация на канала. Схематично са показани позициите на намерените варианти (без сплайс - мутациите): в жълто - четири известни патогенни варианти, в червено – три нови, недокладвани патогенни варианти; в зелено – два варианта с вероятно патогенен ефект; в синьо – пет варианта с вероятно непатогенен ефект.

5.1.1. Патогенни варианти, докладвани в литературните източници и бази – данни

В резултат от настоящия дисертационен труд, чрез секвениране на *SCN1A* гена открихме пет описани в литературните източници и бази-данни варианти при пет неродствени пациенти от изследваната група: три пациенти с насочваща диагноза DS и двама пациенти с GEFS+ синдром. Три от вариантите представляват missense замени (p.Val1379Met, p.Arg1596Leu, p.Arg935Pro), един nonsense (p.Ser1505Ter) и една мутация засягаща сплайс - акцепторно място (с.3846-1G>T).

• Вариант с.4135G>A p.Val1379Met, rs121918986

Мутацията rs121918986 засяга екзон 21 от *SCN1A* гена е причинена от замяна на гуанин с аденин в позиция 4153 на кодиращата последователност (GTG/ATG), което води до синтез на АК метионин вместо валин в кодон 1379 (p.Val1379Met) (Раздел Резултати, Таблица 19). Мутацията беше намерена в хетерозиготно състояние при пациент EP548, момиче на две години с диагноза DS. Заменената АК валин е с висока еволюционна консервативност и не фигурира в ExAc базата-данни (<http://exac.broadinstitute.org>).

Предикционните програми определят варианта като патогенен (Раздел Резултати, Таблица 21).

Мутацията е разположена в екстрацелуларната бримка, свързваща сегменти S5 и S6 от домен DSIII на Na⁺ канал (Фигура 51). Тази бримка играе важна роля за формирането на пората на канала, където впоследствие се генерира акционния потенциал чрез миграция на Na⁺ йони. Вариантът е намерен от други автори при DS пациент (250). Същата мутация е намерена и докладвана като патогенна при още няколко пациента с диагноза DS (245,246). При всички случаи, включително и нашия, мутацията не е намерена при родителите и е възникнала *de novo*. При семейство 548 се наблюдават единични FS при майката и брата на бащата. Предвид тяхното наличие, но липсата на обсъждания вариант при тях, е възможно родствениците на EP548 да носят друга/и мутация/и в друг/и ген/и, които да са причина за изявата на пристъпи при тях, както и да допринасят за клиничната картина при индексния пациент. В този смисъл, е препоръчително провеждането на таргетно екзомно секвениране на панел от гени, свързани с ИГЕ и фокални епилепсии с цел да се идентифицира допълнителния генетичен вариант, отговорен за фебрилните пристъпи в семейство 548. По отношение на с.4135G>A, p.Val1379Met мутацията в *SCN1A* гена, наличните литературни данни и информацията от базите данни ни даде основание да я класифицираме като патогенна и да потвърдим предполагаемата диагноза при EP548 - синдром на Драве (DS).

- **Вариант с.4787G>T, p.Arg1596Leu**

Вариантът беше намерен в хетерозиготно състояние при пациент EP449, момиче на 4-годишна възраст с диагноза DS и без фамилна обремененост. Пациентката е с данни за рефрактерни пристъпи с фокално начало, вторична генерализация и единичен SE. Сегрегационният анализ потвърди, че е възникнала *de novo* (Резултати, Фигура 16B). Заменената АК не фигурира в ExAc базата-данни. Предикционните програми я определят като увреждаща белтъчната структура (Резултати, Таблица 21).

Мутацията p.Arg1596Leu е описана като *de novo*, при пациент с диагноза DS (247). Zuberi и съавтори описват същата мутация при пациент с GEFS+ синдром (57). Мутация, засягаща същата АК p.Arg1596, но водеща до замяна с друга АК е описана до този момент при два случая на епилепсия. Harkin и съавтори намират друга замяна в същата позиция (p.Arg1596Cys) отново *de novo*, при пациент с криптогенна фокална епилепсия, умерен ИД и атаксия (55). Dlugos и съавтори докладват същата замяна (p.Arg1596Cys) при пациент с по-лека клиника: изява на класически GEFS+ синдром с добро повлияване от лечението и с нормално психомоторно развитие (248).

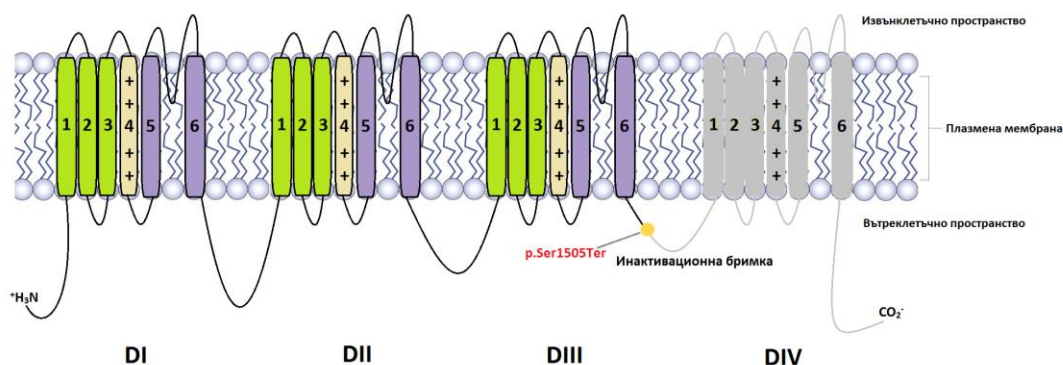
Вариантът засяга цитоплазмената бримка, свързваща сегменти S2 и S3 от домен DIV на белтъка – DIV S2-S3 (Фигура 51). Този регион е известен с високата степен на консервативност между далечно-родствени видове (Резултати, Фигура 16B). Замяната p.Arg1596Leu е неконсервативна и би могла да повлияе функцията на белтъка, тъй като заменената АК левцин е с по-различни физико-химични характеристики (неполярна, хидрофобна) от тази на дивия тип АК - аргинин (полярна, заредена положително).

Вземайки предвид високата еволюционна консервативност на заменената АК, оценката на нейния ефект върху белтъчната структура, липсата на варианта в известните бази - данни, съдържащи информация за чести популационни полиморфизми и наличните литературни данни за носещи я пациенти, бихме могли да заключим, че намерената missense мутация в *SCN1A* гена е причината за наблюдавания фенотип при пациент EP449.

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

Вариантът rs139300715 беше намерен в хетерозиготно състояние при пациент EP378, момче на три години с диагноза GEFS+ синдром. Не се открива в ExAc базата - данни. В допълнение, в ClinVar базата данни е класифициран като патогенен. Вариантът е докладван от няколко изследователски групи при пациенти с DS (25,26,55, 247,251) в *de novo* състояние, включително и при монозиготни близнаци с диагноза DS (249). В нашия случай няма данни за фамилна обремененост и не разполагахме с материал от родителите за провеждане на сегрегационен анализ, за да проверим носителския им статус.

Замяната c.4532C>A, p.Ser1505Ter засяга вътреклетъчната инактивационна бримка, свързваща домени DIII и DIV от структурата на белтъка (Фигура 51). Вероятно води до синтеза на скъсен белтъчен продукт без домен DIV и C-краен домен (Фигура 52), неспособен да изпълнява нормалната си функция. Друго възможно последствие е активирането на процеса на нонсенс-медираното разрушаване на ниво матрична РНК и в крайна сметка непродуктивна транслация на интактен белтък. И в двата случая ефектът върху функциите на Na⁺ канал би бил абнормен. Освен пристъпите, при детето се наблюдава и леко забавяне в моторното развитие през първите месеци от живота. С оглед на посочените дотук литературни данни и в съответствие с препоръките на ACMG (230), описания вариант беше класифициран като патогенен и доведе до поставяне на генетична диагноза DS с възможна лоша прогноза при пациент EP378.



Фигура 52. Възможно последствие от мутацията p.Ser1505Ter върху синтеза на белтъка. Със сиво е показана частта от Nav.1.1 протеина, която няма да се синтезира.

- **Вариант с.3846-1G>T , IVS19-1G>T, CS096242**

Молекулният вариант с.3879-1G>T (IVS19-1G>T) засяга последния консервативен нуклеотид в сплайс-акцепторното място на интрон 19 в *SCN1A* гена (Резултати, Фигура 15А). Замяната на G с T разрушава каноничното сплайс-акцепторно място AG, необходимо за провеждане на нормалното зреење на пре-матричната РНК. Според предиктивния софтуер Human Splicing Finder съществува висок процент вероятност за използване на алтернативен AG нуклеотид, разположен навътре в екзон 20 (Фигура 53). Това би довело до делеция на 68 нуклеотида от екзон 20 (с.3847_3915del) и в крайна сметка изместване на рамката на четене и поява на стоп - кодон след 15 АК в последователността на белтъка (p.Val1283AspfsTer15). Като резултат, нормалната синтеза на Nav1.1 канала ще бъде прекъсната в трансмембранен структурен сегмент 3 (S3) от белтъчен домен DIII, което би довело до синтеза на дефектен белтък.

Друго вероятно последствие е използването на алтернативен AG сплайс-акцепторен динуклеотид на някой от следващите интрони и в крайна сметка пропускане на един или няколко екзона от кодиращата част на ДНК (exon skipping). При всички случаи е необходимо проследяване ефекта на този вариант върху РНК и белтъчния продукт чрез анализ на иРНК продукта и експресия в моделни системи.

Вариантът с.3879-1G>T беше открит при момиче с епилепсия, изоставане в ННР и дисморфичен синдром. Идентична мутация с.3879-1G>T (CS096242) е вече описана от Derienne и съавтори, при пациент с DS (247). Алтернативна мутация, засягаща същия нуклеотид в интрон 19 е описана при пациент с DS (252). В допълнение, подобна мутация, но засягаща съседен интрон е докладвана при пациент отново с DS (26). В нашият случай фенотипа отчасти наподобява DS, но се наблюдават допълнителни клинични черти като лицев дисморфизъм. В тази връзка беше проведен микрочипов анализ, който не доведе до откриване на клинично - значими копийни варианти. Възможно е наличието на втора точкова мутация в ген, свързан с нормалното ембрионално развитие, който да допринесе за клиничната изява на синдромното състояние при пациент EP450. За неговото идентифициране е необходимо провеждането по-широкообхватен метод, каквито са таргетното или цялостното екзомно секвениране, което би могло да се осъществи в рамките на бъдещ изследователски проект.

Sequence Position	cDNA Position	Splice site type	Motif	New potential splice site	Consensus value (0-100)
25	-143	Acceptor	aattttttaaggt	aattttttaagGT	81.11
34	-134	Donor	aaggtttac	AAggtttac	70.88
47	-121	Donor	aatgtctga	AAgtctga	72.01
70	-98	Acceptor	aataattataagca	aataattataagCA	67.3
98	-70	Acceptor	tgtattatatagca	tgtattatatagCA	75.51
143	-25	Donor	attgttatt	ATTgttatt	66.09
155	-13	Donor	tttgtgtgt	TTgtgtgt	72.44
157	-11	Donor	tgtgtgtgc	TGgtgtgc	70.16
170	3	Acceptor	TTCATTGGTCAGTT	ttcattgggtcagTT	82.98
174	7	Donor	TTGGTCAGT	TTGgtcagt	88.24
178	11	Acceptor	TCAGTTTAACAGCA	tcagtttaacagCA	81.13
199	32	Acceptor	TGGGTACTCAGAA	tgggttactcagAA	80.26
199	32	Donor	TGGGTACT	TGgttact	76.13
208	41	Acceptor	CAGAACTTGGAGCC	cagaacttggagCC	69.35
224	57	Acceptor	CAATCTCTCAGCA	caaatctctcagCA	84.83
233	66	Acceptor	CAGGACCTAAGAG	caggacactaagAG	67.96
235	68	Acceptor	GGACACTAAGAGCT	ggacactaagagCT	66.98
242	75	Acceptor	AAGAGCTCTGAGAC	aagagctctgagAC	67.42
251	84	Acceptor	GAGACCTCTAAGAG	gagacctctaagAG	71.3
253	86	Acceptor	GACCTCTAAGAGCC	gacctctaagagCC	70.35
271	104	Acceptor	CTCGATTGAAGGG	ctcgatttgaagGG	80.65
278	111	Acceptor	TGAGGGGATGAGGG	tgaagggatgagGG	66.17

Фигура 53. Вариант с.3879-1G>T (IVS19-1G>T) в интрон 19 на ген *SCN1A*: Анализ на вероятните канонични сплайс-места в близост до интрон-екзонната граница интрон 19/екзон 20 с помощта на предиктивния софтуер Human Splicing Finder.

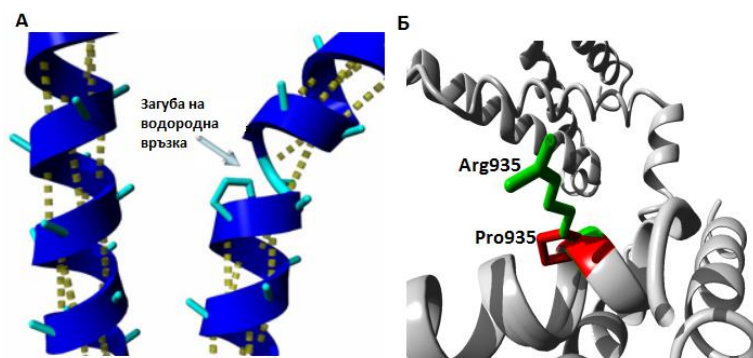
• Вариант с.2804G>C, p.Arg935Pro

Молекулният вариант с.2804G>C в екзон 15 на *SCN1A* гена води до замяна на аргинин с пролин (p.Arg935Pro) в консервативен район (Резултати, Фигура 17В), свързващ сегменти S5 и S6 от домен DII, участващи във формирането на пората на канала (Фигура 51). Съществува значителна разлика, както в пространствено, така и в биохимично отношение между дивия тип и мутантната АК. Пролинът е значително по - малка и хидрофобна АК. Аргининът е положително зареден и значително по - голяма в пространствено отношение АК, взаимодействаща си с околните остатъци Glu940, Glu943 и Asp947, с които формира солеви мостове (Фигура 54Б). Разликата в заряда на мутантната Pro935 прекъсва тези йонни взаимодействия и нарушава структурата на домена (Фигура 54А). В допълнение, по - малкият размер на Pro935 допълнително нарушава взаимодействието на белтъка с липидната фаза на мембраната, което би довело до абнормна функция на канала.

Вариантът с.2804G>C, p.Arg935Pro не е открит при здрави индивиди в ExAc и 1000G базите-данни. Използваните предикционни програми го определят като патогенен вариант (Резултати, Таблица 21). Досега мутацията p.Arg935Pro е описана при единичен случай на DS при пациент от китайски произход (253). Мутации, дефинирани като патогенни и засягащи същата аминокиселина, но водещи до замяна на аргинина с хистидин и цистеин съответно (p.Arg935His, p.Arg935Cys) са били установени при неродствени пациенти с DS и тежко изоставане в психомоторното развитие, както и граничен DS (41,55,60,247,254).

В нашето проучване, мутацията p.Arg935Pro бе открита при пациент с GEFS+ и старт на постепен регрес в НПР след началото на пристъпите с прогресия до тежък ИД. Наблюдаваният фенотип е класическа изява на DS. Проведеният сегрегационен анализ

показа, че мутацията е унаследена от болната майка на пробанда, с история за ГТКП в детството. Вариантът присъства и при засегнатата сестра, при които също се наблюдава епилепсия с умерена степен на ИД и не се открива при клинично-здравия баща (Резултати, Фигура 17Б).



Фигура 54. Топология на белтъка Nav1.1 с разположение на намерената мутация при пациент EP446. **А.** 3D изображение на частта от DII домена, засегната от p.Arg935Pro мутацията, показваща загубата на H^+ връзка и нарушаване структурата на α -спиралата **Б.** 3D-изображение в близък план на пространственото разположение на дивия тип АК-аргинин (зелено) и мутантната АК-пролин (червено) в позиция 935 от структурата на DII домена. Генерирано посредством HOPE проект чрез използване на PDB файл 4PYP (<http://www.cmbi.ru.nl/hope>).

Общото в описаните дотук случаи на засягане на Arg935 от Nav1.1 белтъка е изявата на сходен тежък неврологичен фенотип, което вероятно се дължи на важната роля на Arg935 за структурата и функцията на натриевия канал. В този смисъл, нашите резултати подкрепят хипотезата, че мутации с промяна на смисъла, засягащи АК, изграждащи пората на канала, както е S5-S6 свързващия участък от DII, водят до изява на по-тежък фенотип, отколкото missense мутации, засягащи другите сегменти от белтъка (60). Наличието на мутации в тези консервативни региони би могло да доведе до нарушена селективност на различни типове йони и абнормна промяна в концентрационния им градиент от двете страни на мембраната и като резултат - повишена възбудимост на неврона (59).

Базирайки се на всички тези наблюдения, както и на препоръките за класификация на точкови варианти от ACMG (230), ние класифицирахме описания вариант като патогенен, явяващ се генетичната причина за заболяването при пациент EP446 и неговите родственици.

5.1.2. Нови варианти, с очакван патогенен ефект, недокладвани в литературните източници и бази данни

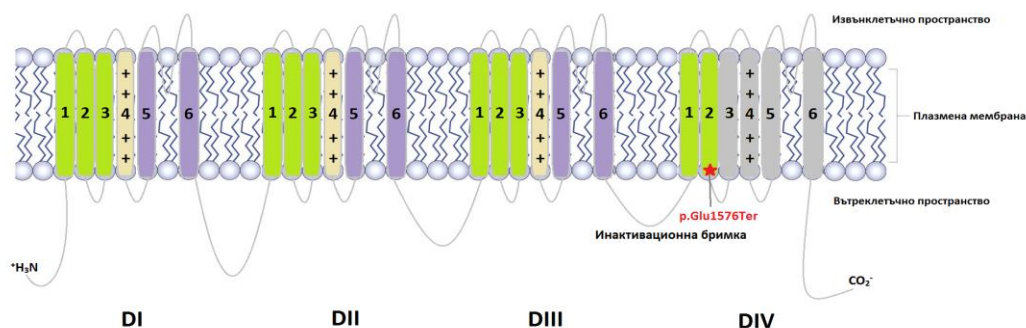
В резултат от настоящия дисертационен труд открихме три нови, недокладвани до този момент в литературата точкови варианти, които с голяма вероятност нарушават нормалната структура на белтъка. Един вариант е от типа прекъсване на рамката на четене

(p.Glu1576Ter), а два представляват делеции с изместване на рамката на четене (p.Ser707AlafsTer3, p.Iso1280MetfsTer7). И трите мутации са открити при пациенти с диагноза епилепсия от GEFS+ спектъра и без ефект от проведената антиконвулсанти терапия.

- **Вариант c.4744G>T, p.Glu1576Ter**

Мутацията е от типа nonsense и води до спиране синтеза на интактен белтък в кодон 1576 поради появата на стоп - кодон в матричната РНК. Вариантът беше открит при пациент EP393, момче на четири години с диагноза GEFS+ синдром и без ефект от политерапията с антиконвулсанти. Не съществуват данни за фамилна обремененост. Вариантът не фигурира в базите данни ExAc и 1000 човешки генома (1000 Genomes Project).

Предикционната програма Mutation Taster определя варианта като предизвикващ заболяване. Във всички случаи, намереният вариант води до синтеза на скъсен белтъчен продукт без домен DIV и C-краен домен (Фигура 55). Това би довело до нарушаване на нормалните функции на канала с оглед на това, че липсват важни структурни (S5 и S6) и сензорни сегменти (S4) от него. Подобни мутации с прекъсване на рамката на четене в резултат от стоп - кодон в същия екзон 25 са докладвани и от други изследователски групи при пациенти с DS (55,246,247). Вземайки предвид всички тези факти, заключихме, че откритият вариант е генетичната причина за епилепсията при пациент EP393 и вероятната диагноза при него е DS.



Фигура 55. Схематично изображение на ефекта на мутацията p.Glu1576Ter върху синтеза на белтъка. С червена звезда е показана позицията на мутацията в структурата на белтъка. Със сиво е показана, частта от Nav.1.1 протеина, която няма да се синтезира.

- **Варианти с изместване на рамката на четене c.2136delC, p.Ser707AlafsTer3 и c.3837_3843delAATTGTT, p.Iso1280MetfsTer7**

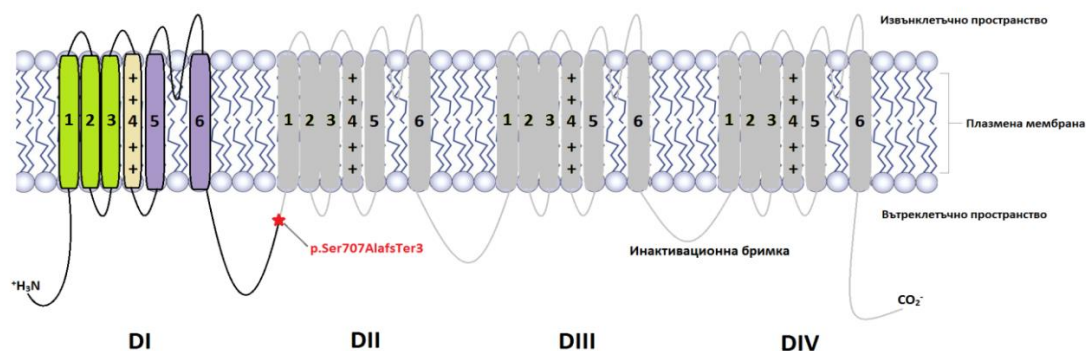
Посочените нови варианти представляват едно– (c.2136delC) и олигонуклеотидна делеция (c.3837_3843delAATTGTT) от кодиращата част от *SCN1A* гена, което води до изместване на рамката на четене и поява на стоп-кодон в матричната РНК. И в двата случая се прекъсва синтезата на белтъка три нуклеотида в посока 3' при вариант p.Ser707AlafsTer3 и седем нуклеотида при вариант p.Iso1280MetfsTer7. Това би могло да доведе до синтезата на нефункционален белтъчен продукт, неспособен да изпълнява нормалната си функция, или би последвало активиране на процеса на нонсенс - медираното разрушаване на ниво матрична РНК и в крайна сметка непродуктивна трансляция на интактен белтък. И в двата случая последствията са болестотворни.

Двата варианта не се откриват в базите-данни, съдържащи информация за здрави контролни индивиди ExAc и 1000G. В допълнение, предикционната програма Mutation Taster ги определя като патогенни.

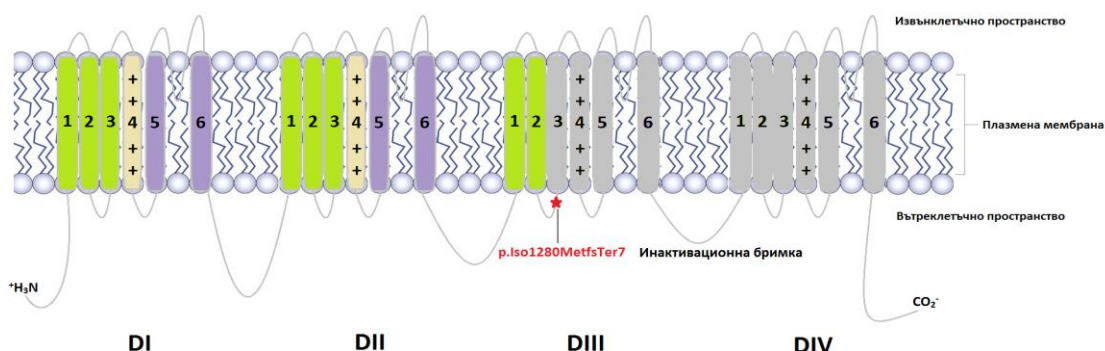
Вариантът c.2136delC, p.Ser707AlafsTer3 се открива в екзон 12 от *SCN1A* гена и засяга домени DII, DIII и DIV, инактивационната цитоплазмена бримка, както и цитоплазмения C - терминален домен от белтъка (Фигура 56А). Открит е при пациент EP398, момиче на девет години, ГТКП без фебрилна провокация и без отговор към настоящата политерапия с антиконвулсанти. В допълнение, детето има поведенчески проблеми - хиперактивност. Бащата е с данни за FS+ в детството, но не разполагаме с материал от родителите за извършване на сегрегационен анализ. Въпреки това, подобна еднонуклеотидна делеция с изместване на рамката на четене е намерена при пациент с тежък DS (253). Откриването на генетичната причина за заболяването при EP398 ни даде основание да поставим диагноза DS.

Вариантът c.3837_3843delAATTGTT, p.Iso1280MetfsTer7 засяга екзон 19, което води до прекъсване синтезата на домени DIII, DIV, разположената между тях инактивационна бримка, както и C-крайния домен, необходими за нормалното генериране и разпространение на нервния импулс (Фигура 56Б). Открит е при пациент EP540, момиче на една година с диагноза DS и без поведенчески проблеми. Сегрегационният анализ при родителите показва, че вариантът е възникнал *de novo* (Резултати, Фигура 20Б). Подобна делеция на 11 нуклеотида с изместване на рамката на четене в същия екзон 19 е описана при DS случай (246). С оглед на изложените данни, както и съгласно препоръките на ACMG (230) ние определихме, че това е генетичната причина за епилепсията при пациент EP540 и потвърдихме първоначално поставената диагноза DS.

А



Б



Фигура 56. Възможни последствия върху синтеза на белтъка в резултат от двете мутации с изместване на рамката на четене. Със сиво е показана, частта от Nav.1.1 протеина, която няма да се синтезира. **А.** Схематично изображение на ефекта на мутацията p.Ser707AlafsTer3 върху синтеза на белтъка. **Б.** Схематично изображение на ефекта на мутацията p.Iso1280MetfsTer7 върху синтеза на белтъка.

5.1.3. Варианти с вероятно патогенен ефект

Чрез директно секвениране на *SCN1A* гена открихме четири варианта в изследваната група пациенти, които класифицирахме като варианти с вероятно патогенен ефект. Два от вариантите представляват несинонимни замени, а два засягат сплайс – акцепторните места в различни райони от зреещата иРНК (Резултати, Таблица 20). Един missense вариант (p.Leu1310Pro) и един сплайс-място вариант (c.2383-1G>A) са нови, неописани досега в обществено достъпните бази-данни и литературни източници.

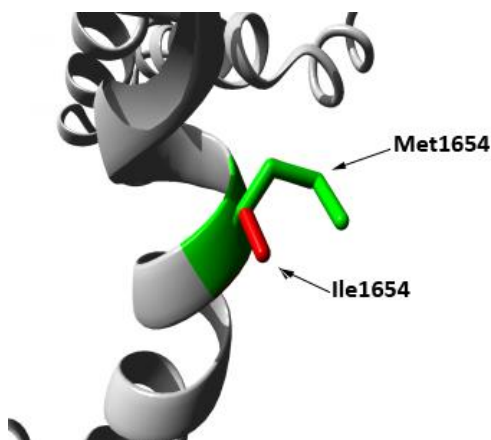
- **Вариант c.4980G>T, p.Met1654Ile, rs796053031**

Вариантът rs796053031 засяга нуклеотид от последния екзон 26 на *SCN1A* гена. Не е описан досега в литературата като асоцииран със заболяване. Вариантът е публикуван в базата-данни ClinVar като вероятно патогенен. В резултат от мащабен проект NHLBI ESP Exome Variant Project (INFANT/EPI panel) той не е намерен в 6500 здрави контролни индивиди от европейската и афро-американската популации. Не фигурира и в ExAc и 1000G базите данни. Вариантът rs796053031 беше намерен при пациент EP522, момиче от

български произход с диагноза GEFS+ и данни за фамилна обремененост. Аминокиселинната замяна е консервативна, тъй като и двете АК метионин и изолевцин са неполярни, незаредени АК. Въпреки този факт, в пространствено отношение изолевцинът е по-малка АК, сравнена с дивия тип метионин (Фигура 57). Това би могло да доведе до загуба на взаимодействие между сегменти S4 и S5 в рамките на домен DIV, където се намира замяната.

Мутацията е разположена във вътреклетъчния бримков участък свързващ сегменти S4 и S5 на домен DIV (Фигура 51), където има докладвани множество патогенни мутации, причиняващи аберантен фенотип (57,246,247,255,256). Ефектът на този вариант върху белтъка е проверен от няколко предикционни програми, които го определят като потенциално патогенен (увреждащ белтъчната структура/функция) (Резултати, Таблица 21). Въпреки данните за фамилна обремененост, не успяхме да проведем сегрегационен анализ, поради непредоставяне на материал от болните родственици.

В този смисъл, вариантът rs796053031 би могъл да е причина за заболяването при пациент EP522, въпреки че вероятността той да е бенигнен не може да бъде изключена без провеждането на функционални изследвания и сегрегационен анализ.



Фигура 57. Топология на белтъка Nav1.1 с разположение на намерената мутация при пациент EP522. 3D-изображение в близък план на пространственото разположение на дивия тип АК-метионин (**зелено**) и мутантната АК изолевцин (**червено**) в позиция 1654 от структурата на DIV домена. Генерирано посредством HOPE проект чрез използване на PDB файл 4PYP (<http://www.cmbi.ru.nl/hope>).

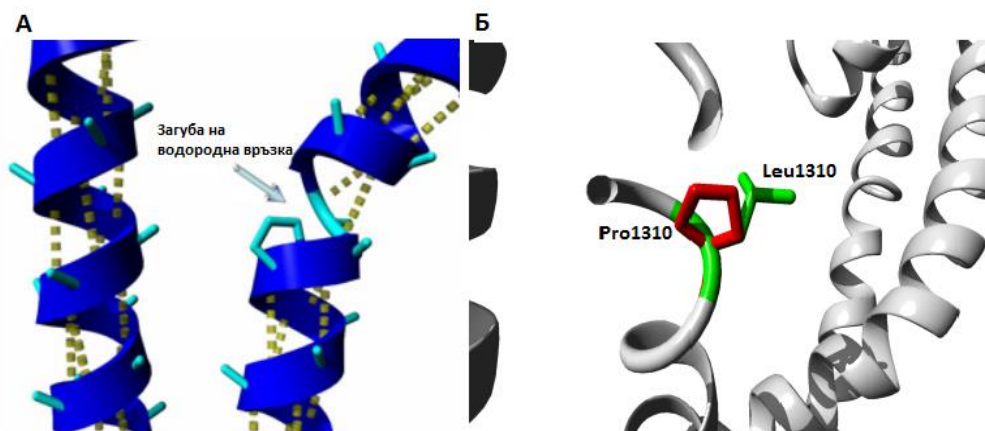
- **Вариант c.3929T>C, p.Leu1310Pro**

Вариантът е нов, неописан досега в литературните данни. В допълнение, той не фигурира в ExAc и 1000G популационните бази - данни. Беше открит при пациент EP527, момче с изява на рефрактерни пристъпи и съмнение за DS, моторни нарушения и дисморфичен синдром. Родителите не съобщават за фамилна обремененост и сегрегационният анализ показва, че вариантът не присъства при тях (Резултати, Фигура 23Б). Предикционните програми определят замяната като увреждаща белтъчната структура (Резултати, Таблица 21).

В резултат от p.Leu1310Pro замяната се засяга екстрацелуларната бримка, свързваща сегменти S3 и S4 от домен DIII (Фигура 51). Замяната се намира в непосредствена близост до частта от протеина, навлизащ в клетъчната мембрана. Въпреки

че е консервативна, двете АК левцин и пролин се различават в пространствено отношение - пролинът е по-малка АК, в сравнение с левцина (Фигура 58Б). Тази разлика в размера може да наруши контакта с липидната мембрана. Пролинът в този случай нарушава нормалната структура на α спиралата, поради загуба на една водородна връзка със следващия остатък от веригата (Фигура 58А). Тази структурна промяна би довела до нарушаване нормалната функция на белтъка, чрез прекъсване взаимодействието между двата сегмента S3 и S4.

Вземайки предвид оценката на предикционните програми, липсата на варианта при родителите, както и вида на заменената АК ни даде основание да заключим, че р.Leu1310Pro би могъл да е причината за заболяването при EP527. Все пак, необходими са допълнителни анализи за оценка на функционалния ефект върху белтъка чрез моделни системи, каквито са клетъчните култури или миши овоцити.



Фигура 58. Топология на белтъка Nav1.1 с разположение на намерената мутация при пациент EP527. **А.** 3D изображение на частта от DSIII домена, засегната от р.Leu1310Pro мутацията, показваща загубата на H^+ връзка и нарушаване структурата на α -спиралата **Б.** 3D-изображение в близък план на пространственото разположение на дивия тип АК-левцин (зелено) и мутантната АК пролин (червено) в позиция 1310 от структурата на DSIII домена. Генерирано посредством HOPE проект чрез използване на PDB файл 4PYP (<http://www.cmbi.ru.nl/hope>).

- **Вариант с.4252-4A>G, rs796053007**

Замяната с.4252-4A>G засяга високо консервативно при бозайниците сплайс-акцепторно място, необходимо за провеждане на нормалното зреење на пре-матричната РНК. Беше намерен при пациент EP499 с диагноза GEFS+ и изява на рефрактерни пристъпи. Вариантът с.4252-4A>G досега не е класифициран като патогенен, нито като непатогенен в литературата. В ClinVar базата данни е определен като вариант с неясно клинично значение. Той не е открит в 6500 здрави индивиди от европейски и афроамерикански произход, част от мащабния проект NHLBI Exome Sequencing Project, както и не фигурира в ExAc и 1000G базите-данни.

В настоящото проучване, възможността за използване на алтернативно сплайс-място беше проверено чрез предикционната програма Human Splicing Finder. Анализът на

секвенцията показва висок процент вероятност за използване на следващ AG динуклеотид, разположен навътре в екзон 22 (Фигура 59). Това би довело до делецията на 50 нуклеотида от екзон 22 (с.4252_4302del), промяна на рамката на четене и в крайна сметка поява на стоп-кодон след седем АК в последователността на белтъка (p.Val1415LysfsTer7). В резултат ще се синтезира скъсен белтъчен продукт без домени DIII и DIV, неспособен да формира интактен Na⁺ канал в мембраната.

Position	Splice site type	Motif	New potential splice site	Consensus value (0-100)
-85	Acceptor	aaattatatcagta	aaattatatcagTA	76.42
-81	Acceptor	tatatcagtaagaa	tatatcagtaagAA	71.26
-77	Donor	tcagtaaga	TCagtaaga	80.36
-62	Acceptor	attaaacatcaggt	attaaacatcagGT	84.04
-53	Donor	caggtcttaa	CAGgtcttaa	71.67
-38	Acceptor	tttactccaaagta	tttactccaaagTA	80.46
-30	Donor	aaagtaaaa	AAAgtaaaa	73.97
-12	Acceptor	ccttcttaaatagGC	ccttcttaaatagGC	83.19 (WT)
2	Acceptor	CCACATTCAAAGGA	ccacattcaaagGA	77.24
26	Acceptor	TAAATGATGCAGCA	taatgatatgcagCA	80.96
27	Donor	AATGTATGC	AATgtatgc	77.2
29	Acceptor	TGTATGCAGCAGTT	tgtatgcagcagTT	81.42
39	Acceptor	AGTTGATTCAGAA	agttgattccagAA	83.32
52	Donor	AATGtaagt	AATGtaagt	88.18 (WT)
+12	Acceptor	ttgtattcttaagtc	ttgtattcttaagTC	77.16
+33	Acceptor	aatattgatcaggt	aatattgatcagGT	80.78
+42	Donor	caggttggtta	CAGgttggtta	75.85
+45	Donor	gtggtaaaa	GTGgtaaaa	78.99
+56	Acceptor	aatcgaataaagca	aatcgaataaagCA	68.14

Фигура 59. Анализ на вероятните канонични сплайс-места в близост до интрон-екзонната граница интрон 21/екзон 22 с помощта на предиктивния софтуер Human Splicing Finder.

• Вариант с.2383-1G>A

Вариантът с.2383-1G>A засяга каноничното сплайс - акцепторно място AG на интрон 13 от *SCN1A* гена. Досега не е докладван в литературните данни. Не фигурира и в базите-данни ExAc и 1000G. Вариантът е намерен отново при случай на GEFS+ синдром с рефрактерни пристъпи и *de novo* възникване (Резултати, Фигура 24Б).

In silico анализът за търсене на алтернативни сплайс места чрез софтуери Human Splicing Finder и NetGene2 показва с най-голяма вероятност използването на алтернативен AG нуклеотид, разположен 23 нуклеотида навътре в екзон 14 (Фигура 60). Това би довело до делеция на тези 23 нуклеотида и изместване на рамката на четене (с.2383_2406del), както и поява на стоп - кодон четири АК в 3' посока (p.Val795LysfsTer4) и прекъсване на синтеза на интактен белтък.

И при двата описани дотук сплайс-място варианта има възможност за използване на сплайс-акцепторното на място на съседен интрон и пропускане синтеза на текущия (exon skipping). Друго възможно последствие е активирането на процеса на нонсенс - медираното РНК разграждане и в крайна сметка липса на синтеза на функционален продукт.

Acceptor splice sites, direct strand

pos	5'→3'	phase	strand	confidence	5'	intron	exon	3'
383	0	+		0.26	WT	TTGATCTTAG	^GTTTTCACTG	
405	1	+		0.19		ATCTTTACAG	^CAGAAATGTT	
408	1	+		0.20		TTTACAGCAG	^AAATGTTTCT	
456	1	+		0.17		TATTTCCAAG	^AAGGCTGGAA	

Position	Splice site type	Motif	New potential splice site	Consensus value (0-100)
-89	Donor	attgtggga	ATtgggga	71.59
-96	Acceptor	gtgggaataagca	gtgggaataagCA	65.4
-90	Acceptor	aaatagcataagca	aaatagcataagCA	65.78
-76	Acceptor	ttatgttctaagag	ttatgttctaagAG	76.52
-74	Acceptor	atgttctaagagca	atgttctaagagCA	72.97
-55	Donor	tatgtcatg	TATgtcatg	67.88
-50	Donor	catgtatgt	CATgtatgt	80.33
-46	Donor	tatgttatt	TATgttatt	69.81
-35	Donor	ctggtggaa	CTGgtggaa	71.25
-34	Acceptor	tgggtggaattagat	tgggtggaattagAT	69.65
-12	Acceptor	ttttgatcttagGT	ttttgatcttagGT	85 (WT)
-3	Donor	tagGTTTC	TAGgttttc	69.7
11	Acceptor	GGATCTTTACAGCA	ggatctttacagCA	83.43
14	Acceptor	TCCTTACAGCAGAA	tcctttacagcagAA	86.89
62	Acceptor	ATTATTTCCAAGAA	attatttccaagAA	77.57
65	Acceptor	ATTCCAAGAAGGC	attccaagaagGC	76.82
92	Donor	ACGGTTTTA	ACGgtttta	65.82
100	Donor	ATTGTGACG	ATtgtgacg	68.32
102	Acceptor	TGTGACGCTTAGCC	tgtgacgcttagCC	72.91
110	Acceptor	TTAGCCTGGTAGAA	ttagcctggtagAA	77.22
115	Donor	CTGGTAGAA	CTGgtagaa	72.41
134	Acceptor	CCAATGTGGAAGGA	ccaatgtgggaagGA	72.19
172	Donor	TTGgtaaaa	TTGgtaaaa	78.77 (WT)
+40	Acceptor	tctaacaatcaggg	tctaacaatcagGG	84.1

Фигура 60. Анализ на вероятните канонични сплайс-места в близост до интрон-екзонната граница интрон 13/екзон 14 с помощта на предиктивните софтуери NetGene2 и Human Splicing Finder.

Поради липсата на категорични литературни данни за ефекта на описаните дотук сплайс - място варианти върху иРНК и резултатния белтък, както и непълно покриване на критериите за патогенност, публикувани от ACMG (230), ние ги класифицирахме като варианти с вероятно патогенен ефект. За определяне на ефекта им върху белтъчната структура са необходими допълнителни изследвания на ниво иРНК, както и експресия на аберагантния продукт в моделни системи, което поставя основите на бъдещ проект.

В настоящото проучване при всички пациенти с прекъсващи рамката на четене мутации (EP378, EP393, EP398, EP540) се наблюдава липса на адекватен отговор към антиконвулсантната терапия и изява на допълнителни психомоторни нарушения. Тези наблюдения относно патогенността на прекъсващите рамката на четене мутации (nonsense, frameshift делеции, някои splice - мутации) потвърждават наблюденията, че пълната липса на копие от *SCN1A* гена и загубата на функция от Nav1.1. протеина, съответно недостатъчната доза от него са достатъчно условие за появата на по-тежък епилептичен фенотип (56, 57, 257). При такива пациенти се наблюдава по-ранно начало на пристъпите и по-тежка изява на клиниката (57). Не така стои въпросът с missense мутациите, където аберагантното копие от белтъка се запазва и би могло да функционира, макар и неправилно. В тези случаи се наблюдават по-леките форми на епилепсия от GEFS+ спектъра (249,256). Но в тежестта на изява на заболяването от голямо значение са не само типа мутация, а и позицията ѝ на ниво белтък, както и природата на заменената АК. Патогенни промени в поляриността на АК се наблюдават във волтажния сензорен сегмент S4 от Nav1.1. протеина (57,59). В нашето проучване една АК замяна е разположена в началото на α-спиралния участък, изграждащ S4 сензорния сегмент от DIII – p.Leu1310Pro (Фигура 51). Дивият тип и мутантната АК са с еднакъв заряд, но се различават значително в структурно отношение и

в този смисъл замяната на левцина с пролин води до загуба на една водородна връзка, което би нарушило структурата на α -спиралния участък в клетъчната мембрана (Фигура 58). Като резултат се наблюдава тежък фенотип при пациент EP527, включващ рефрактерни ГТКП и моторни нарушения. Допълнително, в настоящото проучване, в резултат от две missense мутации (p.Arg1596Leu и p.Arg935Pro) се променя полярността на заменената АК в два свързващи участъка от Nav1.1. протеина – S2-S3 от DIV и S5-S6 от DII съответно (Фигура 51). Мутацията p.Arg1596Leu е с *de novo* възникване (Резултати, Фигура 16Б), а p.Arg935Pro сегрегират с болестния фенотип в семейството (Резултати, Фигура 17Б). И при двамата пациенти EP449 и EP446 съответно се наблюдава изява на рефрактерни пристъпи, като при EP446 те еволюират в постепен регрес в НПП и впоследствие – тежък ИД. Това би могло да се дължи на нарушени функции на канала в резултат от различната физико-химична природа на аберантните АК.

Освен това, при всички случаи на DS, с изключение на пациент EP450, където не разполагахме с материал от бащата за провеждане на сегрегационен анализ, откритата мутация е възникнала *de novo*. Това потвърждава наблюденията, че тежките форми на GEFS+ синдрома се дължат на *de novo* SCN1A възникнали мутации (51,257).

Наблюдаваната честота на откриваемост на патогенни точкови варианти от 9.8% е съизмерима с процента на SCN1A точкови мутации по литературни данни (10%), открити при пациенти с епилепсия от GEFS+ спектъра (51,52). В частност, в резултат от нашето проучване открихме патогенен SCN1A точков вариант при шест пациента с насочваща диагноза DS. Допълнително, при трима пациенти с неуточнена диагноза епилепсия от GEFS+ спектъра открихме две патогенни nonsense мутации (p.Ser1505Ter, p.Glu1576Ter) и една еднонуклеотидна делеция с изместване на рамката на четене и поява на стоп - кодон (p.Ser707AlafsTer3) – EP378, EP393, EP398. По този начин успяхме да прецизираме генетична диагноза DS при тези пациенти и общия диагностичен добив при DS пациентите, намерен в настоящото проучване е 69.2%. Това е от значение за избор на най-правилната антиконвулсанта терапия. Този процент на откриваемост е съизмерим с диагностичния добив на патогенни точкови SCN1A мутации със загуба на функция при случаи на DS (~70-80%), съобщен в литературата (51).

5.1.4. Варианти с вероятно непатогенен ефект

В резултат от настоящия дисертационен труд открихме шест варианта, три от които са рекурентни, а три се идентифицират при единични пациенти (Резултати, Таблица 20). Вариантите се откриват при общо 10 пациенти от изследваната група, пет от които са със диагноза GEFS+ синдром, трима са с ИГЕ/ГГЕ и двама пациенти са с изява на FS+. Откритите варианти не покриват изцяло критериите за патогенност на ACMG за класифицирането им като вероятно патогенни, защото не сегрегират в семейството, предикционните програми дават противоречиви оценки относно тяхната патогенност и се откриват с висока честота при здрави индивиди в популационните бази -данни. За част от

вариантите съществуват мащабни публикувани проучвания, които ги определят като по-скоро неутрални към белтъчната структура и функция.

5.1.4.1. Рекурентни варианти с вероятно непатогенен ефект

И трите рекурентни варианти са с промяна на смисъла и се откриват при седем пациенти от изследваната група. Четири пациенти са със суспектна диагноза GEFS+, двама са с ИГЕ/ГТЕ, а един пациент е с изява на FS+.

- **Вариант c.806G>C, p.Arg27Thr, rs121917906**

Молекулният вариант c.806G>C, p.Arg27Thr, rs121917906 беше открит при три пациенти от изследваната група - EP516, EP550 и EP553. Пациенти EP516 и EP553 са с диагноза GEFS+ синдром, докато EP550 е с данни за непровокирани пристъпи и без ефект от настоящото лечение. При него единствено има данни за фамилна обремененост, но при нито един от пациентите не разполагахме с материал от родителите за извършване на сегрегационен анализ. В предишни проучвания вариантът rs121917906 е идентифициран при пациент отново с GEFS+ синдром, унаследил го от клинично здрав родител (58). Докладван е и при случай на DS, но с допълнително идентифициран втори патогенен вариант в *SCN1A* гена (258).

Вариантът p.Arg27Thr фигурира в базата-данни ExAc, където е намерен в 14 от 121404 хетерозиготни носителя. В базата-данни ClinVar е класифициран като вариант с неясно клинично значение. В допълнение, заменената АК се намира в ниско-консервативен район от последователността на белтъка (27). *In silico* програмите дават противоречиви оценки относно ефекта на замяната върху белтъчната структура (Резултати, Таблица 23), като го определят като по-скоро бенигнен. Поради факта, че замяната е полуконсервативна е възможно мутантната АК да промени вторичната структура на белтъка, а оттук и функциите му.

- **Вариант c.1625G>A, p.Arg542Gln, rs121918817**

Вариантът rs121918817 беше открит при двама пациенти от нашата група – EP420 и EP512 с диагнози FS+ и ИГЕ, съответно. При семейство 420 той сегрегира с клиничния фенотип в семейството, докато при семейство 512 не беше открит при засегнатите родственици (Резултати, Фигура 26Б, В). В литературата е докладван при семейство с аутизъм, като се наблюдава непълна пенетрантност - двамата болни сибси унаследили варианта от здрав баща (35). В допълнение, вариантът е докладван и при случаи на ювенилна миоклонична епилепсия (JME) и неподатлива на лечение детска епилепсия (Intractable Childhood Epilepsy - ICE) (45,256).

Вариантът c.1625G>A, p.Arg542Gln показва висока честота в контролни индивиди - намерен е в 186 от 121374 хетерозиготни здрави контроли в ExAc базата-данни. В

допълнение, в ClinVar е класифициран като вариант с по-скоро непатогенен. Предикционните програми дават противоречиви оценки относно ефекта на този вариант върху белтъка (Резултати, Таблица 22).

- **Вариант c.3488C>G, p. Thr1174Ser, rs121918799**

Вариантът c.3488C>G, p.Thr1174Ser беше открит отново при двама пациенти с диагноза GEFS+ от изследваната група – EP482 и EP544. И при двамата има данни за фамилна обремененост, но само при EP544 беше възможно изследване на болните родственици. Сегрегационният анализ при семейство 544 показва, че варианта не сегрегирва с болестния фенотип – не се открива при клинично- засегнатите майка и сестра (Резултати, Фигура 27Б).

По литературни данни, вариантът p.Thr1174Ser е докладван при няколко случая на ювенилна миоклонична и абсансна епилепсия, както и при една контрола (45); случай на миоклонично-астатична епилепсия (Myoclonic astatic Epilepsy - MAE), като варианта е унаследен от здрава майка (241); както и при случай на граничен DS (259). В допълнение, p.Thr1174Ser е намерен в 13 от 1219 пациента с различни форми на епилепсия (Роландова епилепсия, BFNC, CAE, JAE, GEFS+ и други), като се среща с по-висока честота при пациенти, отколкото в здрави контроли - $P = 5.68 \times 10^{-4}$; $OR = 3.08$, 95%-CI: 1.61–5.40, fisher exact test (260).

Съществува хипотеза за връзката между изявата на различни епилептоформени и мигренозни състояния, резултат от мутации с реципрочен ефект (загуба или придобиване на функция) върху Nav1.1. протеина (261,262). Например, вариантът p.Thr1174Ser причинява ефект на загуба на функция, както и придобиване на такава, водейки до изявата както на мигрена, така и на епилепсия в рамките на едно семейство със засегнати пет родственика от три поколения. Трима от членовете му имат фамилна окципитална епилепсия и FS+, а двама родственици от същото семейство са с фамилна хемиплегична мигрена (262). Авторите предлагат хипотезата, че мутации с придобиване на функция в резултат от p.Thr1174Ser мутацията водят до изявата на мигренозно състояние, докато загубата на функция на Nav1.1. белтъка причинява епилептичен фенотип. В допълнение, p.Thr1174Ser е намерен при случай на фамилна хемиплегична мигрена (FHM) в три поколения и случай на DS с аутистични прояви, унаследил варианта от засегнатата майка с изява на мигрена с аура (263,264).

Въпреки това, с натрупването на информация от последните години в бази-данни като ExAc, стана ясно, че варианти като p.Thr1174Ser фигурират с висока честота на срещаемост и при здрави контролни индивиди от общата популация. Вариантът p.Thr1174Ser е открит в 213 от 121350 здрави хетерозиготни носители и 1 хомозиготен такъв. В ClinVar е класифициран като по-скоро непатогенен. Всички използвани предикционни програми го определят като непатогенен (Резултати, Таблица 22). В този смисъл, не може със сигурност да се твърди, че p.Thr1174Ser е генетичната причина за заболяването при пациенти EP482 и EP544.

5.1.4.2. Нерекурентни варианти с вероятно непатогенен ефект

Откритите варианти са два от типа на промяна на смисъла и един вариант, засягащ консервативно място в интрона, участващ в протичането на нормалния сплайсинг на прематричната РНК. Окрити са при един пациент с FS+, един с ИГЕ/ГГЕ и един пациент със съмнение за GEFS+ синдром.

- **Вариант c.1811G>A, p.Arg604His, rs121918769**

Молекулният вариант p.Arg604His бе открит при пациент EP555, момиче на 29 години със съмнение за JME, в комбинация с психически отклонения и фамилни данни за епилепсия - сестра със същата диагноза.

Откритият вариант rs121918769 е описан в няколко изследвания при пациенти с GEFS+ синдром, FS+, DS, JME и MAE. Мутацията е намерена и при асимптоматични здрави родственици на пациентите (45,55,247,265,266), което се дължи вероятно на непълната пенетрантност на заболяването. В допълнение, rs121918769 фигурира в ExAC базата-данни, където е намерен в 188 от 121380 здрави хетерозиготни носителя и 3 хомозиготни такива. Този вариант е класифициран в ClinVar като по-скоро непатогенен. Предикционните програми дават противоречиви оценки за ефекта върху белтъка (Резултати, Таблица 22).

Вариантът не сегрегира с болестния фенотип в семейството - унаследен е от здрав баща и не се открива при болна сестра (Резултати, Фигура 28). Предвид този факт, е очевидно, че наличието на този вариант не е достатъчна причина за изява на епилептичния фенотип в комбинация с психиатрични проблеми при EP555. Възможно е наличието на допълнителна мутация в друг/и ген/и, свързани с генерирането и предаването на нервния импулс, които биха могли да се открият чрез използването на по-широко обхванет метод, какъвто е таргетното екзомно секвениране.

Заменената АК се намира в ниско консервативната цитоплазмена бримка, свързваща домени DI и DII на белтъка (Фигура 51). Този факт, както и посочените по-горе наблюдения ни дадоха основание да класифицираме варианта p.Arg604His като такъв с по-скоро непатогенен ефект.

- **Вариант c.5749C>G, p.Arg1928Gly, rs121917956**

Вариантът p.Arg1928Gly беше открит при пациент EP513 със съмнение за GEFS+ синдром. Докладван е при случаи на GEFS+ и DS синдроми, както и случай на спорадична хемиплегична мигрена (267-269). Въпреки това, той е намерен и в здрави контролни индивиди (247,267), като през последните години бе намерен и публикуван в 173 от 121210 здрави хетерозиготни носители и 2 хомозиготни такива в ExAC. В допълнение, rs121917956 е класифициран в ClinVar като вариант с по-скоро непатогенен ефект.

Предикционните програми също го определят като неутрален за ефекта върху белтъчната структура и функция (Резултати, Таблица 22). В допълнение, замяната p.Arg1928Gly се намира в ниско консервативния C-краен домен от белтъка (Фигура 51).

Описаните дотук варианти с промяна на смисъла и вероятно непатогенен ефект (рекурентни и нерекурентни) се срещат с висока честота в ExAc базата-данни и предикционните програми дават противоречиви резултати относно ефекта им върху белтъчната структура. Всички варианти не сегрегират с болестния фенотип в поне едно от изследваните семейства, където беше възможно провеждането на сегрегационен анализ. В допълнение, никъде не е извършен функционален анализ за оценка на техния ефект върху функциите на белтъка, освен при вариант p.Thr1174Ser (262). По отношение на p.Thr1174Ser, Lal и съавтори го класифицират като рисков фактор за развитие на епилепсия (260), но предикционните програми го определят като бенигнен полиморфизъм и в нашето проучване той е унаследен от здрав родственик в едно семейство. Освен това, нито един от дотук описаните варианти не е локализиран в трансмембранен район от протеина, където мутации са асоциирани със значително по-тежки дисфункции на канала, а всички те се откриват в ниско-консервативни райони от белтъка (270).

Базирайки се на информацията от литературните източници и бази-данни, на резултите от *in silico* и сегрегационните анализи, както и според препоръките за класификация на вариантите от ACMG (230), ние класифицирахме тези варианти като такива с вероятно непатогенен ефект.

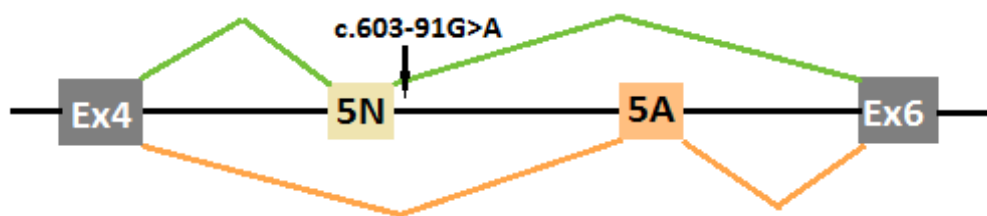
- **Вариант c.603-91G>A, rs3812718, CS096242 при пациент EP477**

Молекулният вариант c.603-91G>A засяга AG динуклеотид, участващ като донорно сплайс-място, необходимо за алтернативния сплайсинг на иРНК. Беше открит при пациент EP477 с диагноза FS+ и фамилна обремененост - баща със изява на FS+ и текущо антиконвулсантно лечение. Вариантът не сегрегира с болестния фенотип в семейството – присъства при клинично-здравата майка и в хомозиготно състояние при здравия брат (Резултати, Фигура 30). Фигурира с висока честота в 1000G базата-данни.

Този полиморфизъм е разположен във високо консервативно донорно сплайс-място, необходимо за алтернативния сплайсинг на *SCN1A* транскрипта, експресиран предимно във фетуса (Фигура 61, екзон 5N) (271). Мутантният алел А нарушава консенсусното място, необходимо за сплайсинга на феталния екзон 5N (Фигура 61), редуцирайки по този начин неговата експресия в сравнение с експресията на екзон 5А, характерен за възрастни индивиди. Установено е, че при индивиди, носещи GG генотип, неонаталната форма на транскрипта се среща в до 50% от общото количество транскрипти в клетката, докато при индивиди с генотип AA нивата на 5N са почти неоткриваеми (273). От функционална гледна точка, екзоните 5N и 5А показват различни фармакологични свойства и е установено, че при пациенти с епилепсия, носещи вариант c.603-91G>A е необходима по-висока доза от антиконвулсантите фенитоин и карбамазепин (271,272).

Първоначално вариантът е асоцииран с повишен риск от развитие на FS+ по кодоминантен модел, като носителството на един А алел води до по-нисък риск от развитието на FS+, в сравнение с наличието на 2 мутантни А алела (242). Други автори, изследвайки австралийска кохорта пациенти и контроли, не потвърждават наблюденията на Schlachter и съавтори, намирайки варианта в значителен брой здрави контролни индивиди без епилепсия (243).

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



Фигура 61. Схема на екзони 4, 5 и 6 от *SCN1A* гена с показани две възможности за алтернативен сплайсинг: транскрипт 5A, срещащ се главно при възрастни (оранжев вариант на екзон 5) и неонатален транскрипт 5N (жълт вариант на екзон 5). Със стрелка е посочена позицията на с.603-91G>A варианта, повлияващ алтернативния сплайсинг на *SCN1A* в предматричната РНК.

5.2. Обсъждане на резултатите от секвенционния анализ на *SLC2A1* гена

В резултат от анализа чрез директно секвениране по Sanger на *SLC2A1* гена установихме два нови, неописани досега точкови варианти при двама пациенти от изследваната кохорта (4.8%). Единият вариант представлява мутация, водеща до прекъсване на рамката на четене (p.Glu360Ter), а другият е замяна с промяна на смисъла (p.His160Glu).

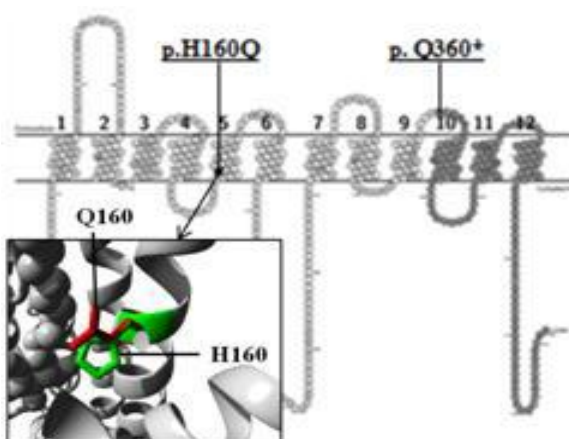
- **Вариант с прекъсване на рамката на четене с.1078C>T, p.Glu360Ter**

Вариантът с прекъсване на рамката на четене p.Glu360Ter бе установен при изолиран случай с миоклонично–астатични и атонични пристъпи с начало в ранна детска възраст и забавено невропсихично и моторно развитие. Сегрегационният анализ в семейство 162 показва, че мутацията p.Glu360Ter е възникнала *de novo* (Резултати, Фигура 32Б).

Молекулният вариант е нов, неописан досега в литературата. Резултат от него е превръщането на глутамин в позиция 360 в стоп-кодон (CAG→ TAG). До този момент са

докладвани 15 мутации, водещи до образуването на предварителен стоп-кодон в кодиращата последователност на *SLC2A1* (92,95,96,106,274-279). Клиничната картина при всяка една от тях е свързана с тежки форми на синдром на GLUT1 дефицит. Счита се, че подобен вид мутации водят до синтеза на нефункционален протеин, който бива разграден от клетъчните системи и следователно до загуба на белтъчна функция.

Молекулният дефект p.Glu360Ter с голяма вероятност елиминира последните три трансмембрани домена, както и цитоплазмения домен от АК секвенция на GLUT1 белтъка (Фигура 62). Това би могло да доведе до преждевременна деградация на белтъка и намаляване на концентрацията му с 50%, което по автозомно-доминантен механизъм води до недостатъчен продукт за изпълняване на нормална функция и следователно патологичен ефект (280).



Фигура 62. Топология на белтъка GLUT1 с разположение на намерените мутации при пациенти EP162 И EP219. Потъмнената част от GLUT1 белтъка е тази, която не се синтезира в резултат от p.Glu360Ter мутацията. 3D- изображение на пространственото разположение на дивия тип АК - хистидин и мутантната АК глутамин в позиция 160 от структурата на TM5 домена. Генерирано посредством HOPE проект чрез използване на PDB файл 4PYP (<http://www.cmbi.ru.nl/hope>).

- **Вариант с промяна на смисъла c.480C>A, p.His160Gln**

Вариантът представлява нуклеотидна замяна на цитозин с аденин, която води до замяната на хистидин в позиция 160 с глутамин (p.His160Gln) в петия трансмембранен домен (TM5) на GLUT1 протеина (Фигура 62). Предиктивната програма Mutation taster я определя като болестотворна мутация, а включения в нея сравнителен анализ с ортоложни протеини показва, че аминокиселината His160 се намира в консервативен участък и е съхранена в хода на еволюцията на гръбначните (Резултати, Фигура 31B).

Пространствената структура на мутантния и нативния GLUT1 протеин показва, че засегнатата АК His160 е част от хидрофобната α -спирална част на канала, като заменената АК глутамин е леко изместена в сравнение с дивият тип His160 АК остатък (Фигура 62). Мутацията p.His160Gln се намира в TM5 (пети трансмембранен домен), един от

амфипатичните домени, участващи във формирането на пората, през която преминава глюкозата в клетката (281,282). Засегнатата АК хистидин изглежда, че е от важно значение за функцията на канала, тъй като замяната ѝ с цистеин води до умерена редукция на активността на транспортиране на глюкоза през GLUT1 канала (281,283). Предишни симулационни проучвания показват, че р.His160 формира водородна връзка с глюкозната молекула и това взаимодействие е в съответствие с специфичното разстояние между реакционните групи на двете молекули (280,282). Проведеният от нас 3D анализ показва, че мутантната АК глутамин не заема коректна позиция в структурата на α -спиралата, за да осигури правилна структура на глюкозната пора. Глутаминът има по-малък в пространствено отношение радикал, сравнен с дивия тип хистидин и няма заряд (Фигура 62). В този смисъл е възможно да се възпрепятства формирането на Н-връзка и загуба на свързване с лиганда.

Съвкупността от всички тези факти ни даде основание да приемем, че това е генетичната причина за заболяването при пациент EP219. Все пак, необходимо е ефекта на мутантната АК да бъде проверен и в моделни системи чрез извършване на функционален анализ на клетъчно или организмено ниво, или на ниво матрична РНК.

В настоящото проучване ние открихме генетичната причина за заболяването при двама пациенти с абсансни епилепсии (4.8%) – един пациент с CAE и един пациент с GLUT1 DS. По литературни данни при около 1-12% от пациентите с различни форми на абсансни епилепсии се откриват мутации в *SLC2A1* гена (17,102,105,284). Тази честота на откриваемост варира в значителна степен, тъй като се наблюдава голяма хетерогенност на изява на заболяването не само при различните абсансни епилепсии, а дори само в рамките на GLUT1 DS.

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

5.3. Обсъждане на резултатите от секвенционния анализ на *KCNQ2* гена

В резултат от секвенирането на *KCNQ2* гена при 15 пациента със съмнение за BFNC открихме два точкови варианта при двама пациента от изследваната група (13.3%). Единият е нов, непубликуван досега сплайс - акцепторен вариант (с.1525-2A>G), а другият представлява известна мутация с промяна на смисъла (с.998G>A, р.Arg333Gln). И двата варианта се откриват при фамилни случаи на бенигнени неонатални конвулсии.

- **Вариант с.1525-2A>G в семейство 417**

Нуклеотидната замяна с.1525-2A>G представлява нов генетичен вариант, тъй като не бе открит при скринирането на секвенционните бази - данни. Установен е при фамилен случай на BFNC и вероятно представлява болестотворна мутация, тъй като сегрегира с клиничния фенотип в изследваното семейство (Резултати, Фигура 30). Той разрушава канонична сплайс-последователност AG в 3'-края на интрон 13, необходима за протичането на нормалния сплайсинг по време на зрееенето на матричната РНК. Анализът на секвенцията в обсег от 250 бдв около мутирания нуклеотид с помощта на предикционния софтуер NetGene2 показва, че съществува 95% вероятност за използване на първия алтернативен AG нуклеотид, разположен навътре в екзон 14 (Фигура 63).

NetGene2:

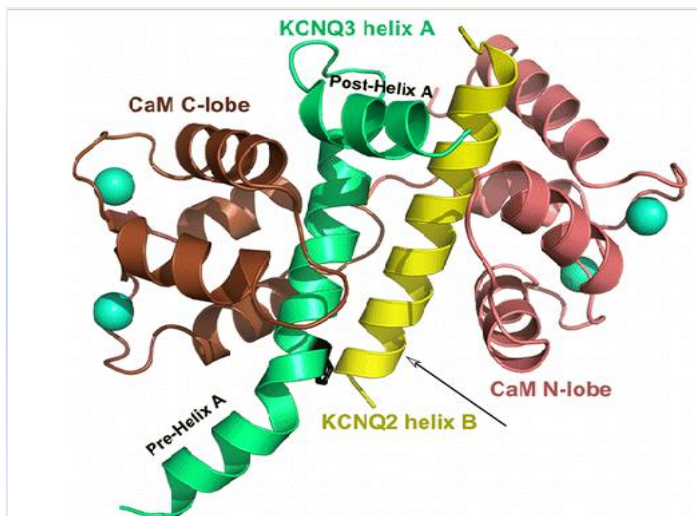
pos	5'→3'	phase	strand	confidence	5'	intron	exon	3'
66	0	+		0.00	TGCCCTGCAG	^	GACCCCGGA	
130	1	+		0.95	CCCCCGGAAG	^	CAAGCCTCC	
134	2	+		0.43	CGGAAGCAAG	^	CCTCCCGGA	
145	1	+		0.34	CTCCCGGAG	^	AGGACATTGT	
147	0	+		0.34	CCCGGAGAG	^	GACATTGTG	
165	0	+		0.07	GGATGACAAG	^	AGCTGCCCT	
167	2	+		0.07	ATGACAAGAG	^	CTGCCCTGC	

Фигура 63. Анализ на вероятните канонични сплайс-места в близост до интрон-екзонната граница интрон 13/екзон 14 с помощта на предиктивния софтуер NetGene2

Това би довело до делеция на една АК (с.1526_1528delAAG; p.Glu508del) в С-терминалния домен на Kv7.2 белтъка. Този домен се състои от два спираловидни мотива, които, заедно със съответстващите си мотиви от Kv7.3 белтъка в рамките на хетеротетрамерната структура на канала, взаимодействат с модулатори на активността му, какъвто е калмодулина - CaM (Фигура 64), (285). Делецията е локализирана във втория взаимодействащ с CaM мотив или спирала В (АК 501-529), (Фигура 64), (286).

Друго вероятно последствие от сплайс-мутацията с.1525-2A>G е използването на сплайс-акцепторното място на някой от съседните интрони, което би довело до пропускане на един или няколко екзона (exon skipping), последващо активиране на процеса на нонсенс - медираното разрушаване на матричната РНК и в крайна сметка непродуктивна трансляция на интактен белтък. Подобна сплайс-място мутация, засягаща съседен интрон (IVS15-2A>G), класифицирана като патогенна е намерена при спорадичен случай на BFNC (75). И в двата случая е необходимо да се докаже наличието на аберантен сплайс-продукт на ниво РНК за потвърждаване на патологичния ефект на мутацията с.1525-2A>G.

Установяването на ефекта на мутацията с.1525-2A>G върху функцията на Kv7.2/Kv7.3 хетеротетрамерния канал изисква експресия на аберантния Kv7.2 протеин в клетъчни системи. Такъв анализ се извършва в специализирани лаборатории, изисква повече време и представлява обект на самостоятелно проучване, поради което би могъл да бъде предмет на бъдещ проект.

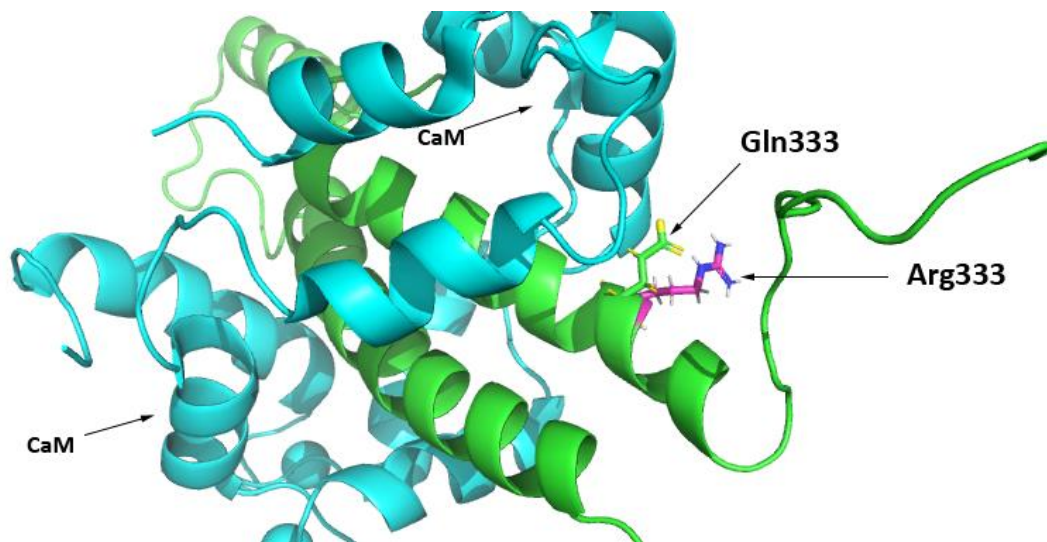


Фигура 64. Кристалографска структура на хетеротетрамера Kv7.2 и Kv7.3 показваща С- терминалните проксимални домени на продуктите на *KCNQ2* и *KCNQ3* гените, които взаимодействат с калмодулина. Тези домени са отговорни за модулиране активността на канала. Жълтата спирала, изградена от АК 501-529 е Kv7.2 мотивът, където би могло да се намира p.Glu508del делецията (позиция 508). Адаптирана от Strulovich et al., 2016 (287).

- **Вариант c.998G>A, p.Arg333Gln, CM033391 при семейство 253**

Молекулният вариант p.Arg333Gln води до замяната на аргинин в кодон 333 от белтъка с АК глутамин (CGG→CAG) от кодиращата последователност. Вариантът беше открит при фамилен случай на BFNC с последваща еволюция в Роландова епилепсия. Вариантът p.Arg333Gln е бил установен в предишно проучване при фамилен случай на BFNC, без по-късни усложнения (288). Неговият ефект върху функцията на калиевия канал е изследван експериментално, чрез експресия на хетеротетрамерния комплекс Kv7.2/Kv7.3 в овоцити от *Xenopus laevis*. Изследването е показало, че p.Arg333Gln води до относително слаба редукция в калиевия ток (<50%) в сравнение с дивия тип K⁺ канал (288).

Заменената аминокиселина се намира в проксималната част на С-терминалния регион от Kv7.2 протеина. Този регион е разположен интрацелуларно и участва в регулацията на K⁺-канал, при което взаимодейства с аксесорни молекули, една от които е СаМ. Дивият тип АК аргинин 333 се намира в единия от двата консервативни мотива, участващи във взаимодействието с СаМ (АК 321–358). Замената АК глутамин се различава по размер и заряд от дивият тип АК - аргинин. Глутаминът е по-малка и неполярна АК, за разлика от аргинин 333, която е по-голяма и положително заредена (Фигура 65). В този смисъл, зарядът на АК се губи, поради невъзможност за свързване с СаМ, което води до намалена активност на калиевия канал (285,286).



Фигура 65. 3D- изображение на пространственото разположение на дивия тип АК - аргинин и мутантната АК глутамин в позиция 333 от структурата на Kv7.2 белтъка. Генерирано посредством Rymol софтуер чрез използване на PDB файл 6FEG (<https://pymol.org/>).

Досега съществуват само три случая на пациенти с BFNC, които развиват впоследствие BECTS (289-291). Двама сиблинги с изява на BFNC, еволюираща в BECTS носят nonsense мутация (с.967C>T, p.Gln323Ter), локализирана в същия CaM- свързващ мотив, както мутацията в нашия случай (289). Еднобазова делеция с изместване на рамката на четене (с.2043delT) в *KCNQ2* гена е описана във фамилен случай на BFNC от италиански произход, като пробандът впоследствие развива BECTS на 3-годишна възраст по време на сън (290). Третият описан в литературата подобен случай е на момиче от японски произход с *de novo* хетерозиготна делеция (с.910-2delTTC или TTT, Phe304del), засягаща шестия трансмембранен домен на Kv7.2 протеина (291).

В нашето изследване, мутацията p.Arg333Gln бе намерена при фамилен случай на BFNC. Тя сегрегира с болестния фенотип в семейството (Резултати, Фигура 34Б). Индексният пациент обаче, впоследствие развива Роландова епилепсия (Бенигна детска епилепсия с центро темпорални пики- BECTS). Наблюдаваната клинична хетерогенност при пациент EP253 (по-късно начало на пристъпите и диагноза BFNIS), сравнена със старта на пристъпите при засегнатите родственици, както и докладваните в литературата случаи, би могла да се дължи на допълнителни генетични фактори при индексния пациент, като например наличието на модифицираща мутация в друг ген.

При секвенционният анализ на *KCNQ2* гена не бяха установени други молекулни варианти, които биха могли да доведат до промяна в първичната структура на протеина Kv7.2. Наличието на комплициран клиничен фенотип при индексния пациент би могло да се дължи и на комплементарна мутация в ген *KCNQ3*, предвид участието му във формирането на калиевия канал заедно с *KCNQ2*. За изясняването на този случай би било информативно да се изследва ген *KCNQ3* за наличие на друга мутация. Установяването на генетичната причина за клиничното усложнение при единствения пациент с Роландова епилепсия в семейството ще изясни връзката генотип - фенотип в този случай.

5.4. Обсъждане на резултатите от MLPA анализа на *SCN1A*, *SLC2A1* и *KCNQ2* гените

5.4.1. Обсъждане на резултатите от MLPA анализа на *SCN1A* гена

В резултат от MLPA анализа на пет пациенти със съмнение за класически DS и 15 пациенти ИГЕ/ГГЕ, всички негативни за точкови мутации в *SCN1A* гена, не успяхме да намерим екзонни или цялостно-генни *SCN1A* делеции. По литературни данни, между 2-27% от DS случаите се дължат на делеции и амплификации на *SCN1A* гена (51,53,54), като в случаите на по-големи засегнати райони от хромозомите, включващи допълнителни гени освен *SCN1A*, се наблюдават и допълнителни синдромни черти, като ИД, аутизъм и лицеви дисморфизми (67). По-леките форми епилепсия от GEFS+ спектъра са резултат предимно от *SCN1A* точкови missense мутации, където абератното копие се запазва, макар и с променена функция (27,57,59). В нашето проучване ние включихме само пет пациенти със съмнение за DS, а останалите пациенти бяха с по-леки форми на ГГЕ или съмнение за GEFS+ синдром. Неоткриването на патогенни CNVs в нашето проучване отчасти се дължи на малката извадка, която тествахме (n=15), в частност броя пациенти с DS (n=5), а от друга страна включването на случаи с ИГЕ/ГГЕ (n=10), където процентът на откриваемост на *SCN1A* CNVs е много нисък.

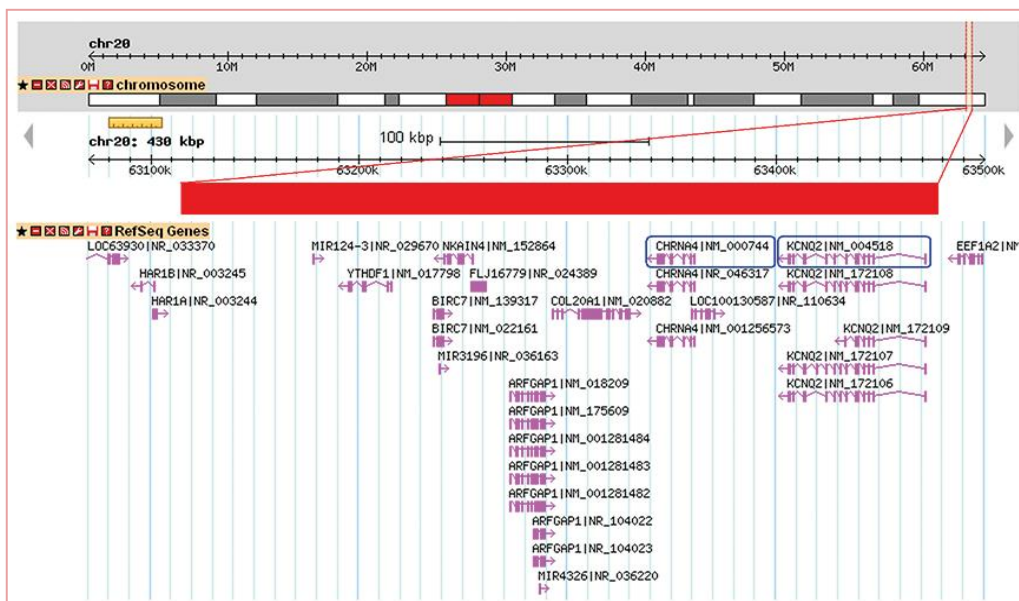
5.4.2. Обсъждане на резултатите от MLPA анализа на *SLC2A1* гена

В резултат от MLPA анализа при 13 пациенти със съмнение за GLUT1 DS (наличие на абсансни пристъпи с ИД) и отсъствие на точкови мутации в *SLC2A1* гена, не успяхме да идентифицираме патогенни копийни варианти, засягащи част или целия *SLC2A1* ген. Това вероятно се дължи отчасти на малката извадка (n=13), а от друга страна на хетерогенността на изява на заболяването, което често наподобява множество синдромни състояния, включващи най-честите симптоми на GLUT1 DS. Освен това, спектърът на инtragenни делеции или делеции на целия *SLC2A1* ген е значително по-малък (11-14%), сравнен с процента на точкови мутации като причина за изява на този синдром (70-80%) (95,101,106). За детекцията на патогенни копийни варианти чрез MLPA е необходимо разширяване на извадката с по-прецизно клинично-охарактеризирани пациенти.

5.4.3. Обсъждане на резултатите от MLPA анализа на *KCNQ2* гена

В резултат от MLPA анализа на *KCNQ2* гена открихме хетерозиготна цялостно-генна делеция на *KCNQ2* гена при пациент EP383 - спорадичен случай с изява на BFNC. Тъй като делецията засяга сонда на ген *CHRNA4*, разположен в 3'-посока спрямо ген *KCNQ2* (Резултати, Фигура 35A), заключихме че тя е с по-голям размер и обхваща не само *KCNQ2* гена. За установяване на нейните граници проведохме хромозомен микрочипов анализ чрез метода на сравнителната геномна хибридизация (aCGH). Анализът aCGH

показа, че делецията е с размер 411 Кб и включва 8 OMIM гена (610557, 610556, 616529, 615737, 612873, 608377, 118504, 602235), от които два са свързани с епилептичен фенотип: *KCNQ2* и *CHRNA4* (Фигура 66).



Фигура 66. Генно съдържание на делетирания регион в 20q13.33 при пациент 383. Червеният правоъгълник показва обхвата на делецията. Оградените гени са с потенциална роля в епилептичния фенотип на пациент 383. Взята и модифицирана от DGV (<https://www.dgv.tcag.ca>)

Генът *CHRNA4* кодира субединицата на α -невроналният ацетилхолинов рецептор (OMIM: 118504). Досега са известни само “missense” и инсерционни мутации, засягащи този ген и асоциирани с автозомно доминантна епилепсия на фронталния лоб (ADNFLE). Няма пряко доказателство за делеции в *CHRNA4*, свързани с епилептичен фенотип. От друга страна, редица прекъсващи рамката на четене мутации в ген *KCNQ2* водят до типичната клинична изява на BFNC. Подобни на откритата при нас делеции с различни размери, обхващащи гените *KCNQ2* и *CHRNA4*, са съобщени в няколко други изследвания и показват, че в случаите, когато делецията в 20q13.3 е ограничена само до двата гена *KCNQ2* и *CHRNA4*, се наблюдава изява на класически BFNC (67,81,292). В допълнение, пълно изключване на *CHRNA4* гена при мишки ($\alpha 4^{-/-}$ нокаут мишки) не води до епилептични пристъпи (293). Клиничните характеристики на нашия пациент наподобяват типични BFNC, което предполага, че болестния фенотип не се дължи на хаплоинсуфициенция на *CHRNA4*.

Редица автори съобщават, че при по-тежките случаи на епилепсия в комбинация с изоставане в психомоторното развитие, дисморфизми и поведенчески проблеми са открити много по-големи делеции (520 КБ - 6.8 МБ) засягащи регион 20q13.33 и включващи повече гени, въпреки че механизмите, водещи до атипичната им клинична изява са все още неизвестни (294-297). Обратно, при пациенти с по-малък размер делеции, засягащи *KCNQ2* и *CHRNA4* гените, фенотипът е типичен BFNC (67,292). В този смисъл, размерът и

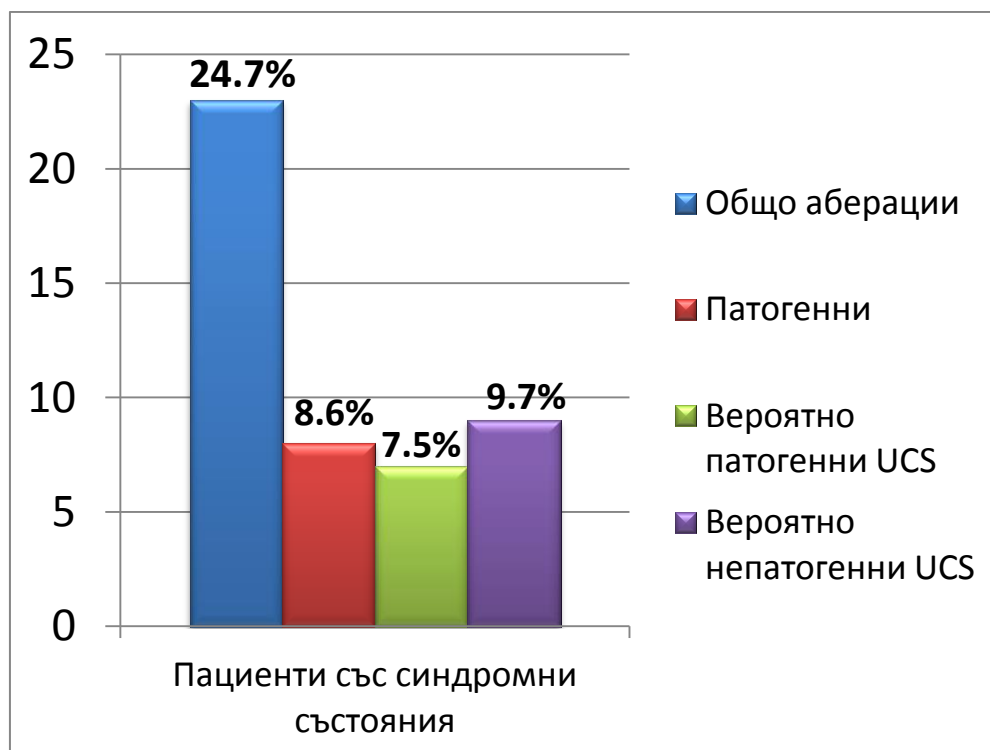
локализацията на делецията в 20q13.33, засягаща *KCNQ2* при нашия пациент, както и клиничните му характеристики са в съответствие с хипотезата, че делеции на двата гена *KCNQ2* и *CHRNA4* не водят до допълнителни разстройства в невропсихическото развитие (67,297). В настоящия момент момичето е само на 1-годишна възраст и въпреки липсата на пристъпи и допълнителни невропсихически проблеми, е необходимо наблюдението ѝ с оглед появата на такива на един по-късен етап от развитието.

Настоящото проучване доведе до установяване на молекулни дефекти в три от 13 случая на BFNC (16,6%). Този диагностичен добив е по-малък, отколкото съобщения по литературни данни (25,81). Това може да се дължи на малката извадка от класически BFNC случаи (n=13), които подбрахме за изследване. При недиагностицираните пациенти е възможно да са засегнати други гени, асоциирани с изява BFNC фенотип. Например, *SCN2A* и *KCNQ3* гените се явяват рядка причина за развитие на BFNC (81,85). Все пак, използването на два различни подхода - директно секвениране и MLPA анализ, при едно и също заболяване показва, че двата метода могат да покрият целия спектър на мутации в *KCNQ2* гена, отговорни за изявата на тези електро-клинични състояния.

5.5. Обсъждане на резултатите от микрочиповия анализ

В резултат от проведения хромозомен микрочипов анализ чрез метода на сравнителна геномна хибридизация (aCGH) ние анализирахме общо 93 пациенти, показващи по-тежък фенотип, включващ ИД, изоставане в психомоторното развитие и други вродени аномалии в комбинация с епилептичните пристъпи. Чрез метода на aCGH открихме 8 патогенни микроаберации, позволяващи да се постави генетичната диагноза при 8.6% от пациентите в изследваната група. Вероятно патогенни CNVs, неасоциирани с известен синдром, но от потенциален интерес за бъдещи проучвания бяха намерени при седем пациента (7.5%). Така микрочиповият анализ даде общ диагностичен добив от 15.1% в изследваната група пациенти (Фигура 67).

Настоящият дисертационен труд представлява първата оценка чрез геномен микрочипов анализ на кохорта от пациенти с епилепсия и допълнителни невропсихиатрични проблеми в рамките на нашата страна. Преди това, две работни групи провеждат подобно проучване при група пациенти с болести от аутистичния спектър, вродени аномалии и забавяне в развитието, но без данни за епилептични пристъпи (298,299). Досега са открити микроделеции при два изолирани случая на български пациенти с ИГЕ/ГГЕ, засягащи отделни части от *SCN1A* гена, идентифицирани чрез други методи (300,396). Друго българско проучване цели таргетно изследване на няколко гена, свързани с изявата на ГГЕ и ИД, както и търсене на CNVs чрез MLPA анализ в 15q13.3 района при пациенти с различни форми на ЕЕ в комбинация с ИД (301,394).



Фигура 67. Честота на откриваемост на CNVs от провеждането на микрочипов анализ при 93 пациенти със синдромни състояния, включващи епилепсия, ИД и вродени аномалии.

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

В нашето проучване подбрахме пациентите си на базата на два основни критерия: непровокирани епилептични пристъпи и ИД. Част от тях показват допълнителни поведенчески и моторни нарушения, както и общи и лицеви дисморфизми. Някои от пациентите бяха предварително скринирани за наличие на точкови мутации или малки инсерции/делеции в *SCN1A*, с оглед на наподобяващия клиничен фенотип на ГГЕ от спектъра на GEFS+ синдрома. При друга част от пациентите проведехме секвениране и MLPA анализи на *SLC2A1* гена с цел да се изключи хетерогенната епилептична енцефалопатия GLUT1 DS (Резултати, Таблица 23). Наблюденият диагностичен добив от микрочиповия анализ (8.6%) е в съответствие с този, докладван по литературни данни в кохорти пациенти с епилепсия, изоставане в развитието/ИД (218,302), пациенти със симптоматична епилепсия и мозъчни аномалии (212,303), както и кохорти с генетична генерализирана епилепсия (ГГЕ), епилептични енцефалопатии в комбинация с ИД

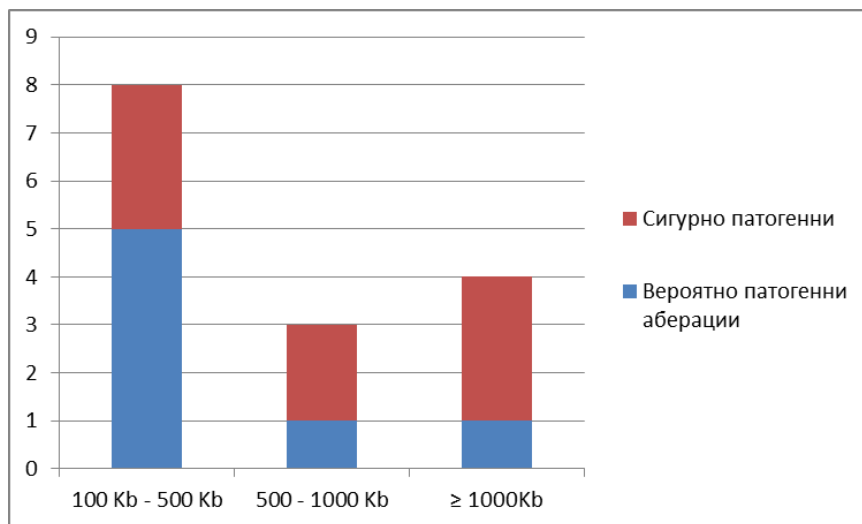
(119,122,219). Подобно на нашата група, тези пациенти са подбрани без предварително проведен кариотипен анализ за изключването на големи геномни пренареждания и използването на строги критерии за селекция. Въпреки това, някои изследователски групи използват по-строги критерии, които са дефинирани от конкретната лаборатория (304,305), а други (306,307) използват de Vries стойността за определяне на селекционни параметри (308). Очевидното при резултатите от тези проучвания е, че диагностичните добиви са съизмерими едни с други, когато са приложени еднакви или сходни подходи за подбиране на пациентите. При всички тях диагностичният добив е значително по-висок, сравнен с този в настоящото проучване (между 12% и 28%).

В допълнение, други работни групи използват филтър на преселекция на пациентите си чрез предварителното им скриниране за големи и добре охарактеризирани геномни пренареждания, използвайки методи като кариотипен анализ или MLPA (309-312). При всички тях отново се наблюдават сходни диагностични добиви, по-високи от наблюдавания при нашата кохорта (между 11% и 15.6%). В нашият случай бяха изключени пациентите, които имат точкови мутации в двата гореспоменати гени, но не беше проведен кариотипен анализ. Въпреки това се оказва, че диагностичният добив на настоящо-изследваната група е почти еднакъв с този, наблюдаван при пациенти с ГГЕ, епилепсия с ИД (119,122 - 8.9% и 7.9% съответно) или изолиран ИД (313 – 10% с доверителен интервал 8-12%). Сравнителният анализ между отделните проучвания води до заключението, че основният фактор, повлияващ наблюдаваната честота на откриваемост на патогенни варианти в текущото проучване са сравнително свободните критерии на селекция, които приложихме, както и критериите за класификация на намерените варианти. Тук ние съобщаваме само патогенните и вероятно патогенните варианти, определени като такива съгласно препоръките на ACMG за класификация на вариации в броя копия (CNVs) (229).

Следователно, за сравнителни изследвания, както и за целите на клиничната практика е важно да се създадат универсални критерии за селекция на групи пациенти със сходен клиничен фенотип, както и критерии за класификация и интерпретация на клинично-значими CNVs. Тъй като някои от идентифицираните CNVs са описани в предишни проучвания при случаи с различна степен на забавяне в развитието, в настоящия дисертационен труд се описват случаите на патогенни аберации (8/15 аберации), обсъжда се потенциалната патогенност на вероятно патогенните CNVs (7/15 аберации) и се прави анализ на връзката генотип-фенотип. Някои от намерените CNVs биха могли да повлияват фенотипа според хипотезата на двойния удар, предложена първоначално от Girirajan и съавтори (169). Микрочиповият анализ доведе до откритието на една нова, недокладвана делеция в район 15q22.31 с размер 1.32 Mb (Фигура 82), засягаща потенциален кандидат – ген за епилепсия и ИД - *CSNK1G1* (OMIM: 606274), вероятно асоцииран с калциевия метаболизъм в мозъка (214). В допълнение, идентифицирахме дупликация, засягаща целия *APBA2* ген, която сегрегира с болестния фенотип в три поколения на семейство с

епилепсия и ИД (Фигура 81), преди описана само при случаи на шизофрения и аутизъм (298,314).

В резултат от проведения микрочипов анализ бяха открити общо 15 аберации, осем от които са патогенни, а седем са с неясна клинична значимост и вероятно патогенен ефект. Аберациите с патогенен и вероятно патогенен ефект засягат 9 хромозоми (хромозоми 1, 2, 6, 7, 9, 10, 15, 16, 17). При хромозома 1 се засяга късото рамо при двама пациенти в различни хромозомни райони (1p36.33 и 1p34.2). При хромозоми 2 и 15 се засяга дългото рамо общо при пет пациенти (двама пациенти с аберация в райони 2q24.3q31.1 и 2q24.1q24.3; трима пациенти с аберация в райони 15q13.3, 15q13.1 и 15q22.31). При хромозоми 6 и 7 се засягат съответно късо и дълго рамо при двама пациенти за всяка хромозома (двама пациенти с аберация в райони 6p25.1 и 6q26; двама пациенти с аберация в райони 7p22.3 и 7q31.1). Останалите засегнати райони се установяват при единични пациенти от изследваната група (Резултати, Таблица 24). Дванадесет от установените аберации са интерстициални, а три засягат терминални сегменти от хромозомите (Фигура 68). Четири CNVs засягат частично или цялостно единичен ген, а 11 аберации засягат два или повече гени. По отношение на размера на засегнатия фрагмент: с размер между 100 и 500 Kb са осем аберации, три от които патогенни. С размер от 500 до 1000 Kb са общо три аберации, две от които са патогенни. С размер над 1000 Kb са четири CNVs, три от които са патогенни (Фигура 68).



Фигура 68. Разпределение на откритите аберации чрез aCGH според размера и класификацията.



Фигура 69. Хромозомно разпределение на откритите патогенни и вероятно патогенни хромозомни микробрерации при 13 пациента. Маркираните с **червено** са делеции, а със **зелено** – дупликации.

5.5.1. Патогенни хромозомни микробрерации

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

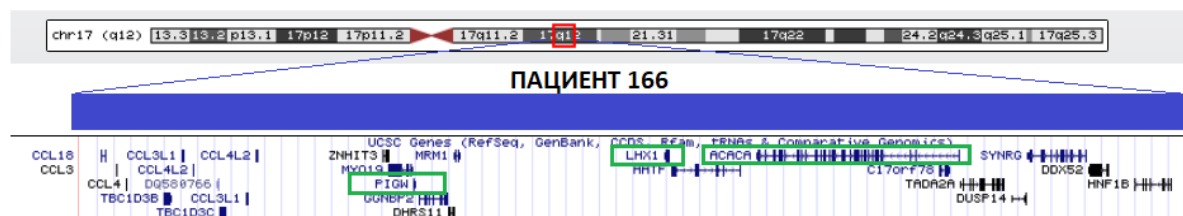
Дупликацията бе намерена при момиче с епилепсия, лек ИД и поведенчески проблеми. Тя присъства и при сестрата на пробанда, също с изява на епилептични пристъпи (Резултати, EP166, Фигура 37Б). Дуплицираният район в регион 17q12 е с размер 1.856 Mb. Засегнати са 33 UCSC гена, 22 от които са OMIM гени (OMIM: 60375, 182283, 182284, 609468, 603782, 610757, 601395, 610809, 610144, 604500, 617379, 610275, 612275, 616159, 601999, 608463, 200350, 602276, 606618, 607291, 612500, 189907). Структурни реорганизации в този регион са асоциирани с 17q12 микроделеционен/дупликационен синдром (OMIM:614526; 614527). Големината на засегнатия участък при тези синдроми варира от 1Mb до 2.5Mb. По отношение на 17q12 дупликационния синдром, най-типичните клинични черти, характерни за него са интелектуален дефицит, поведенчески проблеми, както и забавяне в развитието на речта и моториката. Всички те присъстват при пациент EP166.

Част от гените, засегнати от дупликацията могат да имат потенциална роля в невропсихиатричния фенотип, наблюдаващ се в нашия случай (Фигура 70). Генът *LHX1* (OMIM: 601999) кодира хомеодомейн транскрипционен фактор, участващ в развитието на нервната система, чрез контролиране първоначалната траектория на моторните аксони в развиващите се крайници при бозайниците (315). В допълнение, *LHX1*^{-/-} нокаут мишки се раждат с аненцефалия (316). До този момент в литературните данни съществува един докладван случай на частична дупликация на *LHX1* гена, намерена в пациент с ИД, фокална кортикална дисплазия и фокална епилепсия. Дупликацията е намерена в мозаично състояние в здравата майка (28% от 135 ядра), докато при пациента дупликацията се среща в 98 % от изследваните 138 ядра. Базирайки се на тези наблюдения, генът *LHX1* би могъл да е дозово - чувствителен, с пряка роля в развитието на нервната система (317).

Друг ген с важно значение е *PIGW* (OMIM: 616025)- кодира инозитол ацилтрансфераза, участваща в GPI- свързания транспорт през плазмената мембрана по време на гликозилфосфатидинозитол (GPI) биосинтезата (318). Рецесивни мутации в този ген са наблюдавани при случай на синдром на West и синдром на хиперфосфатазия с интелектуален дефицит 5 (319).

Допълнителен ген, засегнат от дупликацията с висока експресия в мозъчна тъкан е *ACACA* - кодира ацетил КоА-карбоксилаза, катализираща лимитиращия етап от биосинтезата на дълговерижните мастни киселини (OMIM: 200350). Съществува хипотеза, че дупликации на *ACACA* биха могли да доведат до епилептогенна активност чрез свръх - оползотворяване на наличния ацетил-КоА и последващо нарушение на нормалния енергиен метаболизъм в мозъка (320).

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



Фигура 70. Схематично изображение на регион 17q12 при пациенти EP166. Синият правоъгълник обозначава дуплицирания участък при пациент 166. Със зелено са оградени гените, имащи потенциална роля в формиране на болестния фенотип при пациент EP166. Адаптирана от UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>).

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

При момиче на 4 години с ИД, пристъпи, моторни проблеми (Резултати; EP424) беше открита делеция в 1p36 региона с размер 0.549 Mb (Фигура 71A). Потвърдителният

qPCR показва, че делецията е в хомозиготно състояние (Резултати, Фигура 38Б). Засяга 35 UCSC гена, 24 от които са OMIM (614282, 615291, 616593, 601328, 611354, 615467, 605865, 601365, 617293, 609183, 613482, 611833, 611901, 617227, 612317, 612316, 616101, 617680, 611141, 603321, 176873, 603320, 116951, 611616). От тях четири гена са асоциирани до момента със заболяване - *B3GALT6*, *DVL1*, *ATAD3A*, *TMEM240*.

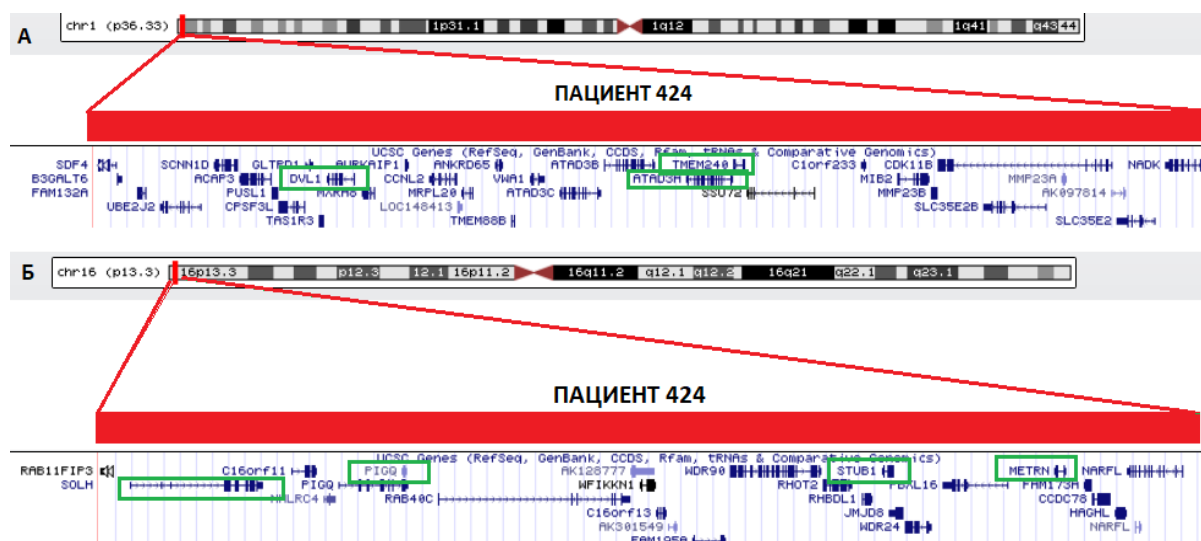
Литературните данни показват, че регион 1p36.33, засегнат от делецията е свързан с 1p36 делеционния синдром (OMIM: 607872). Делеции в този регион се откриват приблизително в 1 на 5000 деца в световен мащаб и така се определят като патогенни CNVs с най-висока честота на срещаемост при човека. Заболяването включва ИД, липса или нарушение в експресивната реч, поведенчески проблеми, хипотония, епилептични пристъпи и структурни аномалии на мозъка (321). Част от гените, разположени в засегнатия участък вероятно имат пряка роля във формирането на болестния фенотип, наблюдаван при пациент EP424 (Фигура 71А).

Генът *TMEM240* (OMIM: 607454) кодира високо консервативен трансмембранен белтък, експресиращ се предимно в мозъка, чиято функция все още не е изяснена. Мутации в него са асоциирани със спиноцеребрална атаксия 21 в комбинация с ИД и когнитивни проблеми (322). В този смисъл, недостатъчна доза от продукта на *TMEM240* би могла да обясни статичната атаксия и ИД, хиперактивното поведение и не добре развитата реч, наблюдаващи се при нашия пациент. Друг ген, засегнат от делецията е *ATAD3A* (OMIM: 612316). Той кодира митохондриален мембранен протеин с роля в митохондриалния метаболизъм и клетъчен растеж. Доминантни и рецесивни мутации в него наскоро бяха асоциирани със синдром на Harel-Yoon, характеризиращ се основно с неврологична симптоматика: атаксия, изоставане в ННР, спастичност на крайниците, абсансни пристъпи и аксонална невропатия (323). Генът *DVL1* кодира вътреклетъчен скелетен протеин, високо експресиращ се в мозъка и необходим за разклонението на дендритите на невроните по време на ембрионалното развитие (324). Мутации в този ген са идентифицирани при пациенти със синдром на Robinow (OMIM: 616331) - рядко АД заболяване с характерни дисморфични стигми и микроцефалия. Възможно е недостатъчната доза от продукта на този ген да допринася за изявата на комплексния фенотип, наблюдаващ се в нашия случай.

Характерно за 1p36 синдрома, а и за микроделеционните и микродупликационни синдроми по принцип, е изключителната вариабилност на фенотипа в зависимост от големината на засегнатия участък, гените, включени в него и влиянието на модифициращи фактори в рамките на конкретния индивид. Вземайки предвид генното съдържание на засегнатия участък, неговата пряка асоциация с известен микроделеционен синдром, както и хомозиготното състояние на делецията, ние заключихме, че това е генетичната причина за заболяването при EP424. Отсъствието на пълния спектър от симптоми, характерни за този синдром вероятно се дължи на по-малкия размер на делецията, съответно нейното специфично генно съдържание.

В допълнение, при EP424 беше открита и микроделеция в регион 16p13.3 с размер 0.227 Mb (Фигура 71Б). Делецията е в хетерозиготно състояние и бе класифицирана като

вариант с неясно клинично значение и вероятно патогенен ефект. Три отделни части от този регион, включващи различни гени в него, са свързани с различни синдроми - ATR-16 синдром, Рубинщайн-Тауби синдром и 16p13.3 микроделеционен синдром. Засегнатият от делецията участък е терминален (Фигура 71Б) и попада в района на ATR-16 синдрома (Синдром на алфа-таласемия с умствено изоставане; OMIM: 141750). При пациент EP424 не е документирана хемоглобинопатия, което би могло да се дължи на малкия размер на засегнатия участък, както и незасягането на *HBA1* и *HBA2* гените, кодиращи различни хемоглобинови вериги, мутации в които са отговорни за изявата на синдрома.



Фигура 71. Схематично изображение на региони 1p36 и 16p13.3 при EP424; червените правоъгълници обозначават делетиралия участък съответно в А. Район 1p36 Б. Район 16p13.3. Със зелено са оградени гените, имащи потенциална асоциация с клиничния фенотип на пациент 424. Адаптирана от UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>).

Делецията засяга 28 UCSC гена, 11 от които са OMIM гени (608738, 603257, 605754, 608121, 613889, 603264, 607207, 609082, 610998, 614666, 611118). Четири от тях са асоциирани със заболяване - *PIGQ*, *SOLH*, *STUB1* и *CCD78*. Част от гените, съдържащи се в района, са високо експресирани в мозъка и играят важна роля в него. Генът *METRN* (OMIM: 610998) кодира белтъка метеорин, който участва във формирането на аксонални мрежи по време на невrogenезата (325). Друг ген, *STUB1* (OMIM: 607207) също показва висока експресия в мозък и кодира убиквитин лигаза/шаперон, участващ в деградацията на редица протеинови субстрати в клетката (326). Мутации в него са свързани със АР спиноцеребеларна атаксия (OMIM: 615768), характеризираща се с нестабилна походка, мозъчна атрофия, репродуктивни проблеми, а понякога и миоклонии в крайниците. Повечето от пациентите със спиноцеребеларна атаксия развиват и лек интелектуален дефицит (327,328). Всички тези характеристики се припокриват със симптоматиката, наблюдавана при нашия пациент. Мутации в друг ген, засегнат от делецията - *SOLH*

(OMIM: 603267), са намерени при пациенти със спастична хемиплегия и спастична церебрална парализа (<http://www.genecards.org/>).

Генът *PIGQ* (OMIM: 605754) попада в региона, засегнат от делецията в нашия случай. Той кодира субединица на N- ацетилглюкозаминил-трансферазата, катализираща първата стъпка на GPI (глицозилфосфатидилинозитол) биосинтезата. Съществува потенциална асоциация на *PIGQ* с тежката форма на ранна детска епилептична енцефалопатия - Ohtahara синдром (329).

Всички от дотук описаните заболявания са с AP унаследяване. Въпреки хетерозиготното състояние на делецията и нейния по-малък размер, отколкото този, необходим за изява на синдромно състояние, е възможно тя да допринася за наблюдаваните клинични характеристики при EP424. Според хипотезата за двойния удар втора аберация служи като отключващ фактор за изява на вариант, класифициран като рисков фактор за развитие на дадено заболяване. В допълнение, ефектите от двете делеции биха могли да са адитивни и да доведат до изява на отделен фенотип, понякога с по-висока степен на тежест от този, който биха имали, ако съществуваха поотделно (169).

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

При пациент EP385, момиче с епилептични пристъпи, ИД, аутистични черти и мозъчно-структурни аномалии бе намерена хетерозиготна делеция в терминалната част на 7p22.3 района с размер 0.925 Mb (Фигура 72). Делецията засяга девет протеин-кодиращи гени, осем от които са OMIM гени (611061, 173430, 176911, 614864, 607723, 612056, 608114, 610429). Недостатъчната доза от продукта на част от тях може да е причина за симптоматиката, наблюдавана при EP385.

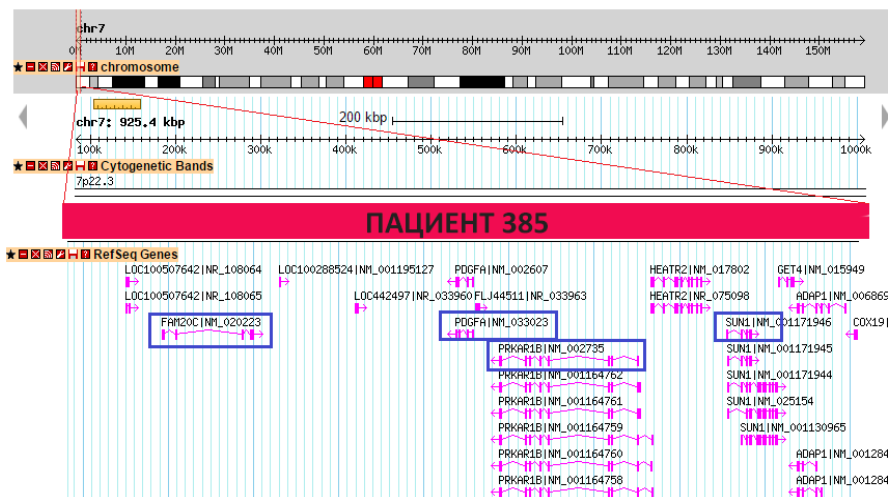
Част от OMIM гените, включени в делецията са асоциирани със заболяване. Мутации в *FAM20C* са свързани с Raine синдром (OMIM: 259775) - AP остеосклеротична костна дисплазия с микроцефалия и лоша прогноза; *HEATR2* гена е асоцииран с друго AP заболяване - цилиарна дискинезия (OMIM: 614874). Продуктът на *PRKAR1B* гена представлява цАМФ - зависима протеин киназа А, участваща в регулацията на въглехидратния и липидния метаболизъм, както и в други разнообразни процеси в клетката. Хетерозиготна мутация в *PRKAR1B* е асоциирана с потенциално ново АД невродегенеративно заболяване с късно начало, дължащо се на акумулирането на интермедиерни филаменти в клетката, чието фосфорилиране се регулира от протеин киназа А (330). Друг ген, засегнат от делецията, *PDGFA* (OMIM: 173430) не е асоцииран със заболяване все още, но показва висока експресия в мозък и е необходим за правилното формиране на олигодендроцитите и миелинизацията на малкия и гръбначния мозък (331). В този смисъл, недостатъчна доза от продукта на *PDGFA* би могла да е причина за част от неврологичните характеристики при нашия пациент. Допълнително, друг засегнат ген, *SUN1* (OMIM: 607723) е също високо експресиран в мозък. Продуктът на този ген е част от LINC цитоскелетния комплекс, който има специфична роля в радиалната невронална миграция в мозъчната кора, както и в миграцията на глиалните клетки по време на

формирането на нервната система. Експерименти с *SUN1*^{-/-} нокаут мишки показват дефекти в невроналното развитие - наблюдава се нарушена радиална миграция на невроните (332).

Съществуват литературни данни за делеции в 7p22.3 района, асоциирани с генетично - хетерогенния синдром Cornelia de Lange (CdLS). Той представлява АД мултисистемно заболяване, характеризиращо се с изоставане в ННР, епилептични пристъпи, поведенчески проблеми, специфичен лицев дисморфизъм, скелетни и мозъчни аномалии, ИД, задръжка в развитието на речта и други (333). Клиничните характеристики на нашия пациент (Резултати, пациент EP385) покриват минималните диагностични критерии, необходими за поставянето на диагнозата CdLS (334). Те включват изоставане в развитието, задръжка в развитието на речта, вродени мозъчни аномалии, специфични поведенчески нарушения (ADHD, агресия, самонаранявания и други), специфичен лицев дисморфизъм. Всички те присъстват в анамнезата на пациент EP385.

В допълнение, делеция с подобен размер и локализация е докладвана при пациент с дисморфизъм, изоставане в ННР и допълнителни вродени аномалии (335). При пациентът, описан от Salas-Labadía и съавтори се наблюдават допълнителни скелетни и дерматологични аномалии, но те биха могли да са резултат от допълнителната 7.5Mb делеция, намерена в 7q36 региона.

В крайна сметка, асоциацията на 7p22.3 региона с CdLS синдрома, както и наблюдаваните специфични клинични черти при пациент EP385 ни даде основание да поставим генетична диагноза синдром на Cornelia de Lange.

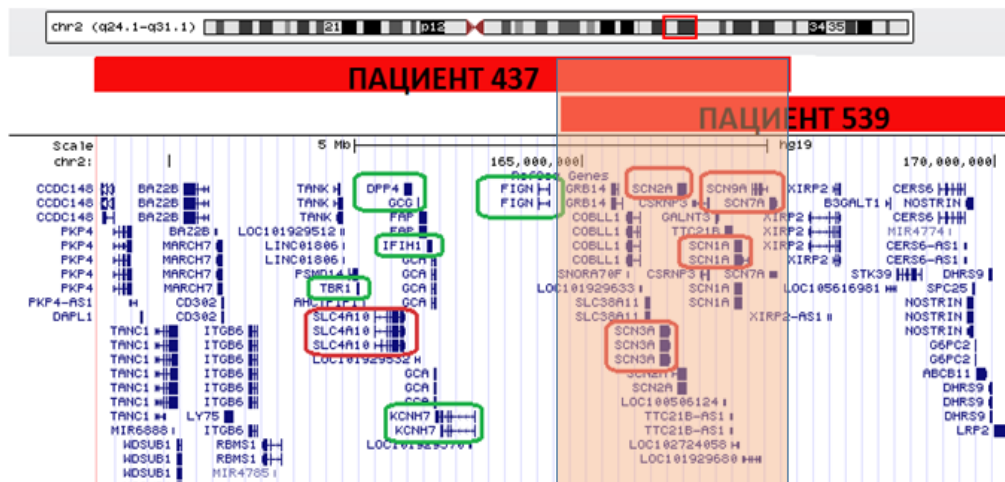


Фигура 72. Схематично изображение на регион 7p22.3; червеният правоъгълник обозначава делетиралия участък при пациент EP385. Със синьо са оградени гените, имащи потенциална асоциация с клиничния фенотип на пациент EP385. Адаптирана от Database of Genomic Variants (DGV)

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

При пациенти EP437 и EP539 бяха намерени хетерозиготни делеции в райони 2q24.1q31.1, засягащи дългото рамо на хромозома 2 с размери 8.55 Мб и 5.51 Мб съответно (Фигура 73). Двете делеции засягат различни хромозомни райони (q24.1q24.3 при EP437 и q24.3q31.1 при EP539), но съществува критичен район на припокриване между тях, съдържащ SCN- генния клъстер (Фигура 73). Гените *SCN1A* (OMIM: 182389), *SCN2A* (OMIM: 182390), *SCN3A* (OMIM: 182391) и *SCN9A* (OMIM: 603415) кодират различни субединици на потенциал зависими Na⁺-канални, разположени в мембраната на невроните и отговорни за генерирането и разпространението на нервния импулс. Хетерозиготни мутации в тези гени са причина за изява на различни форми на епилепсия и епилептични синдроми (336). Мутации от различен тип в *SCN1A* и *SCN9A* са отговорни за развитие на АД GEFS+ синдром и неговата по-тежка форма – епилептичната енцефалопатия синдром на Dravet или SMEI (тежка миоклонична епилепсия в детството), при който е характерно постепен регрес в интелектуалното развитие (51,55,65). Мутации в *SCN2A* също са документирани като причина за DS, като този ген е мутирал и в някои случаи на бенигни фамилни неонатални пристъпи, ранна детска епилептична енцефалопатия 11 и аутизъм (61,76,337). Доминантни мутации в *SCN3A* са причина за фокални епилепсии (338). Така, делеция на този генен клъстер във всички случаи е причина за изява на епилептични пристъпи, включително и при пациенти EP437 и EP539.

По литературни данни се касае за 2q24 микроделеционен синдром (епилептична енцефалопатия) с различно изразена клинична симптоматика - епилептични пристъпи, микроцефалия, дисморфични белези, цепки на небцето, очни аномалии (колобома на ириса, катаракта и микрофталмия), изоставане в растежа, ИД, сърдечни дефекти, аномалии на крайниците, аутистични прояви и други (66; 339-346). Характерно за 2q24 синдрома, а и за микроделеционните и микродупликационни синдроми по принцип, е изключителната вариабилност на фенотипа в зависимост от големината на засегнатия участък, гените, включени в него и влиянието на модифициращи фактори в рамките на конкретния индивид. В този смисъл, въпреки факта, че се засяга един и същи регион от дългото рамо на хромозома 2 в двата случая, се наблюдава известна разлика в тежестта на фенотипа. Пациент EP539, заедно със структурните изменения в мозъка и изоставането в НПР, не показва клиника на малформативен синдром, за разлика от пациент EP437. Това би могло да се дължи както на по-малкия размер на делецията, така и на съдържанието на специфични гени в засегнатия регион (Фигура 73).



Фигура 73. Схематично изображение на регион 2q24.1q24.3 и 2q24.3q31.1 при пациенти EP437 и EP539 съответно. Червените правоъгълници обозначават делетираните участъци при EP437 и EP539. Със червено са оградени сигурно патогенните гени, а в зелено тези, имащи потенциална роля в формиране на комплексния болестен фенотип при пациент EP437. Адаптирана от UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>)

Делецията при EP437 е по-голяма и освен SCN- клъстера от гени, недостатъчната доза от чийто продукти е отговорна за изявата на рефрактерната епилепсия, са засегнати допълнително и няколко гена с потенциална роля в по-сложния болестен фенотип (Фигура 73, зелено- оградени гени):

- *TBR1* (OMIM: 604616) кодира транскрипционен фактор, експресиращ се в няколко района в мозъка: кора, хипокампус, амигдала и очна ябълка. Играе важна роля в миграцията на невроните към кортекса по време на ембрионалното развитие. Установено е, че при *TBR1*^{-/-} нокаут мишки се нарушава нормалната миграция и правилните аксонални проекции в няколко мозъчни области, включително мозъчна кора и очна ябълка (347). Генът *TBR1* е част от сигналния път CASK-TBR1-RELN, участващ в миграцията на постмитотичните неврони към кортекса (347). Нарушения в правилното им разпределяне би могло да е причина за структурните мозъчни изменения и двустранната колобома на ириса, наблюдаващи се при пациент EP437.
- *SLC4A10* (OMIM: 605556) – продуктът на този ген представлява Na⁺ зависим хлор-бикарбонатен транспортер, регулиращ вътреклетъчното рН в невроните, в клетките на choroid plexus в мозъчните вентрикули, отговорни за формирането на гръбначно-мозъчна течност и рН на екстрацелуларното пространство в мозъка. Структурни реорганизации, засягащи този ген са причина за изява на комплексна парциална епилепсия, в комбинация с ИД (348). В допълнение, при *SLC4A10*^{-/-} нокаут мишки се наблюдава намаляване на възбудимостта на невроните с разстройства в зрението, както и нарушена невронална пластичност (349,350).

- *KCNH7* (OMIM: 608169) кодира порообразуващата алфа субединица на бързо инактивирани се потенциал-зависими K^+ канали. Такъв тип канали регулират редица процеси, каквито са отделянето на невротрансмитерни молекули, сърдечен ритъм, възбудимост на неврона, съкращение на гладка мускулатура (351). Мутации в този ген са асоциирани с биполарно разстройство (352).

- *DPP4* (OMIM: 102720) и *GCG* (OMIM: 138030) - кодират съответно дипептидил пептидаза и препроглюкагон. И двата гена участват във въглехидратния метаболизъм, а нарушени нива на глюкоза се наблюдават в много случаи на синдромен ИД и хипотония. Препроглюкагонът представлява прекурсора на глюкагона (GP1), а дипептидил пептидазата регулира нивата на глюкоза чрез инхибиране на GP1 (343). При пациент EP437 нивата на глюкоза са в нормални граници, но за да се изясни дали недостатъчност на тези два гена има патологичен ефект е необходимо по-нататъшно проследяване на кръвната глюкоза при пациента.

- *IFIH1* (OMIM: 606951) - кодира DEAD box протеин участващ в ядрения и митохондриален сплайсинг, инициация на транслацията, и асемблирането на сплайсозомата и рибозомата с предполагаема роля в клетъчното делене и растеж. Хетерозиготни точкови мутации в този ген са причина за изява на два АД синдромни състояния - синдром на Aicardi-Goutieres 7 (OMIM: 615846) и синдром на Singleton-Merten 1 (OMIM: 182250). И за двата синдрома е характерна разнообразна клинична симптоматика с акцент върху абнормалното развитие на костите и зъбите при Singleton-Merten синдрома и нарушение в нервната система с психични отклонения при синдрома на Aicardi-Goutieres. Освен епилепсия и ИД, за последния синдром са характерни и микроцефалия, отслабен мускулен тонус (хипотония), структурно-мозъчни аномалии, вътреутробно изоставане в развитието и липса на говор.

- *FIGN* (OMIM: 605295) - мутации в неговия ортолог при мишки са асоциирани с редукция в растежа на ретиналния епител, като в резултат се наблюдава микрофталмия, както и скелетни аномалии (сраствания на кости на черепа), при които се повишава риска от микроцефалия (353).

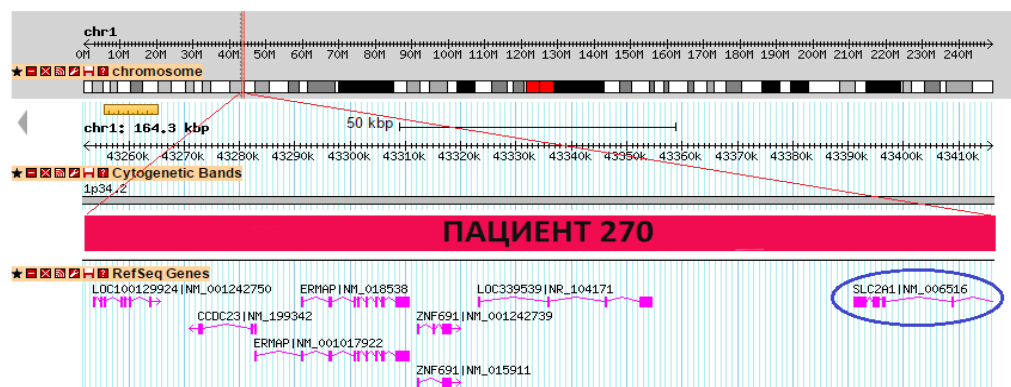
С оглед на генното съдържание, големината на намерените делеции в 2q24 региона и асоциацията им с добре познат микроделеционен синдром може да се твърди, че те са генетичната причина за заболяването при пациенти EP437 и EP539.

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

При пациент EP270 беше открита микроделеция в 1p34.2 с размер 0.165 Mb, засягаща *SLC2A1* гена. Делецията, намерена чрез микрочипов анализ, обхваща почти целия *SLC2A1* ген (освен екзон 1), кодиращ GLUT1 - основния транспортер на глюкоза през кръвно - мозъчната бариера (Фигура 74). Глюкозата е основния източник на енергия на нервните клетки и прекъсване на глюкозния транспорт в резултат на мутации в *SLC2A1* води до синдром на дефицит в глюкозния транспортер – GLUT1 - DS (OMIM: 606777).

Класическата форма на синдрома се характеризира с миоклонични и абсансни пристъпи, придобита микроцефалия, ИД, моторни проблеми, разстройство в развитието и намалено съотношение на количеството глюкоза в цереброспинална течност и кръв (93). Характерно за лечението на синдрома е, че епилептичните пристъпи се повлияват добре от кетогенна диета с изключването на въглехидратни източници, тъй като кетоновите тела са алтернативен източник на енергия за мозъка. Заболяването е АД въпреки, че са документирани и AP форми (354). Досега са докладвани над 100 мутации в *SLC2A1* като причина за синдрома, като спектърът им е разнообразен - големи делеции, засягащи част от гена или целия ген, точкови мутации с промяна на смисъла, с прекъсване на рамката на четене, “frameshift” и сплайс - място мутации. Синдромът се характеризира с голяма клинична хетерогенност, въпреки наличието на три задължителни групи неврологична симптоматика – епилептични пристъпи при 90% от случаите, моторни и когнитивно-поведенчески нарушения (96). Това затруднява поставянето на диагноза и най-сигурния диагностичен белег на синдрома остава хипогликорахията, процедурата за определянето на която се извършва рядко поради инвазивния характер на получаването на цереброспинална течност (ЦСТ).

В нашия случай не е проведено определяне съотношението на концентрациите на глюкоза в ЦСТ и плазма. При пациент EP270 в плазма се наблюдават нормални стойности на глюкозна концентрация. В допълнение, наличието на допълнителни синдромни характеристики при EP270 (асиметричен гръден кош, очни аномалии и темпорална дисплазия) ни даде основание да допуснем, че става въпрос за микроделеционен/дупликационен синдром. Наличието на почти цялостна делеция на едното копие на *SLC2A1* гена, открита чрез aCGH, ни даде основание да поставим генетичната диагноза GLUT1 DS. Този резултат още веднъж доказва хетерогенността на изява на GLUT1 DS и трудността в поставянето на правилната диагноза без извършване на цялостния спектър от диагностични процедури при такива пациенти.



Фигура 74. Схематично изображение на регион 1p34.2, засягащ почти всички екзони на *SLC2A1* гена; червеният правоъгълник обозначава делетиралния участък при пациент EP270. Адаптирана от Database of Genomic Variants (DGV).

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

При пациент EP324 микрочиповият анализ открива 0.343 Mb делеция в регион 6q26, засягаща екзон 2 от *PARK2* гена (OMIM: 602544) (Фигура 75). Той кодира Паркин Е3 убиквитин лигаза, високо експресирана при редица невронални процеси в различни области на мозъка. Първоначално мутации в този ген са определени като генетична причина за АР ювенилен паркинсонизъм (355). Наскоро няколко проучвания асоциираха интрагенни микроделеции в *PARK2* с когнитивно-поведенческия дефицит, характерен за аутизма (356-358).

Досега са известни четири *PARK2* дупликации, докладвани в литературата. Всички те са намерени при пациенти с взаимно припокриващ се фенотип, засягащ развитието на нервната система (357,359-361). Клиничните характеристики при пациент EP324, които се припокриват с тези, докладвани по литературни данни са забавено общо развитие (5/5), дисморфични стигми (4/5), забавено психомоторно развитие/ИД (5/5), хипотония (4/5), задръжка в развитието на речта (4/5), аутистични черти (3/5), стереотипии (2/5), и епилепсия (2/5). Три от докладваните дупликации са унаследени от здрава майка, което предполага непълна пенетрантност на заболяването (359-361). В един пациент с аутизъм дупликацията се унаследява от болен баща (357), докато в нашия случай сегрегационния qPCR анализ показва, че тя липсва при родителите (Резултати, Фигура 41Б).

В допълнение, пациенти с подобен размер дупликации са докладвани в DECIPHER базата-данни (<https://decipher.sanger.ac.uk/>; пациенти: 279606, 264250, 279450, 279451, 292668). Всички те имат аутизъм, ИД, стереотипно поведение и нарушен говор. Така, нашите данни подкрепят наскоро предложената хипотеза за откритие на нов микроделеционен/дупликационен синдром, дължащ се основно на промени в броя копия (CNVs), засягащи *PARK2* гена (359,360).



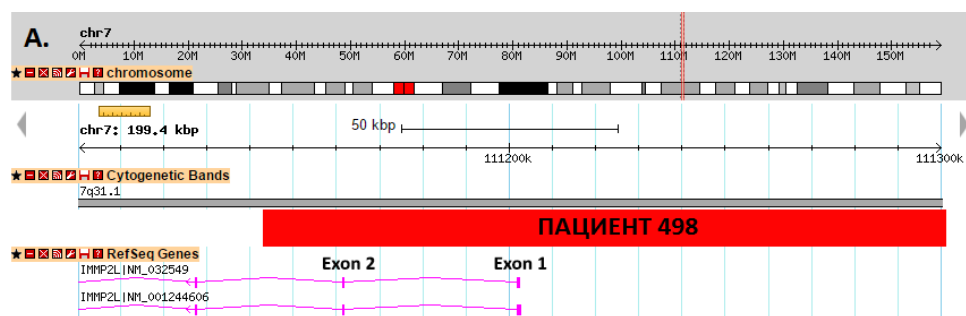
Фигура 75. Схематично изображение на регион 6q26, включващо част от *PARK2* гена; синият правоъгълник обозначава дуплицирания участък, засягащ екзон 2 при пациент EP324. Адаптирана от Database of Genomic Variants (DGV).

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

При момиче на четири години чрез aCGH беше открита 0.139 Mb хомозиготна делеция, засягаща първите два екзона на *IMMP2L* гена (Фигура 76). Генът *IMMP2L* (OMIM: 605977) кодира една от субединиците на мембранна пептидаза, част от голям протеинов комплекс, с роля в процесирването на незрели аминокиселинни секвенции на ядрено - кодирани белтъци, насочени за импорт в митохондрия. Точкови мутации и/или интрагенни CNVs в този ген са намерени при пациенти със синдром на Gilles De La Tourette (OMIM: 137580) - неврологично заболяване, характеризиращо се с двигателни и вокални тикове, често в комбинация с ADHD и аутизъм. В допълнение, делеция на *IMMP2L* е намерена при пациент с невропсихиатричен фенотип, какъвто е ADHD (362). Интрагенни делеции с размер между 150 Kb и 370 Kb, засягащи същите екзони, както в нашия случай, са намерени при пациенти с комплексни неврологични характеристики, включващи освен епилепсия, задръжка в развитието на речта и моторни проблеми (363).

В допълнение, проведени са експерименти с *IMMP2L*^{-/-} миши модели, показващи редуциран потенциал за процесирване на белтъчни субстрати в мозъчна тъкан при липсваща функция на пептидазата (364). Това би могло да доведе до повишена продукция на супероксидни радикали като резултат от хиперполяризацията на вътрешната митохондриална мембрана и последващо отделяне на про-апоптични белтъци с последваща клетъчна смърт и развитие на атаксия и хипоплазия на церебелума (364,365). Експресионните нива на *IMMP2L* иРНК са по-високи в астроцитите, сравнени с всички останали мозъчни клетъчни типове при човека. Скорошно проучване показва, че изключването на *IMMP2L* гена води до нарушена експресия на няколко други гена, участващи в развитието на ЦНС и това може да е причина за наблюдавания фенотип при пациенти, при които няма работещи копия от митохондриалната пептидаза в резултат от мутации в *IMMP2L* гена (366). Хетерозиготни делеции с подобен размер и локализация са докладвани при седем пациента в DECIPHER базата данни (277828, 277944, 292999, 305787, 274898, 282286, 300714). Класификацията на тези делеции е противоречива: при част от DECIPHER пациентите тя е класифицирана като вариант с неясна клинична значимост (UCS), защото е унаследена от здрав родител, т.е. наблюдава се непълна пенетрантност на заболяването. При останалата група пациенти вариантът е класифициран като вероятно патогенен.

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



Фигура 76. Схематично изображение на регион 7q31.1, включващо част от *IMMP2L* гена; червеният правоъгълник обозначава делетиралия участък, засягащ първите 2 екзона при пациент EP498. Адаптирана от Database of Genomic Variants (DGV).

5.5.2. Аберации с неясно клинично значение и вероятно патогенен ефект

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

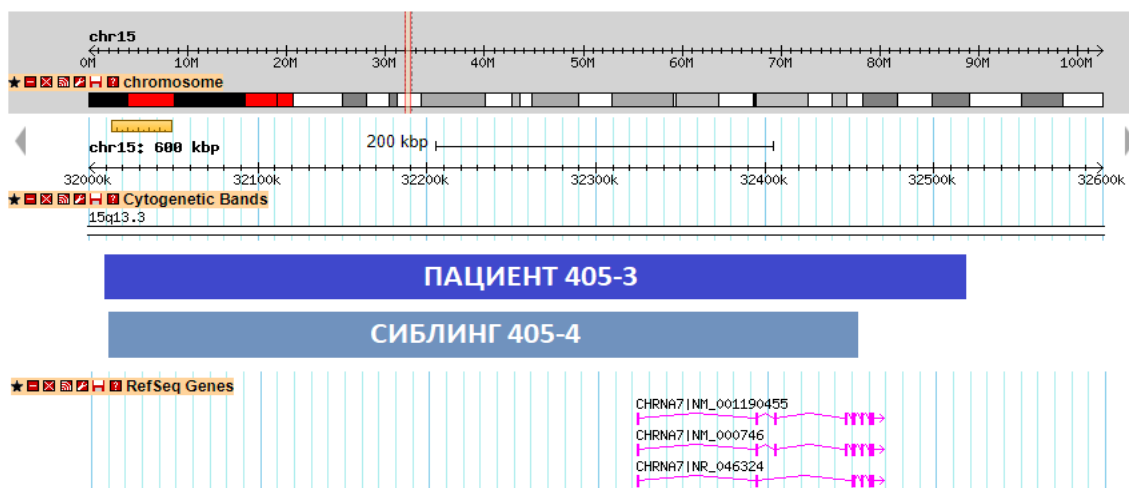
Намерената при EP405 дупликация в район 15q13.3 е с размер 499 Kb и засяга целия *CHRNA7* ген (OMIM: 118511) (Фигура 77). Дупликацията беше открита и при брата на пробанда, показващ сходни клинични характеристики (Резултати, Пациент EP405). Генът *CHRNA7* кодира α -субединицата на никотинов холинергичен рецептор, експресиращ се предимно в GABA-инхибиторните интерневрони, в хипокампуса и стриатума. Проксималният регион 15q11-14 региона се характеризира с наличието на множество нискокопийни повторени последователности (LCR- Low Copy Repeats) с висок процент на хомология, които оформят няколко точки на счупване (BP) и правят региона изключително нестабилен (367). Рекурентни хомо- и хетерозиготни делеции с подобен размер в 15q13.3 района, лежащи между точки на счупване BP4 и BP5, засягащи този ген са свързани с изява на 15q13.3 микроделеционен синдром, характеризиращ се с разнообразни клинични характеристики - епилептични пристъпи, когнитивни и поведенчески проблеми, общи и лицеви дисморфизми, различен по степен ИД и други (OMIM: 612001).

Дупликации с размер между 350 и 680 Kb, разположени между същите точки на счупване BP4 и BP5, са намерени както в здрави контролни индивиди, така и при множество пациенти с разнообразен невропсихиатричен фенотип - ИД, общо забавяне в развитието, както и мускулна хипотония, поведенчески проблеми и аутистични стигми, при които дупликацията е класифицирана като вариант с неясна клинична значимост (116,301,367,394). Съществува случай и на трипликация, засягаща *CHRNA7* с подобен размер като този в нашия случай, сегрегираща в три поколения с невропсихиатрични проблеми и поведенчески нарушения (368). Всички тези данни показват, че е възможно висока доза от продукта на *CHRNA7* гена да нарушава нормалното функциониране на синаптичната комуникация между невроните. Допълнително, съществува предположение

за ролята на *CHRNA7* дупликации в изявата на дефекти в развитието на устните и небцето (високо небце, цепки на устната) (369). При пациент EP405 и нейния брат също се наблюдава високо небце. При пациенти с дупликация на *CHRNA7* обаче, епилепсията не е често срещана клинична характеристика, въпреки, че съществуват съобщени случаи на ГГЕ с дупликации, засягащи този ген (301,394). По литературни данни, 15q13.3 дупликации във всички случаи са унаследени, но се наблюдава непълна пенетрантност и вариабилна експресивност на заболяването (116,370). В базата-данни DECIPHER има множество докладвани случаи на подобен размер и локализация дупликации, за които има противоречива информация – класифицирани като по-скоро непатогенни, с неясна клинична значимост или вероятно патогенни.

Функционални изследвания на индуцирани плурипотентни стволови клетки и невронни предшественици, генерирани от пациенти с 15q13.3 дупликации и делеции показват, че както делециите, така и дупликациите се свързват с намаляване на притока на калциеви йони, зависим от никотиновите холинергични рецептори ($\alpha 7$ nAChR), макар и по различен патомеханизъм и могат да имат отношение към наблюдавания фенотип (371).

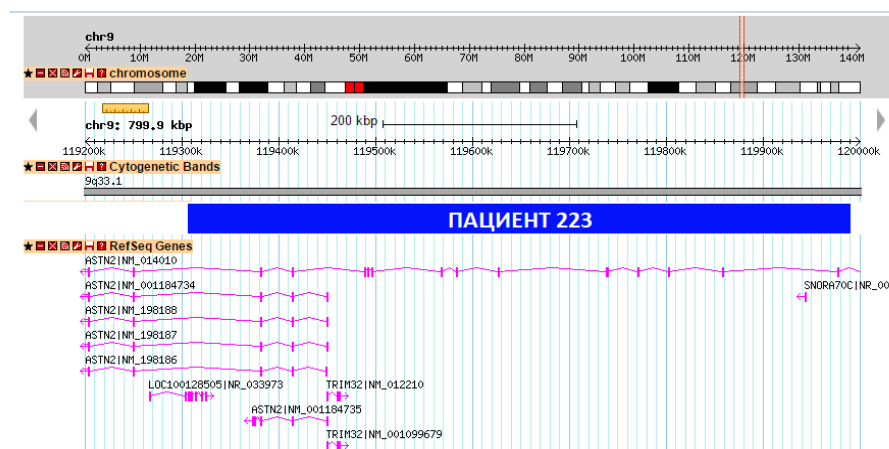
Възможно е дупликацията да е отговорна за изявата на ИД, високото небце, мускулната хипотония при EP405 и нейния брат, но не може да обясни епилептичния синдром, наблюдаван и при двамата сиблинги. Допълнително, по литературни данни дупликацията е унаследена във всички случаи, което повишава вероятността тя да е унаследена от един от здравите родители, които са без данни за невропсихиатрично заболяване или епилепсия. Поради противоречивите данни в световната литература и базиданни относно патогенността на откритата дупликация, както и според препоръките на ACMG, тя беше класифицирана като вероятно патогенен вариант с неясна клинична значимост.



Фигура 77. Схематично изображение на регион 15q13.3, включващ ген *CHRNA7*. Сините правоъгълници обозначават дуплицираните участъци при пациент EP405-3 (тъмно синьо) и нейния брат – EP405-4 (светло синьо). Адаптирана от Database of Genomic Variants (DGV).

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

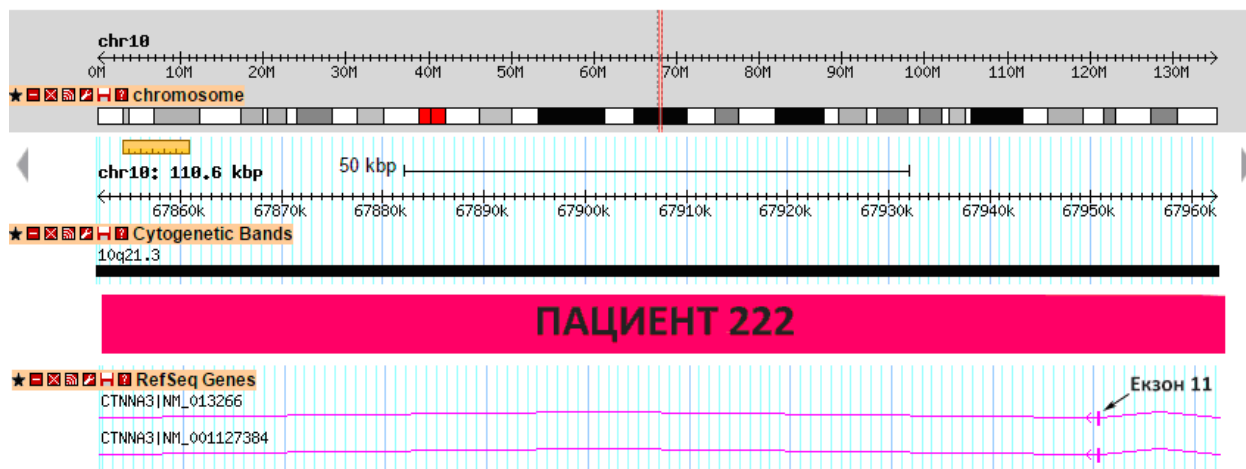
При пациент EP223 микрочиповият анализ детектира 0.687 Mb дупликация в 9q33.1 региона. Дупликацията засяга целия *TRIM32* ген и част от екзоните на *ASTN2* гена (Фигура 78). Генът *TRIM32* кодира убиквитин лигаза, част от по-голяма убиквитин-лигазна система, отговорна за деградацията на редица белтъци. Хомозиготни мутации в този ген са асоциирани с AP заболявания като мускулна дистрофия на пояса и крайниците (OMIM: 254110) и синдром на Bardet-Biedel (OMIM: 615988), при който част от характерните черти са интелектуалния дефицит и наднорменото тегло. Генът *ASTN2* кодира белтък астротактин, играещ ключова роля в развитието на мозъка при бозайниците чрез формиране на връзки между невроните и астроглиалните клетки в малкия мозък, кортекса и хипокампуса, медирайки невроналната миграция в тези области (372). Продуктът на *ASTN2* формира комплекс с неговия паралог *ASTN1* (трансмебранен белтък, осъществяващ неврно-глиалното взаимодействие) като регулира неговата експресия върху повърхността на невробластите (373). Генът *TRIM32* е разположен в противоположна ориентация в рамките на интрон на по-големия *ASTN2* ген (Фигура 78) и вариации в броя копия, засягащи двата гена са определени като рискови фактори за развитие на неврокогнитивни разстройства, каквито са ADHD, аутизъм, ИД, епилепсия, шизофрения и други (374,375). Въпреки припокриването на част от фенотипа със синдрома на Bardet-Beidel, в литературата няма описани случаи на дупликации, засягащи *TRIM32*, които водят до развитието на синдрома. Затова, по-скоро дозова чувствителност на *ASTN2* гена е отговорна за лекия ИД и епилепсията, наблюдаващи се в нашия случай. Все пак, за да се обясни целия спектър от клинични симптоми, е необходимо да се проведе друг широкообхватен метод, какъвто е екзомното секвениране, с цел да се потърсят патогенни точкови варианти в гени, имащи отношение към наблюдавания фенотип при пациент EP223.



Фигура 78. Схематично изображение на регион 9q33.1, включващ част от *ASTN2* и *TRIM32* гените; синият правоъгълник обозначава дуплицирания участък, засягащ част от *ASTN2* гена и целия *TRIM32* ген при пациент EP223. Адаптирана от Database of Genomic Variants (DGV).

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

При момче на 12 години с диагноза редки ГТКП и умерен към тежък ИД беше намерена хетерозиготна делеция с размер 0.111 Mb, засягаща екзон 11 от *CTNNA3* гена, разположен в хромозомен район 10q21.3 (Фигура 79). Генът *CTNNA3* кодира алфа катенин (кадхерин-свързващ белтък), който представлява клетъчно-адхезионна молекула, играеща роля основно в междуклетъчните контакти на мускулните клетки. Дефекти в този ген са свързани с аритмогенна дясна вентрикуларна дисплазия 13 - прогресивно миокардно заболяване, свързано с аномалии в камерите на сърцето (376). В допълнение, *CTNNA3* е вероятен кандидат ген за епилептична енцефалопатия от типа на Landau Kleffner синдром (219,377). В друго изследване се открива хетерозиготна делеция, засягаща екзон 11 от гена при случай на разстройство, свързано с аутистичния спектър, ненамерена досега в над 6000 здрави контроли. Авторите установяват, че катенина има 95% идентичност между човек и мишка, и че *CTNNA3* гена показва най-висока експресия в хипокампуса и кората на мозъка (378). Делецията, намерена при нашия пациент също засяга екзон 11 от *CTNNA3* гена. Това ни дава основание да смятаме, че тази аберация има отношение към аутистичния фенотип, който пациент EP222 проявява.

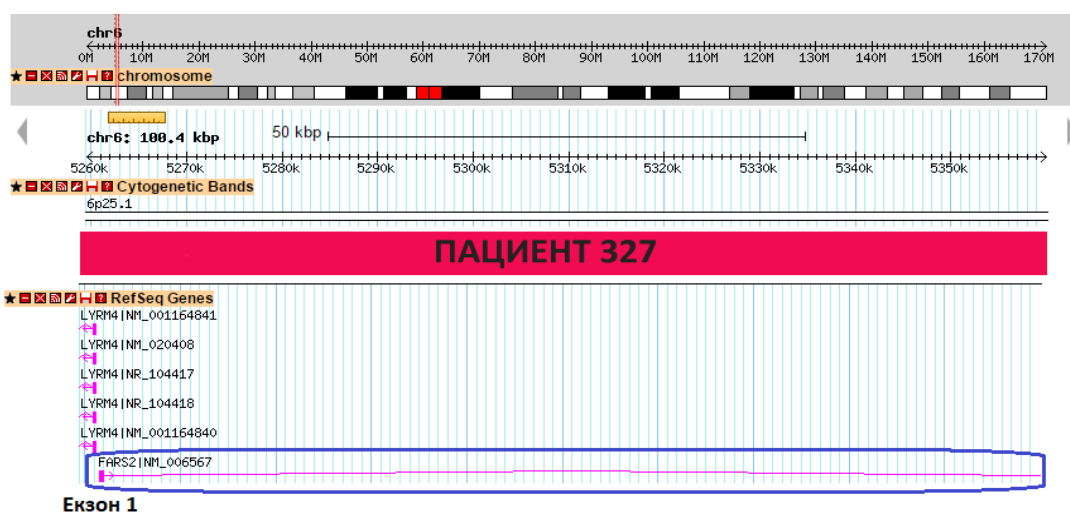


Фигура 79. Схематично изображение на регион 10q21.3, включващо част от *CTNNA3* гена; червеният правоъгълник обозначава делетиращия участък, засягащ екзон 11 при пациент EP222. Адаптирана от Database of Genomic Variants (DGV).

- **arr[hg19] 6p25.1(5,259,570-5,359,994)x1 при пациент EP327**

Чрез микрочиповия анализ беше потвърдена и 0.100 Mb делеция в район 6p25.1, засягаща *FARS2* гена, унаследена от здрава майка (Фигура 80). Генът *FARS2* кодира ензима митохондриална фенилаланин - тРНК синтетаза клас II, катализираща свързването на активираната аминокиселина към специфичната за фенилаланин транспортна РНК по време на трансляцията (379). Хомозиготни и двойно хетерозиготни мутации в този ген са

причина за изява на синдроми на Alpers и комбиниран дефицит на окислителното фосфорилиране 14 (COXPD14) (OMIM: 614946). COXPD14 представлява митохондриална енцефалопатия - тежко АР заболяване, характеризиращо се с ранна задръжка в развитието, пристъпи и лактатна ацидоза. Биохимични изследвания показват дефицит на множество ензими, свързани с дихателните електрон-транспортни вериги в митохондриите (380). Синдромът на Alpers е тежко мултисистемно заболяване, засягащо опорно-двигателната и нервната системи. Пациенти с това заболяване показват три основни характерни симптома: повтарящи се рефрактерни миоклонични пристъпи, регрес в психомоторното развитие и чернодробно заболяване. Друга отличителна черта е кортикалната некроза на мозъка, наблюдавана чрез ЯМР (381). Други автори откриват 88 Kb делеция, засягаща част от *FARS2* гена при пациент с тежка епилептична енцефалопатия с последващ регрес в интелектуалното развитие и атрофия на кората на малкия мозък (382). Описаните клинични характеристики се припокриват с тези, наблюдавани при пациент EP327, но съществено се различават от по-комплексните синдроми, свързани с по-големи делеции в 6p25.1 (>500 Kb). Възможно е, заради по-малкия размер на делецията в нашия случай и този, докладван от Almalki и съавтори (382), да се оформя отличителен болестен фенотип, включващ епилептични пристъпи като водещ симптом, в комбинация с ИД. Освен този случай, съществуват още три докладвани пациента с делеции с подобен размер и ЯМР аномалии, епилепсия и изоставане в развитието, всички унаследени от майка (385,386). Всички докладвани делеции обаче се откриват в комбинация с допълнителна точкова мутация в *FARS2* гена.



Фигура 80. Схематично изображение на регион 6p25.1, включващо част от *FARS2* гена; червеният правоъгълник обозначава делетирания участък, засягащ екзон 1 при пациент EP222. Адаптирана от Database of Genomic Variants (DGV).

Поради липсата на литературни данни за болестния ефект на хетерозиготни мутации в *CTNNA3* и *FARS2* гените, описаните едно-екзонни делеции не са достатъчни, за да се обясни клиничния фенотип на пациенти EP222 и EP327. От друга страна,

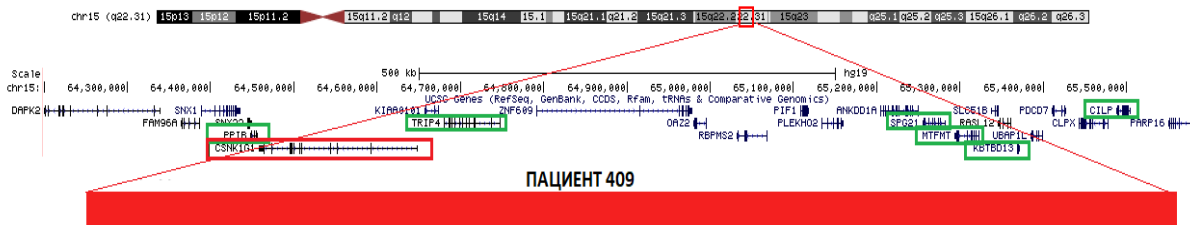
сравнителния анализ на случаите, описани в литературата и нашите пациенти показва, че всички показват сходни клинични характеристики. За да се провери дали EP222 и EP327 са двойно-хетерозиготни носители на дефекти в двата гена, беше проведен секвенционен анализ на кодиращите последователности на *FARS2*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

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

При пациент EP409 чрез микрочипов анализ беше открита 1.33 Мб делеция, засягаща 15q22.31 региона (Фигура 81). Делецията не сегрегира с болестния фенотип в семейството - не беше открита при майката, също с история за епилепсия (Резултати, Фигура 50). Майката е имала ГТКП в детството, но не показва допълнителни невропсихологични нарушения, в сравнение с EP409. Това би могло да се дължи на допълнителен генетичен вариант, недетектируем с микрочиповата технология, който да допринася за епилептичния фенотип в семейството. В този смисъл, наблюдаваната делеция би могла да влияе върху фенотипа на принципа на двойния удар, като го влошава и води до развитието на ИД допълнителните синдромни черти, които EP409 показва.

Делеция с такъв размер и локализация не се открива при здрави контролни индивиди в DGV базата-данни. Тя засяга 25 UCSC гена, 16 от които са OMIM (616567, 601272, 123841, 606274, 610696, 604501, 617474, 604152, 610953, 608181, 6111766, 612085, 613727, 608138, 6156611, 603489). Шест от OMIM гените са асоциирани с болестен фенотип (Фигура 81). Два гена са свързани с AP (*ACP33*, OMIM: 608181; *TRIP4*, OMIM: 604501) и един ген с АД (*KBTBD13*, OMIM: 613727) мускулни заболявания. При пациент EP409 не се наблюдават нарушения в нормалната функция на мускулите, което потвърждава факта, че присъствието на едно здраво копие от съответния ген е достатъчно за поддържане на нормална мускулна физиология. Два други гена, засегнати от аберацията са асоциирани с абнормен скелетен фенотип, също неприсъстващ при нашия пациент: *PP1B* (OMIM: 123841) и *CILP1* (OMIM: 603489). Мутации в ген *MTFMT* (OMIM: 611766) са генетична причина за изява на AP митохондриално заболяване: комбиниран дефицит на окислителното фосфорилиране 15, чийто клинични характеристики отчасти се припокриват с тези, наблюдавани при нашия пациент - ИД, проблеми с речта, епилептични пристъпи, страбизъм. С оглед на това, че няма докладвани хетерозиготни *MTFMT* мутации, които да са причина за абнормна функция на митохондриите, този ген по-скоро няма съществена роля във формиране на фенотипа при EP409.

От друга страна, недостатъчната доза от продукта на друг ген, *CSNK1G1* (OMIM: 606274), засегнат от делецията вероятно играе роля във формирането на болестният фенотип при нашия пациент (Фигура 81). Несинонимна *CSNK1G1* мутация е намерена при



Фигура 81. Схематично изображение на регион 15q22.31 при пациент EP409. Червеният правоъгълник обозначава делетиращия участък при пациент EP409. Със червено е ограден гена с най - голяма вероятност за участие във формиране на фенотипа, а в зелено тези, асоциирани със заболявания от различен тип, но несъвпадащи с клиничните симптоми при EP409. Адаптирана от UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>)

случай с епилепсия, микроцефалия и забавяне в развитието (214). Генът *CSNK1G1* кодира казеин-киназа 1 (СК1) и някои от изоформите му са високо експресирани в няколко мозъчни района при мишки, включително и стриатума - район, свързан с движението и мотивационно-базираното поведение (387). В мозъка СК1 играе роля в поддържането на правилната глутаматергична синаптична трансмисия чрез отрицателна регулация на NMDA (N- метил- D - аспартат) рецепторите. Така, при отсъствие на едно копие от *CSNK1G1* гена е възможно да се повиши NMDA медираната глутаматергична нервна възбудимост и като резултат - нарушения в поведението и мисловната дейност, характеристики наблюдавани при EP409 (Резултати, пациент 409). В допълнение, продължително активирано състояние на NMDA рецепторите води до глутаматна токсичност за клетката, което е възможно да причини клетъчна смърт в резултат от повишени нива на Ca^{2+} в нея (388). С оглед наличието на калцификати в лява малкомозъчна хемисфера, наблюдавани чрез ЯМР при пациент EP409, очевидно се касае за разстройство в калциевия метаболизъм. Въпреки това, точния патомеханизъм все още не е известен и публикуването на допълнителни мутации в *CSNK1G1* при пациенти с подобен фенотип, както и проучвания върху моделни организми ще спомогнат за определяне ролята на този ген в патогенезата на заболяването.

- **arr[hg19] 15q13.1(29,096,386-29,498,094)x3 при пациент EP381**

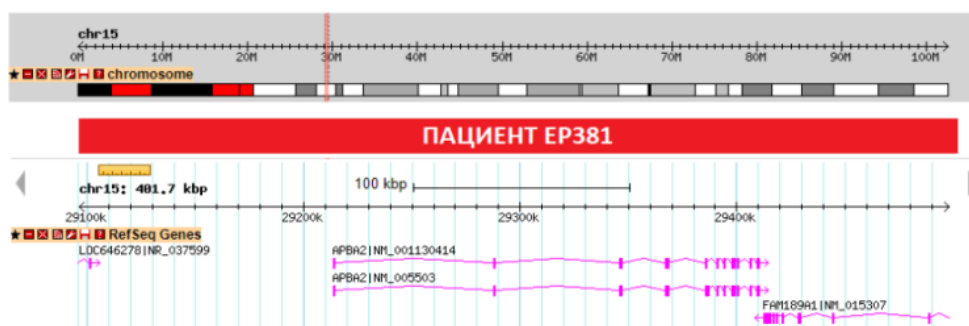
При пациент EP381 беше открита 0.402 Мб дупликация, засягаща 15q13.1 региона. Тя покрива целият *ARPA2* ген (OMIM: 602712) (Фигура 82). Дупликацията сегрегира с болестния фенотип в семейството - открива се при болна майка, нейната сестра, както и

при баба по майчина линия. Всички засегнати членове на семейството имат различен по тежест ИД, история за пристъпи и психиатрични нарушения. Дупликацията не беше намерена при клинично здравия дядо по майчина линия (Резултати, Фигура 49).

Генът *APBA2* е разположен между горещи точки на скъсване ВР3 и ВР4 в 15q13.1 региона, характеризиращи се с висока степен на нестабилност, в които се случват много делеционни и дупликационни събития, асоциирани с разстройства от аутистичния спектър и ИД (389). В допълнение, цялостно генни дупликации на *APBA2* са асоциирани с шизофрения с ранно начало (314) и аутизъм (389,390). Досега няма описан случай на епилепсия в литературата, носещ дупликация на *APBA2* гена.

Продуктът на *APBA2* - Mint-2 протеина представлява амилоид β -прекурсор свързващ протеин-неврон-специфичен адапторен белтък. Mint-2 директно се свързва с неурексините и синтаксин 1 и така участва във функционалността на един по-голям мултипротеинен SNARE комплекс, отговорен за нормалното свързване и фузия на синаптичните везикули с клетъчната мембрана по време на невротрансмисията (391). Базирайки се на функцията на Mint-2, *APBA2* се явява кандидат ген за аутизъм. В допълнение, експерименти с миши модели показват, че по-голямата част от *APBA2*^{-/-} нокаут мишките умират, а тези, които оцеляват показват неконтролируемо отделяне на невротрансмитерни молекули в пресинаптичното пространство, както и понижена синаптична сила (392).

Следователно, повишена експресия на *APBA2* гена би могла да е отговорна за поне част от клиничните характеристики (ИД и психиатрични нарушения), наблюдавани при пациент ЕР381, както и при неговите родственици.



Фигура 82. Схематично изображение на регион 15q13.1, включващ *APBA2* гена; червеният правоъгълник обозначава делетирационен участък при пациент ЕР222. Адаптирана от Database of Genomic Variants (DGV).

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

В резултат от настоящия дисертационен труд успяхме да изградим диагностичен системен ход, при който, в зависимост от насочващата диагноза, съществуват няколко подхода (Фигура 83).

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

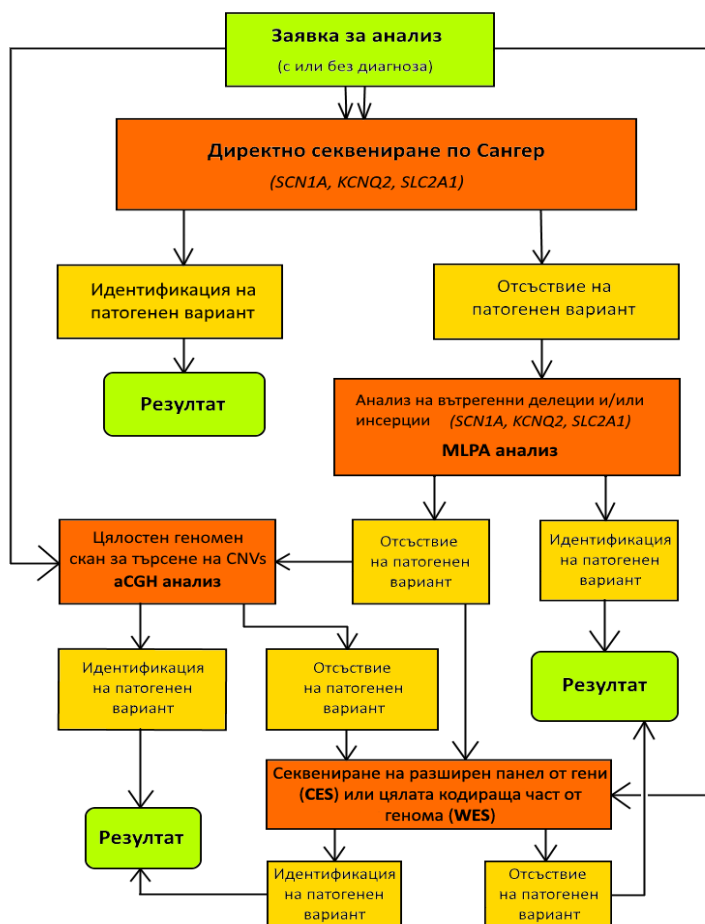
В случай на отсъствие на патогенен вариант, но със съмнение за същата диагноза би могло да се премине към таргетен анализ за промени в броя копия, CNVs (делеции или дупликации), засягащи един или няколко екзона на същия ген (Фигура 83). Методи за таргетна идентификация на CNVs са количествения PCR в реално време (qPCR), long range PCR или MLPA анализ.

В случай на отсъствие на патогенен вариант и с този подход, особено в случаите, когато освен епилепсия се наблюдават и допълнителни невропсихични проблеми, като ИД, аутистични стигми и поведенчески нарушения се прилагат по-широкообхватни методи, каквито са микрочиповия анализ и таргетното екзомно секвениране на разширен панел от гени (Фигура 83).

Микрочиповите технологии са способни да детектират CNVs с изключително малък размер в цялата кодираща част на генома и в този смисъл са подходящи за търсене на копийни варианти, засягащи нови гени с потенциална роля в болестния фенотип. Във всички случаи, микрочиповия метод на сравнителна геномна хибридизация (aCGH) се определя като лесно приложим, бърз и точен за търсене на промени в броя копия на геномно ниво, което го прави подходящ за рутинна работа в диагностичен аспект. В някои случаи, при неясна диагноза и наличие на тежък синдромен фенотип, включващ и вродени дефекти в различни органи и системи, би могло да се извърши директно микрочипов анализ като първи подход на изследване (Фигура 83). В нашето проучване ние

приложихме директно микрочиповия метод при 39 пациента с ГГЕ, ИД, аутистични стигми, допълнителни дисморфизми и вродени аномалии (Резултати, Таблица 23).

При неоткриване на патогенен вариант чрез гореспоменатите подходи, както и когато не съществува суспектна диагноза, би могло да се пристъпи към прилагане на секвенционните стратегии от ново поколение, каквито са анализа на разширен панел от гени, свързани с голям брой епилептични състояния (Clinical Exome Sequencing - CES) или екзомно секвениране (Whole Exome Sequencing - WES) на цялата кодираща част от генома (Фигура 83). Вторият подход дава възможност за откритие на нови гени с потенциална роля в болестния фенотип. В тези случаи обаче, са необходими допълнителни експериментални изследвания с цел доказване връзката генотип-фенотип, което не винаги е възможно в рамките на една лаборатория. Секвенирането от ново поколение чрез двата подхода при недиагностицираните пациенти със синдромно състояние в текущото изследване, както и при някои пациенти с рефрактерен електро-клиничен синдром ще бъдат обект на бъдещ научен проект.



Фигура 83. Системен ход за диагностика на различни на различни синдроми, включващи епилептични пристъпи в комбинация или без ИД и вродени аномалии.

7. Обобщение

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

В резултат от секвенирането на цялата кодираща част на ген *SCN1A* ние открихме осем патогенни и четири вероятно патогенни варианта, засягащи 9% от общо-изследваната група пациенти (n=133). Пет варианта са от типа missense, три са сплайс-място мутации, два са nonsense и два варианта представляват frameshift делеции. Пет от откритите варианти са нови, непубликувани до този момент в литературата. От откритите мутации с клинично значение, позволяващи да се постави генетична диагноза са осем варианта с патогенен ефект при 9.8% от пациентите с епилепсия от GEFS+ спектъра (GEFS+ и DS пациенти n=82). Тази честота на откриваемост на патогенни точкови варианти е съизмерима с процента на *SCN1A* точкови мутации по литературни данни (~10%), открити при пациенти с епилепсия от GEFS+ спектъра (51,52). Варианти с вероятно патогенен ефект бяха намерени при четири пациенти от групата с епилепсии от GEFS+ спектъра (4.9%). Три от намерените точкови мутации, водещи до прекъсване на рамката на четене, водят до уточняване на диагнозата от DS при трима пациенти с насочваща диагноза GEFS+ синдром. Те, заедно с останалите генетично-верифицирани пациенти от подгрупа DS, съставляват от 69.2% от пациентите с поставена генетична диагноза DS чрез откритието на патогенен точков вариант в *SCN1A* гена в настоящото проучване (n=13). Това потвърждава наблюденията, че такъв тип мутации водят до изява на по-тежък епилептичен фенотип, отколкото missense мутациите. Освен това, процентът на откриваемост на *SCN1A* мутации при DS пациентите също е съизмерим с този, докладван по литературни данни при случаи на DS (~ 70-80%) (51).

В резултат от директното секвениране на *SLC2A1* гена, в настоящото проучване ние поставихме генетична диагноза на двама пациенти (4.8%) от изследваната група – един пациент с детска абсансна епилепсия и един пациент с тежък GLUT1 DS. И двата варианта са нови, непубликувани досега в литературните източници и бази-данни. Тази честота на откриваемост на точкови варианти е съизмерима с наблюденията на други автори (1-12%), вземайки предвид високата хетерогенност на изява GLUT1 - DS синдрома (17,101,105,284). В допълнение, чрез микрочипов анализ открихме делеция на почти целия *SLC2A1* ген при дете с тежко синдромно състояние. Така, в резултат от прилагането на двата подхода открихме два патогенни варианта от различен тип, засягащи *SLC2A1* гена, като по този начин поставихме генетична диагноза синдром на GLUT1 дефицит.

В резултат от секвенирането на *KCNQ2* гена ние открихме два точкови варианта – един известен missense вариант и една сплайс-място мутация, и двата унаследени от болен баща. В допълнение, чрез MLPA анализ ние идентифицирахме цялостно-генна делеция на едното копие на *KCNQ2* гена, водеща в изява на класически BFNC. По този начин потвърдихме предполагаемата диагноза при трима пациенти със съмнение за BFNC (15.4%). Прилагайки двата подхода за анализ - MLPA и директно секвениране, ние

идентифицирахме генетичната причина за изявата на BFNC фенотип при 23.1% от изследваната група пациенти. Честотата на откриваемост е по-малка от тази по литературни данни (~80-90%) (25,81) и вероятно се дължи на малкия брой случаи (n=13) с класически BFNC фенотип, които изследвахме.

В резултат от провеждането на MLPA анализ при на *SCN1A* и *SLC2A1* гените не успяхме да открием едно- или няколко екзонни делеции, засягащи тези гени при 15 пациента с ИГЕ или DS, негативни за точкови мутации в *SCN1A* гена и 13 със съмнение за GLUT1 DS и негативни за точкови мутации в *SLC2A1* гена. Този факт вероятно отчасти се дължи на малките извадки от пациенти (n=15, 13), а от друга страна потвърждава наблюденията, че големите екзонни делеции са рядка причина за изява на ИГЕ/ГГЕ, DS и GLUT1 DS, в сравнение с точковите мутации в *SCN1A* и *SLC2A1* (51,54,95,105,106). Допълнително, поради хетерогенността на изява на GLUT1 DS се затруднява правилното клинично охарактеризиране и насочване за генетичен анализ, както в настоящото проучване е случая с EP270 и намерената хетерозиготна делеция в *SLC2A1* чрез микрочипов анализ.

В резултат от прилагането на микрочиповия метод на сравнителна геномна хибридизация (aCGH) при 93 пациенти с неизяснено забавяне в развитието или интелектуален дефицит, епилептични пристъпи с или без допълнителни вродени аномалии открихме общо 23 аберации, 15 от които са от потенциален клиничен интерес (15.1%). Осем копийни варианти са генетичната причина за заболяването при 8.6% от селектираната група пациенти. Седем CNVs имат потенциална роля в оформянето на болестния фенотип при 7.5% от изследваната група пациенти. От тях два са нови варианти, засягащи различни райони от дългото рамо на хромозома 15 и неописани досега в литературните източници. Честотата на откриваемост и в тази група е съизмерима с намерената при кохорти с генетични генерализирани епилепсии, епилептични енцефалопатии в комбинация с ИД и симптоматични епилепсии със структурно-мозъчни аномалии (122,219,303).

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

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

8. Изводи

1. Секвенирането по Сангер е предпочитан първи метод за молекулярна диагностика при пациенти с различен тип електро-клинични синдроми, позволяващ в настоящото изследване изясняване значителен процент от случаите с епилепсия от GEFS+ спектъра, абсансни епилепсии и синдром на GLUT1 дефицит, както и случаи на бенигни фамилен неонатални конвулсии.
2. Уточняването на генетичната диагноза синдром на Драве при 69.2% от изследваните случаи има важно значение за избора на правилна антиконвулсанта терапия.
3. Чрез MLPA анализ не бяха установени големи екзонни делеции в *SCN1A* и *SLC2A1* гените при пациенти с ИГЕ, синдром на Драве и абсансни епилепсии, което потвърждава данните от предишни проучвания, че такъв тип мутации са рядка причина за изява на тези видове епилепсии.
4. Микрочиповият метод на сравнителна геномна хибридизация е подходящ първи геномен подход за търсене на микроструктурни промени в хромозомите като причина за изява на комплексни синдромни състояния, включващи епилептични пристъпи в комбинация с интелектуален дефицит, други невропсихически нарушения и вродени аномалии.
5. В зависимост от насочващата диагноза при различните форми на епилепсия с или без допълнителни невропсихични нарушения е необходим различен диагностичен алгоритъм, включващ разнообразни молекулярно-генетични и геномни подходи, като сравнителна геномна хибридизация и секвениране от ново поколение.
6. Поради генетичната хетерогенност на идиопатичните генерализирани епилепсии и синдромните състояния при недиагностицираните пациенти е необходимо секвениране от ново поколение с цел поставяне на генетична диагноза.

9. Приноси

9.1. Приноси с научно - фундаментален характер

- 1.Открити са осем нови, неописани в литературата точкови мутации, засягащи *SCN1A*, *SLC2A1* и *KCNQ2* гените, с което се обогатява спектъра на известни мутации в публичните бази данни.
2. Открити са две нови, непубликувани микроструктурни хромозомни аберации, засягащи дългото рамо на хромозома 15 и свързани с болестния фенотип при пациенти с епилепсия, интелектуален дефицит и вродени аномалии.

9.2. Приноси с научно - приложен характер

1. Поставена е генетична диагноза при 21 пациента (10.1%), което дава възможност за избор на най-подходяща антиконвулсанта терапия, превенция или своевременно лечение на усложненията, прогнозиране на хода на болестта и изясняване на риска от унаследяване при бъдещи бременности.
2. Въведена е за първи път в България микрочиповата технология на сравнителна геномна хибридизация за откриване на микроструктурни геномни промени при пациенти с епилепсия и интелектуален дефицит.
3. Обогатена е съществуващата ДНК банка в Центъра по Молекулна Медицина с нови случаи на епилепсия или по-сложни синдромни състояния, които могат да бъдат основа за бъдещи научни проекти.
4. Изработен е системен подход за диагностика на различни типове епилептични състояния с или без необяснимо забавяне в развитието, интелектуален дефицит и вродени аномалии.

10. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Peycheva V, Ivanova N, Kamenarova K et al., 2016. Impact of KCNQ2 mutations in Bulgarian patients with electroclinical syndromes with onset in the first year of life. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 31(1):138-42. **IF – 1.227**
2. Ivanova N, Peycheva V, Kamenarova K. et al., 2018. Three novel SLC2A1 mutations in Bulgarian patients with different forms of genetic generalized epilepsy reflecting the clinical and genetic diversity of GLUT1-deficiency syndrome. Seizure. 54:41-4. **IF – 2.839**
3. Peycheva V, Kamenarova K, Ivanova N et al., 2018. Chromosomal microarray analysis of Bulgarian patients with epilepsy and intellectual disability. Gene. 667:45-55. **IF – 2.498**

ОБЩ ИМПАКТ ФАКТОР: 6.564

11. НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **V. Peycheva**, K. Kamenarova, N. Ivanova, P. Dimova, S. Zhelyazkova, D. Avdjieva, E. Slavkova, G. Maksimov, V. Stoyanova, I. Litvinenko, I. Tournev, V. Bozhinova², V. Mitev, A. Jordanova, R. Kaneva. Recurrent CNVs in 15q11.2-q12 in Bulgarian patients with generalized epilepsy and intellectual disability. Poster presentation, The European Human Genetics Conference, May 31-June 3, 2014, 22, Milan, Italy.
2. **В. Пейчева**, Н. Иванова, К. Каменарова, И. Цекова, И. Александрова, В. Божинова, И. Литвиненко, Р. Георгиева, Д. Христова, М. Божидарова, В. Митев, Р. Кънева, А. Йорданова. Молекулни дефекти в ген KCNQ2 при пациенти с бенигнени неонатални форми на епилепсия и електро-клинични синдроми. Постерна презентация, Национална конференция по детска неврология, психиатрия и психология на развитието, 23-25 октомври 2014, Парк хотел „Москва”, София
3. И. Александрова, В. Божинова, Н. Иванова, Е. Славкова, П. Димова, **В. Пейчева**, Р. Кънева, А. Йорданова. Мутация в KCNQ2 гена: рядка причина за Роландова епилепсия. Постерна презентация, Национална конференция по детска неврология, психиатрия и психология на развитието, 23-25 октомври 2014, Парк хотел „Москва”, София.
4. **В. Пейчева**, К. Каменарова, Н. Иванова. Микрочипов анализ за откриване на геномни аберации при епилепсия и умствено изоставане. Устна презентация, Симпозиум „Акад. Чудомир Начев”, 25 октомври 2014, Салон на БАН, София
5. **V. Peycheva**, N. Ivanova, S. Zhelyazkova, M. Bozhidarova, E. Slavkova, G. Sarailieva, G. Maksimov, D. Deneva, V. Dimova, I. Litvinenko, I. Tournev, V. Bozhinova, V. Mitev, A. Jordanova, R. Kaneva. Recurrent CNVs within 17q12 region found in Bulgarian patients with complex epileptic syndromes. Poster presentation, The European Human Genetics Conference, 6-9 June, 2015, 23, Glasgow, United Kingdom.
6. **V. Peycheva**, N. Ivanova, G. Maksimov, V. Bozhinova, V. Mitev, A. Jordanova, R. Kaneva. 7p22.3 microdeletion and 6q26 microduplication found in Bulgarian patients with generalized epilepsy, autistic features and intellectual disability. Poster presentation. 12th European Congress on Epileptology, September 11-15, 2016, Prague, Czech Republic.
7. **В. Пейчева**, Н. Иванова, В. Божинова, В. Митев, А. Йорданова, Р. Кънева. 7p22.3 микроделация и 6q26 микродупликация в български пациенти с комплексни епилептични

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

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

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

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

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

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

12. УЧАСТИЯ В ПРОЕКТИ:

- **2014-2015 ДТК02/67**, финансиран от ФНИ, МОН „Съвременни подходи за разкриване генетичните основи на епилепсията“, участник
- **2015-2016 357/2015**, финансиран от СМН, МУ-София „Потвърждаване на потенциално патогенни хромозомни микроаберации при пациенти с епилепсия и умствено изоставане, открити чрез метода на сравнителната геномна хибридизация“, ръководител
- **2016-2017 444/2016**, финансиран от СМН, МУ-София „Количествен PCR в реално време на хромозомни микроаберации, открити при пациенти с комплексни епилептични синдроми чрез микрочипова технология“, ръководител

Библиография:

1. Eltze CM, Chong WK, Cox T, Whitney A, Cortina- Borja M, Chin RF, Scott RC, Cross JH. A population- based study of newly diagnosed epilepsy in infants. *Epilepsia*. 2013 Mar;54(3):437-45.
2. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon CS, Dykeman J, Pringsheim T, Lorenzetti DL, Jetté N. Prevalence and incidence of epilepsy A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology*. 2016 Dec 16:10-212.
3. Миланов И, Божинова В, Търнев И. Национален консенсус за диагностика и лечение на епилепсията. *Българска неврология*. 2016;17(2).
4. Neligan A, Bell GS, Shorvon SD, Sander JW. Temporal trends in the mortality of people with epilepsy: a review. *Epilepsia*. 2010 Nov;51(11):2241-6.
5. Ding D, Wang W, Wu J, Yang H, Li S, Dai X, Yang B, Wang T, Yuan C, Ma G, Bell GS. Premature mortality risk in people with convulsive epilepsy: long follow-up of a cohort in rural China. *Epilepsia*. 2013 Mar;54(3):512-7.
6. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014 Apr 1;55(4):475-82.
7. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé SL. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia*. 2010 Apr;51(4):676-85.
8. Helbig I, Heinzen EL, Mefford HC, ILAE Genetics Commission, Berkovic SF, Lowenstein DH, Kato M, Helen Cross J, Satishchandra P, De Jonghe P, Jiang Y. Primer Part 1—The building blocks of epilepsy genetics. *Epilepsia*. 2016 Jun;57(6):861-8.
9. Metrakos K, Metrakos JD. Genetics of epilepsy. *Handbook of clinical neurology*. 1974;15:429-39.
10. Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Jackson GD, Guerrini R, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. *Neurology*. 2005 Dec 27;65(12):1873-87.
11. Fisher RS, Cross JH, D'souza C, French JA, Haut SR, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, Lagae L, Moshé SL, Peltola J. Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia*. 2017 Apr 1;58(4):531-42.
12. Wolf P, Yacubian EM, Avanzini G, Sander T, Schmitz B, Wandschneider B, Koepp M. Juvenile myoclonic epilepsy: a system disorder of the brain. *Epilepsy research*. 2015 Aug 1;114:2-12.
13. Kelley SA, Kossoff EH. Doose syndrome (myoclonic–astatic epilepsy): 40 years of progress. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 2010 Nov 1;52(11):988-93.
14. Jallon P, Loiseau P, Loiseau J. Newly diagnosed unprovoked epileptic seizures: presentation at diagnosis in CAROLE study. *Epilepsia*. 2001 Apr 20;42(4):464-75.
15. Berkovic SF, Howell RA, Hay DA, Hopper JL. Epilepsies in twins: genetics of the major epilepsy syndromes. *Annals of neurology*. 1998 Apr 1;43(4):435-45.
16. Stafstrom CE. Severe epilepsy syndromes of early childhood: the link between genetics and pathophysiology with a focus on SCN1A mutations. *Journal of child neurology*. 2009 Aug;24(8_suppl):15S-23S.

17. Suls A, Mullen SA, Weber YG, Verhaert K, Ceulemans B, Guerrini R, Wuttke TV, Salvo-Vargas A, Deprez L, Claes LR, Jordanova A. Early-onset absence epilepsy caused by mutations in the glucose transporter GLUT1. *Annals of neurology*. 2009 Sep 1;66(3):415-9.
18. Kalachikov, Sergey, et al. "Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features." *Nature genetics* 30.3 (2002): 335.
19. Lemke JR, Hendrickx R, Geider K, Laube B, Schwake M, Harvey RJ, James VM, Pepler A, Steiner I, Hörtnagel K, Neidhardt J. GRIN2B mutations in West syndrome and intellectual disability with focal epilepsy. *Annals of neurology*. 2014 Jan;75(1):147-54.
20. Johnson EW, Dubovsky J, Rich SS, O'Donovan CA, Orr HT, Anderson VE, Gil-Nagel A, Ahmann P, Dokken CG, Schneider DT, Weber JL. Evidence for a novel gene for familial febrile convulsions, FEB2, linked to chromosome 19p in an extended family from the Midwest. *Human molecular genetics*. 1998 Jan 1;7(1):63-7.
21. Deprez L, Jansen A, De Jonghe P. Genetics of epilepsy syndromes starting in the first year of life. *Neurology*. 2009 Jan 20;72(3):273-81.
22. Pandolfo M. Genetics of epilepsy. In *Seminars in neurology* 2011 Nov (Vol. 31, No. 05, pp. 506-518). © Thieme Medical Publishers.
23. Scheffer IE, Berkovic SF. Generalized epilepsy with febrile seizures plus. A genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes. *Brain: a journal of neurology*. 1997 Mar 1;120(3):479-90.
24. Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B, Lagae L, Van Broeckhoven C, De Jonghe P. De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *The American Journal of Human Genetics*. 2001 Jun 1;68(6):1327-32.
25. Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, Ronen GM, Bjerre I, Quattlebaum T, Murphy JV, McHarg ML. A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nature genetics*. 1998 Jan;18(1):25.
26. Mancardi M, Striano P, Gennaro E, Madia F, Paravidino R, Scapolan S, Dalla Bernardina B, Bertini E, Bianchi A, Capovilla G, Darra F. Familial occurrence of febrile seizures and epilepsy in severe myoclonic epilepsy of infancy (SMEI) patients with SCN1A mutations. *Epilepsia*. 2006 Oct 1;47(10):1629-35.
27. Escayg A, Goldin AL. Sodium channel SCN1A and epilepsy: mutations and mechanisms. *Epilepsia*. 2010 Sep 1;51(9):1650-8.
28. Dravet C. Les epilepsies graves de l'enfant. *Vie méd*. 1978;8:543-8.
29. Guerrini R. Dravet syndrome: the main issues. *European Journal of Paediatric Neurology*. 2012 Sep 1;16:S1-4.
30. Bayat A, Hjalgrim H, Møller RS. The incidence of SCN1A-related Dravet syndrome in Denmark is 1: 22,000: a population-based study from 2004 to 2009. *Epilepsia*. 2015 Apr 1;56(4).
31. Dravet C, Bureau M, Oguni H, Fukuyama Y, Cokar O. Severe myoclonic epilepsy in infancy (Dravet syndrome). *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence*. 2005;4:89-113.
32. Ragona F, Granata T, Bernardina BD, Offredi F, Darra F, Battaglia D, Morbi M, Brazzo D, Cappelletti S, Chieffo D, De Giorgi I. Cognitive development in Dravet syndrome: a retrospective, multicenter study of 26 patients. *Epilepsia*. 2011 Feb 1;52(2):386-92.
33. Cassé-Perrot C, Wolff M, Dravet C. Neuropsychological aspects of severe myoclonic epilepsy in infancy. In *Neuropsychology of childhood epilepsy 2001* (pp. 131-140). Springer, Boston, MA.
34. Battaglia D, Chieffo D, Siracusano R, de Waure C, Brogna C, Ranalli D, Contaldo I, Tortorella G, Dravet C, Mercuri E, Guzzetta F. Cognitive decline in Dravet syndrome: is there a cerebellar role?. *Epilepsy research*. 2013 Sep 1;106(1-2):211-21.

35. Weiss LA, Escayg A, Kearney JA, Trudeau M, MacDonald BT, Mori M, Reichert J, Buxbaum JD, Meisler MH. Sodium channels SCN1A, SCN2A and SCN3A in familial autism. *Molecular psychiatry*. 2003 Feb;8(2):186.
36. Jansen FE, Sadleir LG, Harkin LA, Vadlamudi L, McMahon JM, Mulley JC, Scheffer IE, Berkovic SF. Severe myoclonic epilepsy of infancy (Dravet syndrome): recognition and diagnosis in adults. *Neurology*. 2006 Dec 26;67(12):2224-6.
37. Singh R, Scheffer IE, Crossland K, Berkovic SF. Generalized epilepsy with febrile seizures plus: a common childhood-onset genetic epilepsy syndrome. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. 1999 Jan;45(1):75-81.
38. Fujiwara T, Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, Takahashi Y, Fukushima K, Watanabe M, Hara K, Morikawa T, Yagi K, Yamakawa K, Inoue Y. Mutations of sodium channel α subunit type 1 (SCN1A) in intractable childhood epilepsies with frequent generalized tonic-clonic seizures. *Brain*. 2003 Mar 1;126(3):531-46.
39. Kimura K, Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, Hoshino K, Nomura Y, Tateno A, Hachimori K, Yamakawa K, Segawa M. A missense mutation in SCN1A in brothers with severe myoclonic epilepsy in infancy (SMEI) inherited from a father with febrile seizures. *Brain and Development*. 2005 Sep 1;27(6):424-30.
40. Ohmori I, Ohtsuka Y, Ouchida M, Ogino T, Maniwa S, Shimizu K, Oka E. Is phenotype difference in severe myoclonic epilepsy in infancy related to SCN1A mutations? *Brain Dev*. 2003 Oct;25(7):488-93.
41. Fukuma G, Oguni H, Shirasaka Y, Watanabe K, Miyajima T, Yasumoto S, Ohfu M, Inoue T, Watanachai A, Kira R, Matsuo M. Mutations of Neuronal Voltage-gated Na⁺ Channel α 1 Subunit Gene SCN1A in Core Severe Myoclonic Epilepsy in Infancy (SMEI) and in Borderline SMEI (SMEB). *Epilepsia*. 2004 Feb 1;45(2):140-8.
42. Dose H, Gerken H, Leonhardt R, Völzke E, Völz C. Centrencephalic Myoclonic-Astatic Petit Mal1—Clinical and genetic investigations. *Neuropädiatrie*. 1970 Aug;2(01):59-78.
43. Neubauer BA, Hahn A, Dose H, Tuxhorn I. Myoclonic-Astatic Epilepsy of Early Childhood—Definition, Course, Nosography. *Myoclonic Epilepsies*. 2005;95:147.
44. Oguni H, Tanaka T, Hayashi K, Funatsuka M, Sakauchi M, Shirakawa S, Osawa M. Treatment and long-term prognosis of myoclonic-astatic epilepsy of early childhood. *Neuropediatrics*. 2002 Jun 1;33(3):122-32.
45. Escayg A, Heils A, MacDonald BT, Haug K, Sander T, Meisler MH. A novel SCN1A mutation associated with generalized epilepsy with febrile seizures plus—and prevalence of variants in patients with epilepsy. *American journal of human genetics*. 2001; 68(4):866–73.
46. Kaminska A, Ickowicz A, Plouin P, Bru MF, Dellatolas G, Dulac O. Delineation of cryptogenic Lennox–Gastaut syndrome and myoclonic astatic epilepsy using multiple correspondence analysis. *Epilepsy research*. 1999 Aug 1;36(1):15-29.
47. Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 2000 Apr 30;26(1):13-25.
48. Trimmer JS, Rhodes KJ. Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain. *Annu. Rev. Physiol.*. 2004 Mar 17;66:477-519.
49. de Lera Ruiz M, Kraus RL. Voltage-gated sodium channels: structure, function, pharmacology, and clinical indications. *Journal of medicinal chemistry*. 2015 May 14;58(18):7093-118.
50. Williams CA, Battaglia A. Molecular biology of epilepsy genes. *Experimental neurology*. 2013 Jun 1;244:51-8.

51. Marini C, Scheffer IE, Nabbout R, Suls A, De Jonghe P, Zara F, Guerrini R. The genetics of Dravet syndrome. *Epilepsia*. 2011 Apr;52:24-9.
52. McTague A, Howell KB, Cross JH, Kurian MA, Scheffer IE. The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *The Lancet Neurology*. 2016 Mar 1;15(3):304-16.
53. Suls A, Claeys KG, Goossens D, Harding B, Van Luijk R, Scheers S, Deprez L, Audenaert D, Van Dyck T, Beeckmans S, Smouts I. Microdeletions involving the SCN1A gene may be common in SCN1A- mutation- negative SMEI patients. *Human mutation*. 2006 Sep 1;27(9):914-20.
54. Marini C, Scheffer IE, Nabbout R, Mei D, Cox K, Dibbens LM, McMahon JM, Iona X, Carpintero RS, Elia M, Cilio MR. SCN1A duplications and deletions detected in Dravet syndrome: implications for molecular diagnosis. *Epilepsia*. 2009 Jul 1;50(7):1670-8.
55. Harkin LA, McMahon JM, Iona X, Dibbens L, Pelekanos JT, Zuberi SM, Sadleir LG, Andermann E, Gill D, Farrell K, Connolly M. The spectrum of SCN1A-related infantile epileptic encephalopathies. *Brain*. 2007 Mar 1;130(3):843-52.
56. Claes LR, Deprez L, Suls A, Baets J, Smets K, Van Dyck T, Deconinck T, Jordanova A, De Jonghe P. The SCN1A variant database: a novel research and diagnostic tool. *Human mutation*. 2009 Oct;30(10):E904-20.
57. Zuberi SM, Brunklaus A, Birch R, Reavey E, Duncan J, Forbes GH. Genotype–phenotype associations in SCN1A-related epilepsies. *Neurology*. 2011 Feb 15;76(7):594-600.
58. Nicita F, Spalice A, Papetti L, Ursitti F, Parisi P, Gennaro E, Zara F, Iannetti P. Genotype-phenotype correlations in a group of 15 SCN1A-mutated Italian patients with GEFS+ spectrum (seizures plus, classical and borderline severe myoclonic epilepsy of infancy). *Journal of child neurology*. 2010 Nov;25(11):1369-76.
59. Kanai K, Yoshida S, Hirose S, Oguni H, Kuwabara S, Sawai S, Hiraga A, Fukuma G, Iwasa H, Kojima T, Kaneko S. Physico-chemical property changes of amino acid residue accompanied with missense mutations in SCN1A affect the epilepsy phenotype severity. *Journal of medical genetics*. 2009 Jul 7.
60. Kanai K, Hirose S, Oguni H, Fukuma G, Shirasaka Y, Miyajima T, Wada K, Iwasa H, Yasumoto S, Matsuo M, Ito M. Effect of localization of missense mutations in SCN1A on epilepsy phenotype severity. *Neurology*. 2004 Jul 27;63(2):329-34.
61. Shi X, Yasumoto S, Kurahashi H, Nakagawa E, Fukasawa T, Uchiya S, Hirose S. Clinical spectrum of SCN2A mutations. *Brain and Development*. 2012 Aug 1;34(7):541-5.
62. Carvill GL, Weckhuysen S, McMahon JM, Hartmann C, Møller RS, Hjalgrim H, Cook J, Geraghty E, O’Roak BJ, Petrou S, Clarke A. GABRA1 and STXBP1: novel genetic causes of Dravet syndrome. *Neurology*. 2014 Apr 8;82(14):1245-53.
63. Martin MS, Tang B, Papale LA, Yu FH, Catterall WA, Escayg A. The voltage-gated sodium channel Scn8a is a genetic modifier of severe myoclonic epilepsy of infancy. *Human molecular genetics*. 2007 Sep 19;16(23):2892-9.
64. Ohmori I, Ouchida M, Miki T, Mimaki N, Kiyonaka S, Nishiki T, Tomizawa K, Mori Y, Matsui H. A CACNB4 mutation shows that altered Cav2. 1 function may be a genetic modifier of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Neurobiology of disease*. 2008 Dec 1;32(3):349-54.
65. Singh NA, Pappas C, Dahle EJ, Claes LR, Pruess TH, De Jonghe P, Thompson J, Dixon M, Gurnett C, Peiffer A, White HS. A role of SCN9A in human epilepsies, as a cause of febrile seizures and as a potential modifier of Dravet syndrome. *PLoS genetics*. 2009 Sep 18;5(9):e1000649.

66. Davidsson J, Collin A, Olsson ME, Lundgren J, Soller M. Deletion of the SCN gene cluster on 2q24. 4 is associated with severe epilepsy: an array-based genotype–phenotype correlation and a comprehensive review of previously published cases. *Epilepsy research*. 2008 Sep 1;81(1):69-79.
67. Okumura A, Yamamoto T, Kurahashi H, Takasu M. Epilepsies in Children with 2q24. 3 Deletion/Duplication. *Journal of Pediatric Epilepsy*. 2015 Mar;4(01):008-16.
68. Yu ZY, Wang W, Fritschy JM, Witte OW, Redecker C. Changes in neocortical and hippocampal GABAA receptor subunit distribution during brain maturation and aging. *Brain research*. 2006 Jul 12;1099(1):73-81.
69. Chen Y, Frank HY, Sharp EM, Beacham D, Scheuer T, Catterall WA. Functional properties and differential neuromodulation of Na V 1.6 channels. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2008 Aug 4;38(4):607-15.
70. Blumenfeld H, Lampert A, Klein JP, Mission J, Chen MC, Rivera M, Dib-Hajj S, Brennan AR, Hains BC, Waxman SG. Role of hippocampal sodium channel Nav1. 6 in kindling epileptogenesis. *Epilepsia*. 2009 Jan;50(1):44-55.
71. Löscher W. Preclinical assessment of proconvulsant drug activity and its relevance for predicting adverse events in humans. *European journal of pharmacology*. 2009 May 21;610(1-3):1-1.
72. Ängelsten M, Ben-Menachem E, Rönnebeck L, Hansson E. Novel mechanisms of action of three antiepileptic drugs, vigabatrin, tiagabine, and topiramate. *Neurochemical research*. 2003 Feb 1;28(2):333-40.
73. Sankar R. GABA A receptor physiology and its relationship to the mechanism of action of the 1, 5-benzodiazepine clobazam. *CNS drugs*. 2012 Mar 1;26(3):229-44.
74. Weckhuysen, S., Mandelstam, S., Suls, A., Audenaert, D., Deconinck, T., Claes, L. R. F., Deprez, L., Smets, K., Hristova, D., Yordanova, I., Jordanova, A., Ceulemans, B., and 11 others. KCNQ2 encephalopathy: emerging phenotype of a neonatal epileptic encephalopathy. *Ann. Neurol*. 71: 15-25, 2012.
75. Steinlein OK, Conrad C, Weidner B. Benign familial neonatal convulsions: always benign?. *Epilepsy research*. 2007 Mar 1;73(3):245-9.
76. Berkovic SF, Heron SE, Giordano L, Marini C, Guerrini R, Kaplan RE, Gambardella A, Steinlein OK, Grinton BE, Dean JT, Bordo L. Benign familial neonatal-infantile seizures: characterization of a new sodium channelopathy. *Annals of neurology*. 2004 Apr 1;55(4):550-7.
77. Vigeveno F, Fusco L, Di Capua M, Ricci S, Sebastianelli R, Lucchini P. Benign infantile familial convulsions. *European journal of pediatrics*. 1992 Aug 1;151(8):608-12.
78. Vankmolkot KR, Kors EE, Hottenga JJ. Novel mutations in the Na, K-ATPase pump gene ATP1A2 associated with familial hemiplegic migraine and benign familial infantile convulsions. *Ann Neurol*. 2003;54:360-6.
79. Choveau F, Shapiro MS. Regions of KCNQ K⁺ channels controlling functional expression. *Frontiers in physiology*. 2012 Oct 16;3:397.
80. Surti TS, Huang L, Jan YN, Jan LY, Cooper EC. Identification by mass spectrometry and functional characterization of two phosphorylation sites of KCNQ2/KCNQ3 channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 Dec 6;102(49):17828-33.
81. Zara F, Specchio N, Striano P, Robbiano A, Gennaro E, Paravidino R, Vanni N, Beccaria F, Capovilla G, Bianchi A, Caffi L, Cardilli V, Darra F, Bernardina BD, Fusco L, Gaggero R, Giordano L, Guerrini R, Incorpora G, Mastrangelo M, Spaccini L, Laverda AM, Vecchi M, Vanadia F, Veggioni P, Viri M, Occhi G, Budetta M, Taglialatela M, Coviello DA, Vigeveno F,

- Minetti C. Genetic testing in benign familial epilepsies of the first year of life: clinical and diagnostic significance. *Epilepsia*. 2013 Mar;54(3):425-36
82. Schwarz JR, Reid G, Bostock H. Action potentials and membrane currents in the human node of Ranvier. *Pflügers Arch* 1995; 430: 283–92.
83. Heron SE, Cox K, Grinton BE, Zuberi SM, Kivity S, Afawi Z, Straussberg R, Berkovic SF, Scheffer IE, Mulley JC. Deletions or duplications in KCNQ2 can cause benign familial neonatal seizures. *J Med Genet*. 2007 Dec;44(12):791-6.
84. Kato M, Yamagata T, Kubota M, Arai H, Yamashita S, Nakagawa T, Fujii T, Sugai K, Imai K, Uster T, Chitayat D. Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation. *Epilepsia*. 2013 Jul 1;54(7):1282-7.
85. Fister P, Soltirovska-Salamon A, Debeljak M, Paro-Panjan D. Benign familial neonatal convulsions caused by mutation in KCNQ3, exon 6: A European case. *Eur J Paediatr Neurol*. 2012 Nov 9.
86. Schubert J, Paravidino R, Becker F, Berger A, Bebek N, Bianchi A, Brockmann K, Capovilla G, Dalla Bernardina B, Fukuyama Y, Hoffmann GF. PRRT2 mutations are the major cause of benign familial infantile seizures. *Human mutation*. 2012 Oct 1;33(10):1439-43.
87. Yalçın Ö. Genes and molecular mechanisms involved in the epileptogenesis of idiopathic absence epilepsies. *Seizure-European Journal of Epilepsy*. 2012 Mar 1;21(2):79-86.
88. Crunelli V, Leresche N. Childhood absence epilepsy: genes, channels, neurons and networks. *Nat Rev Neurosci*. 2002 May; 3(5):371-82.
89. Prasad DK, Satyanarayana U, Munshi A. Genetics of idiopathic generalized epilepsy: An overview. *Neurology India*. 2013 Nov 1;61(6):572.
90. Guerrini R, Sanchez-Carpintero R, Deonna T, et al. Early-onset absence epilepsy and paroxysmal dyskinesia. *Epilepsia*. 2002; 43:1224 –1229.
91. De Vivo DC, Trifiletti RR, Jacobson RI, Ronen GM, Behmand RA, Harik SI. Defective glucose transport across the blood-brain barrier as a cause of persistent hypoglycorrhachia, seizures, and developmental delay. *New England Journal of Medicine*. 1991 Sep 5;325(10):703-9.
92. Wang D, Pascual JM, Yang H, Engelstad K, Jhung S, Sun RP, De Vivo DC. Glut-1 deficiency syndrome: Clinical, genetic, and therapeutic aspects. *Annals of neurology*. 2005 Jan 1;57(1):111-8.
93. Larsen J, Johannesen KM, Ek J, Tang S, Marini C, Blichfeldt S, Kibæk M, Spiczak S, Weckhuysen S, Frangu M, Neubauer BA. The role of SLC2A1 mutations in myoclonic astatic epilepsy and absence epilepsy, and the estimated frequency of GLUT1 deficiency syndrome. *Epilepsia*. 2015 Dec 1;56(12).
94. Pong AW, Geary BR, Engelstad KM, Natarajan A, Yang H, De Vivo DC. Glucose transporter type I deficiency syndrome: epilepsy phenotypes and outcomes. *Epilepsia*. 2012 Sep 1;53(9):1503-10.
95. Leen WG, Klepper J, Verbeek MM, Leferink M, Hofste T, van Engelen BG, Wevers RA, Arthur T, Bahi-Buisson N, Ballhausen D, Bekhof J. Glucose transporter-1 deficiency syndrome: the expanding clinical and genetic spectrum of a treatable disorder. *Brain*. 2010 Feb 2;133(3):655-70.
96. De Giorgis V, Veggiotti P. GLUT1 deficiency syndrome 2013: current state of the art. *Seizure-European Journal of Epilepsy*. 2013 Dec 1;22(10):803-11.
97. Suls A, Dedeken P, Goffin K, Van Esch H, Dupont P, Cassiman D, Kempfle J, Wuttke TV, Weber Y, Lerche H, Afawi Z. Paroxysmal exercise-induced dyskinesia and epilepsy is due to

- mutations in SLC2A1, encoding the glucose transporter GLUT1. *Brain*. 2008 Jun 26;131(7):1831-44.
98. Mullen SA, Suls A, De Jonghe P, Berkovic SF, Scheffer IE. Absence epilepsies with widely variable onset are a key feature of familial GLUT1 deficiency. *Neurology*. 2010;75(5):432-440. 12.
 99. Striano P, Weber YG, Tolia MR, Schubert J, Leu C, Chaimana R, Baulac S, Guerrero R, LeGuern E, Lehesjoki AE, Polvi A. GLUT1 mutations are a rare cause of familial idiopathic generalized epilepsy. *Neurology*. 2012 Jan 25;WNL-0b013e318247ff54.
 100. Tang S, Pal DK. Dissecting the genetic basis of myoclonic-astatic epilepsy. *Epilepsia*. 2012 Aug;53(8):1303-13.
 101. Arsov T, Mullen SA, Damiano JA, Lawrence KM, Huh LL, Nolan M, Young H, Thouin A, Dahl HH, Berkovic SF, Crompton DE. Early onset absence epilepsy: 1 in 10 cases is caused by GLUT1 deficiency. *Epilepsia*. 2012 Dec 1;53(12).
 102. Muhle H, Helbig I, Fröslev TG, Suls A, von Spiczak S, Klitten LL, Dahl HA, Brusgaard K, Neubauer B, De Jonghe P, Tommerup N. The role of SLC2A1 in early onset and childhood absence epilepsies. *Epilepsy research*. 2013 Jul 1;105(1-2):229-33.
 103. Mullen SA, Marini C, Suls A, Mei D, Della Giustina E, Buti D, Arsov T, Damiano J, Lawrence K, De Jonghe P, Berkovic SF. Glucose transporter 1 deficiency as a treatable cause of myoclonic astatic epilepsy. *Archives of neurology*. 2011 Sep 1;68(9):1152-5.
 104. Thouin A, Crompton DE. Glut1 deficiency syndrome: Absence epilepsy and La Soupe du Jour. *Practical neurology*. 2015 Sep 3;practneurol-2015.
 105. Arsov T, Mullen SA, Rogers S, Phillips AM, Lawrence KM, Damiano JA, Goldberg-Stern H, Afawi Z, Kivity S, Trager C, Petrou S. Glucose transporter 1 deficiency in the idiopathic generalized epilepsies. *Annals of neurology*. 2012 Nov;72(5):807-15.
 106. Yang H, Wang D, Engelstad K, Bagay L, Wei Y, Rotstein M, Aggarwal V, Levy B, Ma L, Chung WK, De Vivo DC. Glut1 deficiency syndrome and erythrocyte glucose uptake assay. *Annals of neurology*. 2011 Dec 1;70(6):996-1005.
 107. Engel J. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2001 Jun 1;42(6):796-803.
 108. Mastrangelo M. Novel genes of early-onset epileptic encephalopathies: from genotype to phenotypes. *Pediatric neurology*. 2015 Aug 1;53(2):119-29.
 109. Verrotti A, Cusmai R, Laino D, Falsaperla R, Margari L, Rizzo R, Savasta S, Grosso S, Striano P, Belcastro V, Franzoni E. Long-term outcome of epilepsy in patients with Prader–Willi syndrome. *Journal of neurology*. 2015 Jan 1;262(1):116-23.
 110. Santini E, Klann E. Genetically dissecting cortical neurons involved in epilepsy in Angelman syndrome. *Neuron*. 2016 Apr 6;90(1):1-3.
 111. Li J, Cai T, Jiang Y, Chen H, He X, Chen C, Li X, Shao Q, Ran X, Li Z, Xia K. Genes with de novo mutations are shared by four neuropsychiatric disorders discovered from NPdenovo database. *Molecular psychiatry*. 2016 Feb;21(2):290.
 112. Crumrine PK. Lennox-Gastaut syndrome. *Journal of child neurology*. 2002 Jan;17(1_suppl):S70-5.
 113. Kato M, Saitoh S, Kamei A, Shiraishi H, Ueda Y, Akasaka M, Tohyama J, Akasaka N, Hayasaka K. A longer polyalanine expansion mutation in the ARX gene causes early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst pattern (Ohtahara syndrome). *The American Journal of Human Genetics*. 2007 Aug 1;81(2):361-6.

114. Allen AS, Berkovic SF, Cossette P, Delanty N, Dlugos D, Eichler EE, Epstein MP, Glauser T, Goldstein DB, Han Y, Heinzen EL. De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature*. 2013 Sep;501(7466):217.
115. Veeramah KR, Johnstone L, Karafet TM, Wolf D, Sprissler R, Salogiannis J, Barth-Maron A, Greenberg ME, Stuhlmann T, Weinert S, Jentsch TJ. Exome sequencing reveals new causal mutations in children with epileptic encephalopathies. *Epilepsia*. 2013 Jul;54(7):1270-81.
116. Helbig I, Mefford HC, Sharp AJ, Guipponi M, Fichera M, Franke A, Muhle H, De Kovel C, Baker C, Von Spiczak S, Kron KL. 15q13. 3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy. *Nature genetics*. 2009 Feb;41(2):160.
117. Pang AW, MacDonald JR, Pinto D, Wei J, Rafiq MA, Conrad DF, Park H, Hurles ME, Lee C, Venter JC, Kirkness EF. Towards a comprehensive structural variation map of an individual human genome. *Genome biology*. 2010 May;11(5):R52.
118. De Kovel CG, Trucks H, Helbig I, Mefford HC, Baker C, Leu C, Kluck C, Muhle H, Von Spiczak S, Ostertag P, Obermeier T. Recurrent microdeletions at 15q11. 2 and 16p13. 11 predispose to idiopathic generalized epilepsies. *Brain*. 2009 Oct 20;133(1):23-32.
119. Mefford, H.C., Yendle, S.C., Hsu, C., Cook, J., Geraghty, E., McMahon, J.M., Eeg-Olofsson, O., Sadleir, L.G., Gill, D., Ben-Zeev, B. and Lerman-Sagie, T., 2011. Rare copy number variants are an important cause of epileptic encephalopathies. *Annals of neurology*, 70(6), pp.974-985.
120. Mullen SA, Carvill GL, Bellows S, Bayly MA, Berkovic SF, Dibbens LM, Scheffer IE, Mefford HC. Copy number variants are frequent in genetic generalized epilepsy with intellectual disability. *Neurology*. 2013 Oct 22;81(17):1507-14.
121. Sharp AJ, Mefford HC, Li K, et al. A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nat. Genet*. 2008;40:322-8.
122. Mefford HC, Muhle H, Ostertag P, von Spiczak S, Buysse K, Baker C, Franke A, Malafosse A, Genton P, Thomas P, Gurnett CA. Genome-wide copy number variation in epilepsy: novel susceptibility loci in idiopathic generalized and focal epilepsies. *PLoS genetics*. 2010 May 20;6(5):e1000962.
123. Nicholl J, Waters W, Mulley JC, Suwalski S, Brown S, Hull Y, Barnett C, Haan E, Thompson EM, Liebelt J, McGregor L. Cognitive deficit and autism spectrum disorders: prospective diagnosis by array CGH. *Pathology*. 2014 Jan 1;46(1):41-5.
124. Nevado J, Mergener R, Palomares-Bralo M, Souza KR, Vallespín E, Mena R, Martínez-Glez V, Mori MÁ, Santos F, García-Miñaur S, García-Santiago F. New microdeletion and microduplication syndromes: A comprehensive review. *Genetics and molecular biology*. 2014;37(1):210-9.
125. Watson CT, Tomas MB, Sharp AJ, Mefford HC. The genetics of microdeletion and microduplication syndromes: an update. *Annual review of genomics and human genetics*. 2014 Aug 31;15:215-44.
126. Butler MG, Meaney FJ, Palmer CG, Opitz JM, Reynolds JF. Clinical and cytogenetic survey of 39 individuals with Prader-Labhart-Willi syndrome. *American journal of medical genetics*. 1986 Mar;23(3):793-809.
127. Edelman L, Pandita RK, Spiteri E, Funke B, Goldberg R, Palanisamy N, Chaganti RS, Magenis E, Shprintzen RJ, Morrow BE. A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. *Human molecular genetics*. 1999 Jul 1;8(7):1157-67.
128. Ensenaer RE, Adeyinka A, Flynn HC, Michels VV, Lindor NM, Dawson DB, Thorland EC, Lorentz CP, Goldstein JL, McDonald MT, Smith WE. Microduplication 22q11. 2, an

- emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. *The American Journal of Human Genetics*. 2003 Nov 1;73(5):1027-40.
129. Jurado LP, Peoples R, Kaplan P, Hamel BC, Francke U. Molecular definition of the chromosome 7 deletion in Williams syndrome and parent-of-origin effects on growth. *American journal of human genetics*. 1996 Oct;59(4):781.
 130. Sharp AJ, Selzer RR, Veltman JA, Gimelli S, Gimelli G, Striano P, Coppola A, Regan R, Price SM, Knoers NV, Eis PS. Characterization of a recurrent 15q24 microdeletion syndrome. *Human molecular genetics*. 2007 Mar 1;16(5):567-72.
 131. Nagamani SC, Erez A, Shen J, Li C, Roeder E, Cox S, Karaviti L, Pearson M, Kang SH, Sahoo T, Lalani SR. Clinical spectrum associated with recurrent genomic rearrangements in chromosome 17q12. *European Journal of Human Genetics*. 2010 Mar;18(3):278.
 132. Shaffer LG, Kashork CD, Saleki R, Rorem E, Sundin K, Ballif BC, Bejjani BA. Targeted genomic microarray analysis for identification of chromosome abnormalities in 1500 consecutive clinical cases. *The Journal of pediatrics*. 2006 Jul 1;149(1):98-102.
 133. Stefansson H, Rujescu D, Cichon S, Pietiläinen OP, Ingason A, Steinberg S, Fossdal R, Sigurdsson E, Sigmundsson T, Buizer-Voskamp JE, Hansen T. Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *nature*. 2008 Sep;455(7210):232.
 134. Pagnamenta AT, Wing K, Sadighi Akha E, et al. A 15q13.3 microdeletion segregating with autism. *Eur J. Hum. Genet*. 2009; 17:687-92.
 135. Hormozdiari F, Penn O, Borenstein E, Eichler EE. The discovery of integrated gene networks for autism and related disorders. *Genome research*. 2015 Jan 1;25(1):142-54.
 136. Hormozdiari F, Penn O, Borenstein E, Eichler EE. The discovery of integrated gene networks for autism and related disorders. *Genome research*. 2015 Jan 1;25(1):142-54.
 137. Wang L, Zhou K, Fu Z, Yu D, Huang H, Zang X, Mo X. Brain development and Akt signaling: the crossroads of signaling pathway and neurodevelopmental diseases. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2017 Mar 1;61(3):379-84.
 138. Lo-Castro A, Curatolo P. Epilepsy associated with autism and attention deficit hyperactivity disorder: is there a genetic link?. *Brain and Development*. 2014 Mar 1;36(3):185-93.
 139. Robertson J, Hatton C, Emerson E, Baines S. Prevalence of epilepsy among people with intellectual disabilities: a systematic review. *Seizure*. 2015 Jul 1;29:46-62.
 140. Fombonne E. Epidemiological trends in rates of autism. *Molecular psychiatry*. 2002 Jul 24;7(S2):S4.
 141. Matsuo M, Maeda T, Sasaki K, Ishii K, Hamasaki Y. Frequent association of autism spectrum disorder in patients with childhood onset epilepsy. *Brain and Development*. 2010 Oct 1;32(9):759-63.
 142. Saemundsen E, Ludvigsson P, Hilmarsdottir I, Rafnsson V. Autism Spectrum Disorders in Children with Seizures in the First Year of Life—A Population-Based Study. *Epilepsia*. 2007 Sep;48(9):1724-30.
 143. Bolton PF, Carcani-Rathwell I, Hutton J, Goode S, Howlin P, Rutter M. Epilepsy in autism: features and correlates. *The British Journal of Psychiatry*. 2011 Apr;198(4):289-94.
 144. Airaksinen EM, Matilainen R, Mononen T, Mustonen K, Partanen J, Jokela V, Halonen P. A population-based study on epilepsy in mentally retarded children. *Epilepsia*. 2000 Sep;41(9):1214-20.
 145. Cohen R, Senecky Y, Shuper A, Inbar D, Chodick G, Shalev V, Raz R. Prevalence of epilepsy and attention-deficit hyperactivity (ADHD) disorder: a population-based study. *Journal of child neurology*. 2013 Jan;28(1):120-3.

146. Liao Y, Anttonen AK, Liukkonen E, Gaily E, Maljevic S, Schubert S, Bellan-Koch A, Petrou S, Ahonen VE, Lerche H, Lehesjoki AE. SCN2A mutation associated with neonatal epilepsy, late-onset episodic ataxia, myoclonus, and pain. *Neurology*. 2010 Oct 19;75(16):1454-8.
147. Blanchard MG, Willemsen MH, Walker JB, Dib-Hajj SD, Waxman SG, Jongmans MC, Kleefstra T, van de Warrenburg BP, Praamstra P, Nicolai J, Yntema HG. De novo gain-of-function and loss-of-function mutations of SCN8A in patients with intellectual disabilities and epilepsy. *Journal of medical genetics*. 2015 May 1;52(5):330-7.
148. McCarthy SE, Gillis J, Kramer M, Lihm J, Yoon S, Berstein Y, Mistry M, Pavlidis P, Solomon R, Ghiban E, Antoniou E. De novo mutations in schizophrenia implicate chromatin remodeling and support a genetic overlap with autism and intellectual disability. *Molecular psychiatry*. 2014 Jun;19(6):652.
149. Pathania M, Davenport EC, Muir J, Sheehan DF, López-Doménech G, Kittler JT. The autism and schizophrenia associated gene CYFIP1 is critical for the maintenance of dendritic complexity and the stabilization of mature spines. *Translational psychiatry*. 2014 Mar;4(3):e374.
150. Kirov G, Rees E, Walters JT, Escott-Price V, Georgieva L, Richards AL, Chambert KD, Davies G, Legge SE, Moran JL, McCarroll SA. The penetrance of copy number variations for schizophrenia and developmental delay. *Biological psychiatry*. 2014 Mar 1;75(5):378-85.
151. Torres F, Barbosa M, Maciel P. Recurrent copy number variations as risk factors for neurodevelopmental disorders: critical overview and analysis of clinical implications. *Journal of medical genetics*. 2015 Oct 26;jmedgenet-2015.
152. Paciorkowski AR, Thio LL, Rosenfeld JA, GajECKa M, Gurnett CA, Kulkarni S, Chung WK, Marsh ED, Gentile M, Reggin JD, Wheless JW. Copy number variants and infantile spasms: evidence for abnormalities in ventral forebrain development and pathways of synaptic function. *European Journal of Human Genetics*. 2011 Dec;19(12):1238.
153. Cox DM, Butler MG. The 15q11. 2 BP1–BP2 microdeletion syndrome: A review. *International journal of molecular sciences*. 2015 Feb 13;16(2):4068-82.
154. Arya R, Kabra M, Gulati S. Epilepsy in children with Down syndrome. *Epileptic Disorders*. 2011 Mar 1;13(1):1.
155. Grayton HM, Fernandes C, Rujescu D, Collier DA. Copy number variations in neurodevelopmental disorders. *Progress in neurobiology*. 2012 Oct 1;99(1):81-91.
156. Lee BH, Smith T, Paciorkowski AR. Autism spectrum disorder and epilepsy: disorders with a shared biology. *Epilepsy & Behavior*. 2015 Jun 1;47:191-201.
157. Vissers LE, Gilissen C, Veltman JA. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nature Reviews Genetics*. 2016 Jan;17(1):9.
158. Vorstman JA, Parr JR, Moreno-De-Luca D, Anney RJ, Nurnberger Jr JI, Hallmayer JF. Autism genetics: opportunities and challenges for clinical translation. *Nature Reviews Genetics*. 2017 Jun;18(6):362.
159. Nava C, Dalle C, Rastetter A, Striano P, De Kovel CG, Nabbout R, Cancès C, Ville D, Brilstra EH, Gobbi G, Raffo E. De novo mutations in HCN1 cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nature genetics*. 2014 Jun;46(6):640.
160. Noebels J. Pathway-driven discovery of epilepsy genes. *Nature neuroscience*. 2015 Mar;18(3):344.
161. Mefford HC, Sharp AJ, Baker C, Itsara A, Jiang Z, Buysse K, Huang S, Maloney VK, Crolla JA, Baralle D, Collins A. Recurrent rearrangements of chromosome 1q21. 1 and variable pediatric phenotypes. *New England Journal of Medicine*. 2008 Oct 16;359(16):1685-99.

162. Shinawi M, Liu P, Kang SH, Shen J, Belmont JW, Scott DA, Probst FJ, Craigen WJ, Graham B, Pursley A, Clark G. Recurrent reciprocal 16p11. 2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioral problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. *Journal of medical genetics*. 2009 Jan 1;jmg-2009.
163. Shinawi M, Schaaf CP, Bhatt SS, Xia Z, Patel A, Cheung SW, Lanpher B, Nagl S, Herding HS, Nevinny-Stickel C, Immken LL. A small recurrent deletion within 15q13. 3 is associated with a range of neurodevelopmental phenotypes. *Nature genetics*. 2009 Dec;41(12):1269.
164. Heinzen EL, Radtke RA, Urban TJ, Cavalleri GL, Depondt C, Need AC, Walley NM, Nicoletti P, Ge D, Catarino CB, Duncan JS. Rare deletions at 16p13. 11 predispose to a diverse spectrum of sporadic epilepsy syndromes. *The American Journal of Human Genetics*. 2010 May 14;86(5):707-18.
165. Lupski JR, Belmont JW, Boerwinkle E, Gibbs RA. Clan genomics and the complex architecture of human disease. *Cell*. 2011 Sep 30;147(1):32-43.
166. Kousi M, Katsanis N. Genetic modifiers and oligogenic inheritance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2015 Jun 1;5(6):a017145.
167. Harvard C, Strong E, Mercier E, Colnaghi R, Alcantara D, Chow E, Martell S, Tyson C, Hrynychak M, McGillivray B, Hamilton S. Understanding the impact of 1q21. 1 copy number variant. *Orphanet journal of rare diseases*. 2011 Dec;6(1):54.
168. Bernier R, Steinman KJ, Reilly B, Wallace AS, Sherr EH, Pojman N, Mefford HC, Gerdts J, Earl R, Hanson E, Goin-Kochel RP. Clinical phenotype of the recurrent 1q21. 1 copy-number variant. *Genetics in Medicine*. 2016 Apr;18(4):341.
169. Girirajan S, Rosenfeld JA, Cooper GM, Antonacci F, Siswara P, Itsara A, Vives L, Walsh T, McCarthy SE, Baker C, Mefford HC. A recurrent 16p12. 1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nature genetics*. 2010 Mar;42(3):203.
170. Van Bon BW, Mefford HC, de Vries BB. 15q13. 3 Microdeletion. 2015, Bookshelf ID: NBK50780; PMID: 21290787
171. Bailey JA, Gu Z, Clark RA, Reinert K, Samonte RV, Schwartz S, Adams MD, Myers EW, Li PW, Eichler EE. Recent segmental duplications in the human genome. *Science*. 2002 Aug 9;297(5583):1003-7.
172. Stankiewicz P, Lupski JR. Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annual review of medicine*. 2010 Feb 18;61:437-55.
173. Liu P, Carvalho CM, Hastings PJ, Lupski JR. Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements. *Current opinion in genetics & development*. 2012 Jun 30;22(3):211-20.
174. Lupski JR. Hotspots of homologous recombination in the human genome: not all homologous sequences are equal. *Genome biology*. 2004 Sep;5(10):242.
175. Myers S, Freeman C, Auton A, Donnelly P, McVean G. A common sequence motif associated with recombination hot spots and genome instability in humans. *Nature genetics*. 2008 Sep;40(9):1124.
176. Gu W, Zhang F, Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics*. 2008 Dec;1(1):4.
177. Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *cell*. 2007 Dec 28;131(7):1235-47.
178. Hastings PJ, Ira G, Lupski JR. A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation. *PLoS genetics*. 2009 Jan 30;5(1):e1000327.
179. Zhang F, Carvalho CM, Lupski JR. Complex human chromosomal and genomic rearrangements. *Trends in Genetics*. 2009 Jul 1;25(7):298-307.

180. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nature Reviews Genetics*. 2006 Feb;7(2):85.
181. Lupski JR, Stankiewicz P. Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS genetics*. 2005 Dec 30;1(6):e49.
182. Speicher MR, Ballard SG, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature genetics*. 1996 Apr;12(4):368.
183. Wang R, Carter J, Lench N. Evaluation of real-time quantitative PCR as a standard cytogenetic diagnostic tool for confirmation of microarray (aCGH) results and determination of inheritance. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2013 Nov 1;17(11):821-5.
186. Gouas L, Goumy C, Veronese L, Tchirkov A, Vago P. Gene dosage methods as diagnostic tools for the identification of chromosome abnormalities. *Pathologie Biologie*. 2008 Sep 1;56(6):345-53.
187. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992 Oct 30;258(5083):818-21.
188. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nature genetics*. 1998 Oct;20(2):207.
189. Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, Straatman H, van der Vliet W, Huys EH, van Rijk A, Smeets D. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *The American Journal of Human Genetics*. 2003 Dec 1;73(6):1261-70.
190. Ishkanian AS, Malloff CA, Watson SK, Chi B, Coe BP, Snijders A, Albertson DG, Pinkel D, Marra MA, Ling V, MacAulay C. A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nature genetics*. 2004 Mar;36(3):299.
191. Mantripragada KK, Tapia-Páez I, Blennow E, Nilsson P, Wedell A, Dumanski JP. DNA copy-number analysis of the 22q11 deletion-syndrome region using array-CGH with genomic and PCR-based targets. *International journal of molecular medicine*. 2004 Feb 1;13(2):273-9.
192. Carvalho B, Ouwerkerk E, Meijer GA, Ylstra B. High resolution microarray comparative genomic hybridisation analysis using spotted oligonucleotides. *Journal of clinical pathology*. 2004 Jun 1;57(6):644-6.
193. Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, Aerts J, Andrews TD, Barnes C, Campbell P, Fitzgerald T. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature*. 2010 Apr;464(7289):704.
194. Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, Anney R, Merico D, Regan R, Conroy J, Magalhaes TR, Correia C, Abrahams BS, Almeida J. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*. 2010 Jul;466(7304):368.
195. Levy D, Ronemus M, Yamrom B, Lee YH, Leotta A, Kendall J, Marks S, Lakshmi B, Pai D, Ye K, Buja A. Rare de novo and transmitted copy-number variation in autistic spectrum disorders. *Neuron*. 2011 Jun 9;70(5):886-97.
196. Williams NM, Franke B, Mick E, Anney RJ, Freitag CM, Gill M, Thapar A, O'Donovan MC, Owen MJ, Holmans P, Kent L. Genome-wide analysis of copy number variants in attention deficit hyperactivity disorder: the role of rare variants and duplications at 15q13. 3. *American Journal of Psychiatry*. 2012 Feb;169(2):195-204.
197. Chong WW, Lo IF, Lam ST, Wang CC, Luk HM, Leung TY, Choy KW. Performance of chromosomal microarray for patients with intellectual disabilities/developmental delay, autism,

and multiple congenital anomalies in a Chinese cohort. *Molecular cytogenetics*. 2014 Dec;7(1):34.

198. Lee JS, Hwang H, Kim SY, Kim KJ, Choi JS, Woo MJ, Choi YM, Jun JK, Lim BC, Chae JH. Chromosomal Microarray With Clinical Diagnostic Utility in Children With Developmental Delay or Intellectual Disability. *Annals of Laboratory Medicine*. 2018 Sep 1;38(5):473-80.

199. Papenhausen P, Schwartz S, Risheg H, Keitges E, Gadi I, Burnside RD, Jaswaney V, Pappas J, Pasion R, Friedman K, Tepperberg J. UPD detection using homozygosity profiling with a SNP genotyping microarray. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2011 Apr;155(4):757-68.

200. Tucker T, Schlade-Bartusiak K, Eydoux P, Nelson TN, Brown L. Uniparental disomy: can SNP array data be used for diagnosis?. *Genetics in medicine*. 2012 Aug;14(8):753.

201. Schaaf CP, Wiszniewska J, Beaudet AL. Copy number and SNP arrays in clinical diagnostics. *Annual review of genomics and human genetics*. 2011 Jul 18;12:25-51.

202. Keren B, Le Caignec C. Oligonucleotide microarrays in constitutional genetic diagnosis. *Expert review of molecular diagnostics*. 2011 Jun 1;11(5):521-32.

203. Pinto D, Darvishi K, Shi X, Rajan D, Rigler D, Fitzgerald T, Lionel AC, Thiruvahindrapuram B, MacDonald JR, Mills R, Prasad A. Comprehensive assessment of array-based platforms and calling algorithms for detection of copy number variants. *Nature biotechnology*. 2011 May 8;29(6):512.

204. Le Scouarnec S, Gribble SM. Characterising chromosome rearrangements: recent technical advances in molecular cytogenetics. *Heredity*. 2012 Jan;108(1):75.

205. Tucker T, Montpetit A, Chai D, Chan S, Chénier S, Coe BP, Delaney A, Eydoux P, Lam WL, Langlois S, Lemyre E. Comparison of genome-wide array genomic hybridization platforms for the detection of copy number variants in idiopathic mental retardation. *BMC medical genomics*. 2011 Dec;4(1):25.

206. Wiszniewska J, Bi W, Shaw C, Stankiewicz P, Kang SH, Pursley AN, Lalani S, Hixson P, Gambin T, Tsai CH, Bock HG. Combined array CGH plus SNP genome analyses in a single assay for optimized clinical testing. *European Journal of Human Genetics*. 2014 Jan;22(1):79.

207. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *The American Journal of Human Genetics*. 2010 May 14;86(5):749-64.

208. Koolen DA, Pfundt R, de Leeuw N, Hehir-Kwa JY, Nillesen WM, Neefs I, Scheltinga I, Sistermans E, Smeets D, Brunner HG, van Kessel AG. Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. *Human mutation*. 2009 Mar 1;30(3):283-92.

209. Martin CL, Ledbetter DH. Chromosomal microarray testing for children with unexplained neurodevelopmental disorders. *Jama*. 2017 Jun 27;317(24):2545-6.

210. Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C, Williams C, Stalker H, Hamid R, Hannig V, Abdel-Hamid H. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nature genetics*. 2011 Sep;43(9):838.

211. Ahn JW, Bint S, Bergbaum A, Mann K, Hall RP, Ogilvie CM. Array CGH as a first line diagnostic test in place of karyotyping for postnatal referrals-results from four years' clinical application for over 8,700 patients. *Molecular cytogenetics*. 2013 Dec;6(1):16.

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

213. Marshall CR, Howrigan DP, Merico D, Thiruvahindrapuram B, Wu W, Greer DS, Antaki D, Shetty A, Holmans PA, Pinto D, Gujral M. Contribution of copy number variants to schizophrenia from a genome-wide study of 41,321 subjects. *Nature genetics*. 2017 Jan;49(1):27.
214. Martin J, Cooper M, Hamshere ML, Pocklington A, Scherer SW, Kent L, Gill M, Owen MJ, Williams N, O'Donovan MC, Thapar A. Biological overlap of attention-deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder: evidence from copy number variants. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*. 2014 Jul 1;53(7):761-70.
215. Olson H, Shen Y, Avallone J, Sheidley BR, Pinsky R, Bergin AM, Berry GT, Duffy FH, Eksioglu Y, Harris DJ, Hisama FM. Copy number variation plays an important role in clinical epilepsy. *Annals of neurology*. 2014 Jun;75(6):943-58.
216. Coppola A, Elia M. Copy Number Variants and Epilepsy: New Emerging Syndromes. In *Epilepsy Towards the Next Decade 2015* (pp. 1-14). Springer, Cham.
217. Eriksson MA, Liedén A, Westerlund J, Bremer A, Wincent J, Sahlin E, Gillberg C, Fernell E, Anderlid BM. Rare copy number variants are common in young children with autism spectrum disorder. *Acta Paediatrica*. 2015 Jun;104(6):610-8.
218. Hrabik SA, Standridge SM, Greiner HM, Neilson DE, Pilipenko VV, Zimmerman SL, Connor JA, Spaeth CG. The clinical utility of a single-nucleotide polymorphism microarray in patients with epilepsy at a tertiary medical center. *Journal of child neurology*. 2015 Nov;30(13):1770-7.
219. Allen NM, Conroy J, Shahwan A, Ennis S, Lynch B, Lynch SA, King MD. Chromosomal microarray in unexplained severe early onset epilepsy—A single centre cohort. *European journal of paediatric neurology*. 2015 Jul 1;19(4):390-4.
220. Zhao M, Wang Q, Wang Q, Jia P, Zhao Z. Computational tools for copy number variation (CNV) detection using next-generation sequencing data: features and perspectives. *BMC bioinformatics*. 2013 Sep;14(11):S1.
221. Kadalayil L, Rafiq S, Rose-Zerilli MJ, Pengelly RJ, Parker H, Oscier D, Strefford JC, Tapper WJ, Gibson J, Ennis S, Collins A. Exome sequence read depth methods for identifying copy number changes. *Briefings in bioinformatics*. 2014 Aug 28;16(3):380-92.
222. Campbell PJ, Stephens PJ, Pleasance ED, O'Meara S, Li H, Santarius T, Stebbings LA, Leroy C, Edkins S, Hardy C, Teague JW. Identification of somatically acquired rearrangements in cancer using genome-wide massively parallel paired-end sequencing. *Nature genetics*. 2008 Jun;40(6):722.
223. Yoon S, Xuan Z, Makarov V, Ye K, Sebat J. Sensitive and accurate detection of copy number variants using read depth of coverage. *Genome research*. 2009 Aug 5.
224. Magi A, Benelli M, Yoon S, Roviello F, Torricelli F. Detecting common copy number variants in high-throughput sequencing data by using JointSLM algorithm. *Nucleic acids research*. 2011 Feb 14;39(10):e65-.
225. Karakoc E, Alkan C, O'roak BJ, Dennis MY, Vives L, Mark K, Rieder MJ, Nickerson DA, Eichler EE. Detection of structural variants and indels within exome data. *Nature methods*. 2012 Feb;9(2):176.
226. Liu B, Morrison CD, Johnson CS, Trump DL, Qin M, Conroy JC, Wang J, Liu S. Computational methods for detecting copy number variations in cancer genome using next generation sequencing: principles and challenges. *Oncotarget*. 2013 Nov;4(11):1868.
227. Mills RE, Walter K, Stewart C, Handsaker RE, Chen K, Alkan C, Abyzov A, Yoon SC, Ye K, Cheetham RK, Chinwalla A. Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. *Nature*. 2011 Feb;470(7332):59.

228. Mimori T, Nariiai N, Kojima K, Takahashi M, Ono A, Sato Y, Yamaguchi-Kabata Y, Nagasaki M. iSVP: an integrated structural variant calling pipeline from high-throughput sequencing data. *BMC systems biology*. 2013 Dec;7(6):S8.
229. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genetics in Medicine*. 2011 Jul;13(7):680.
230. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine*. 2015 May;17(5):405.
231. Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic acids research*. 2003 Jul 1;31(13):3568-71.
232. Jian X, Boerwinkle E, Liu X. In silico tools for splicing defect prediction: a survey from the viewpoint of end users. *Genetics in Medicine*. 2014 Jul;16(7):497.
233. Filges I, Röthlisberger B, Noppen C, Boesch N, Wenzel F, Necker J, Binkert F, Huber AR, Heinimann K, Miny P. Familial 14.5 Mb interstitial deletion 13q21. 1–13q21. 33: Clinical and array-CGH study of a benign phenotype in a three-generation family. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2009 Feb 1;149(2):237-41.
234. Itsara A, Cooper GM, Baker C, Girirajan S, Li J, Absher D, Krauss RM, Myers RM, Ridker PM, Chasman DI, Mefford H. Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease. *The American Journal of Human Genetics*. 2009 Feb 13;84(2):148-61.
235. Bateman MS, Mehta SG, Willatt L, Selkirk E, Bedwell C, Zwolinski S, Sparnon L, Simonic I, Abbott K, Barber JC. A de novo 4q34 interstitial deletion of at least 9.3 Mb with no discernible phenotypic effect. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2010 Jul;152(7):1764-9.
236. Ozyilmaz B, Kirbiyik O, Koc A, Ozdemir TR, Kaya OO, Guvenc MS, Erdoğan KM, Kutbay YB. Experiences in microarray-based evaluation of developmental disabilities and congenital anomalies. *Clinical genetics*. 2017 Oct;92(4):372-9.
237. Palmer E, Speirs H, Taylor PJ, Mullan G, Turner G, Einfeld S, Tonge B, Mowat D. Changing interpretation of chromosomal microarray over time in a community cohort with intellectual disability. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2014 Feb;164(2):377-85.
238. Theisen A. Microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH). *Nature Education*. 2008;1(1):45.
239. Zhang H, Du ZQ, Dong JQ, Wang HX, Shi HY, Wang N, Wang SZ, Li H. Detection of genome-wide copy number variations in two chicken lines divergently selected for abdominal fat content. *BMC genomics*. 2014 Dec;15(1):517.
240. Dimova PS, Yordanova I, Bojinova V, Jordanova A, Kremenski I. Generalized epilepsy with febrile seizures plus: novel SCN1A mutation. *Pediatric neurology*. 2010 Feb 1;42(2):137-40.
241. Yordanova I, Todorov T, Dimova P, Hristova D, Tincheva R, Litvinenko I, Yotovska O, Kremenski I, Todorova A. One novel Dravet syndrome causing mutation and one recurrent MAE causing mutation in SCN1A gene. *Neuroscience letters*. 2011 Apr 25;494(2):180-3.
242. Schlachter K, Gruber-Sedlmayr U, Stogmann E, Lausecker M, Hotzy C, Balzar J, Schuh E, Baumgartner C, Mueller JC, Illig T, Wichmann HE. A splice site variant in the sodium channel gene SCN1A confers risk of febrile seizures. *Neurology*. 2009 Mar 17;72(11):974-8.
243. Petrovski S, Scheffer IE, Sisodiya SM, O'Brien TJ, Berkovic SF, EPIGEN Consortium. Lack of replication of association between scn1a SNP and febrile seizures. *Neurology*. 2009 Dec 1;73(22):1928-30.

244. Claes LR, Ceulemans B, Audenaert D, Deprez L, Jansen A, Hasaerts D, Weckx S, Claeys KG, Del-Favero J, Van Broeckhoven C, De Jonghe P. De novo KCNQ2 mutations in patients with benign neonatal seizures. *Neurology*. 2004 Dec 14;63(11):2155-8.
245. Sun H, Zhang Y, Liu X, Ma X, Yang Z, Qin J, Jiang Y, Qi Y, Wu X. Analysis of SCN1A mutation and parental origin in patients with Dravet syndrome. *Journal of human genetics*. 2010 Jul;55(7):421.
246. Xu X, Yang X, Wu Q, Liu A, Yang X, Ye AY, Huang AY, Li J, Wang M, Yu Z, Wang S. Amplicon resequencing identified parental mosaicism for approximately 10% of “de novo” SCN1A mutations in children with Dravet syndrome. *Human mutation*. 2015 Sep 1;36(9):861-72.
247. Depienne C, Trouillard O, Saint-Martin C, Isabelle AN, Bouteiller D, Carpentier W, Keren B, Abert B, Gautier A, Baulac S, Arzimanoglou A. Spectrum of SCN1A gene mutations associated with Dravet syndrome: analysis of 333 patients. *Journal of medical genetics*. 2008 Oct 17.
248. Dlugos DJ, Ferraro TN, Buono RJ. Novel de novo mutation of a conserved SCN1A amino-acid residue (R1596). *Pediatric neurology*. 2007 Oct 1;37(4):303-5.
249. Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, Fukushima K, Shimomura J, Fujiwara T, Hamano S, Inoue Y, Yamakawa K. Frequent mutations of SCN1A in severe myoclonic epilepsy in infancy. *Neurology*. 2002 Apr 9;58(7):1122-4.
250. Ohmori I, Ouchida M, Ohtsuka Y, Oka E, Shimizu K. Significant correlation of the SCN1A mutations and severe myoclonic epilepsy in infancy. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002 Jul 5;295(1):17-23.
251. Heron SE, Scheffer IE, Iona X, Zuberi SM, Birch R, McMahon JM, Bruce CM, Berkovic SF, Mulley JC. De novo SCN1A mutations in Dravet syndrome and related epileptic encephalopathies are largely of paternal origin. *Journal of medical genetics*. 2009 Jul 8.
252. Verbeek NE, van der Maas NA, Jansen FE, van Kempen MJ, Lindhout D, Brilstra EH. Prevalence of SCN1A-related Dravet syndrome among children reported with seizures following vaccination: a population-based ten-year cohort study. *PLoS One*. 2013 Jun 6;8(6):e65758.
253. Xu X, Zhang Y, Sun H, Liu X, Yang X, Xiong H, Jiang Y, Bao X, Wang S, Yang Z, Wu Y. Early clinical features and diagnosis of Dravet syndrome in 138 Chinese patients with SCN1A mutations. *Brain and Development*. 2014 Sep 1;36(8):676-81.
254. Berkovic SF, Harkin L, McMahon JM, Pelekanos JT, Zuberi SM, Wirrell EC, Gill DS, Iona X, Mulley JC, Scheffer IE. De-novo mutations of the sodium channel gene SCN1A in alleged vaccine encephalopathy: a retrospective study. *The Lancet Neurology*. 2006 Jun 1;5(6):488-92.
255. Freilich ER, Jones JM, Gaillard WD, Conry JA, Tsuchida TN, Reyes C, Dib-Hajj S, Waxman SG, Meisler MH, Pearl PL. Novel SCN1A mutation in a proband with malignant migrating partial seizures of infancy. *Archives of neurology*. 2011 May 9;68(5):665-71.
256. Wang JW, Shi XY, Kurahashi H, Hwang SK, Ishii A, Higurashi N, Kaneko S, Hirose S. Prevalence of SCN1A mutations in children with suspected Dravet syndrome and intractable childhood epilepsy. *Epilepsy research*. 2012 Dec 1;102(3):195-200.
257. Meng H, Xu HQ, Yu L, Lin GW, He N, Su T, Shi YW, Li B, Wang J, Liu XR, Tang B. The SCN1A mutation database: updating information and analysis of the relationships among genotype, functional alteration, and phenotype. *Human mutation*. 2015 Jun;36(6):573-80.
258. Catarino CB, Liu JY, Liagkouras I, Gibbons VS, Labrum RW, Ellis R, Woodward C, Davis MB, Smith SJ, Cross JH, Appleton RE. Dravet syndrome as epileptic encephalopathy: evidence from long-term course and neuropathology. *Brain*. 2011 Jun 29;134(10):2982-3010.
259. Rilstone JJ, Coelho FM, Minassian BA, Andrade DM. Dravet syndrome: seizure control and gait in adults with different SCN1A mutations. *Epilepsia*. 2012 Aug 1;53(8):1421-8.

260. Lal D, Reinthaler EM, Dejanovic B, May P, Thiele H, Lehesjoki AE, Schwarz G, Riesch E, Ikram MA, Van Duijn CM, Uitterlinden AG. Evaluation of presumably disease causing SCN1A variants in a cohort of common epilepsy syndromes. *PloS one*. 2016 Mar 18;11(3):e0150426.
261. Haut SR, Bigal ME, Lipton RB. Chronic disorders with episodic manifestations: focus on epilepsy and migraine. *The Lancet Neurology*. 2006 Feb 1;5(2):148-57.
262. Cestèle S, Labate A, Rusconi R, Tarantino P, Mumoli L, Franceschetti S, Annesi G, Mantegazza M, Gambardella A. Divergent effects of the T1174S SCN1A mutation associated with seizures and hemiplegic migraine. *Epilepsia*. 2013 May 1;54(5):927-35.
263. Gargus JJ, Tournay A. Novel mutation confirms seizure locus SCN1A is also familial hemiplegic migraine locus FHM3. *Pediatric neurology*. 2007 Dec 1;37(6):407-10.
264. Frosk P, Mhanni AA, Rafay MF. SCN1A mutation associated with intractable myoclonic epilepsy and migraine headache. *Journal of child neurology*. 2013 Mar;28(3):389-91.
265. Fendri-Kriaa N, Kammoun F, Rebai A, Kolsi D, Hadj Salem I, Fakhfakh F, Triki C. Genetic screening of two Tunisian families with generalized epilepsy with febrile seizures plus. *European journal of neurology*. 2009 Jun 1;16(6):697-704.
266. Цекова, И. „Молекулни дефекти при SCN1A-свързани епилепсии и епилептични енцефалопатии” 2013, дипломна работа
267. Wallace RH, Scheffer IE, Barnett S, Richards M, Dibbens L, Desai RR, Lerman-Sagie T, Lev D, Mazarib A, Brand N, Ben-Zeev B. Neuronal sodium-channel α 1-subunit mutations in generalized epilepsy with febrile seizures plus. *The American Journal of Human Genetics*. 2001 Apr 1;68(4):859-65.
268. De Vries B, Freilinger T, Vanmolkot KR, Koenderink JB, Stam AH, Terwindt GM, Babini E, van den Boogerd EH, van den Heuvel JJ, Frants RR, Haan J. Systematic analysis of three FHM genes in 39 sporadic patients with hemiplegic migraine. *Neurology*. 2007 Dec 4;69(23):2170-6.
269. Zucca C, Redaelli F, Epifanio R, Zanotta N, Romeo A, Lodi M, Veggiotti P, Airolidi G, Panzeri C, Romaniello R, De Polo G. Cryptogenic epileptic syndromes related to SCN1A: twelve novel mutations identified. *Archives of neurology*. 2008 Apr 1;65(4):489-94.
270. Catterall WA, Kalume F, Oakley JC. NaV1.1 channels and epilepsy. *The Journal of physiology*. 2010;588(Pt 11):1849–59. Epub 2010/03/03. doi: 10.1113/jphysiol.2010.187484 PMID: 20194124; PubMed
271. Tate SK, Depondt C, Sisodiya SM, Cavalleri GL, Schorge S, Soranzo N, Thom M, Sen A, Shorvon SD, Sander JW, Wood NW. Genetic predictors of the maximum doses patients receive during clinical use of the anti-epileptic drugs carbamazepine and phenytoin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005 Apr 12;102(15):5507-12
272. Tate SK, Singh R, Hung CC, Tai JJ, Depondt C, Cavalleri GL, Sisodiya SM, Goldstein DB, Liou HH. A common polymorphism in the SCN1A gene associates with phenytoin serum levels at maintenance dose. *Pharmacogenetics and genomics*. 2006 Oct 1;16(10):721-6.
273. Heinzen EL, Yoon W, Tate SK, Sen A, Wood NW, Sisodiya SM, Goldstein DB. Nova2 interacts with a cis-acting polymorphism to influence the proportions of drug-responsive splice variants of SCN1A. *The American Journal of Human Genetics*. 2007 May 1;80(5):876-83.
274. Seidner G, Alvarez MG, Yeh JI, O'Driscoll KR, Klepper J, Stump TS, Wang D, Spinner NB, Birnbaum MJ, Darryl C. GLUT-1 deficiency syndrome caused by haploinsufficiency of the blood-brain barrier hexose carrier. *Nature genetics*. 1998 Feb 1;18(2):188-91.
275. Hashimoto N, Kagitani-Shimono K, Sakai N, Otomo T, Tominaga K, Nabatame S, Mogami Y, Takahashi Y, Imai K, Yanagihara K, Okinaga T. SLC2A1 gene analysis of Japanese patients

- with glucose transporter 1 deficiency syndrome. *Journal of human genetics*. 2011 Dec;56(12):846.
276. Wang D, Kranz-Eble P, De Vivo DC. Mutational analysis of GLUT1 (SLC2A1) in Glut-1 deficiency syndrome. *Human mutation*. 2000 Sep;16(3):224-31.
 277. Brockmann K, Wang D, Korenke CG, Von Moers A, Ho YY, Pascual JM, Kuang K, Yang H, Ma L, Kranz-Eble P, Fischbarg J. Autosomal dominant Glut-1 deficiency syndrome and familial epilepsy. *Annals of neurology*. 2001 Oct 1;50(4):476-85.
 278. Klepper J, Leiendecker B. GLUT1 deficiency syndrome—2007 update. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 2007 Sep;49(9):707-16.
 279. Ito Y, Takahashi S, Kagitani-Shimono K, Natsume J, Yanagihara K, Fujii T, Oguni H. Nationwide survey of glucose transporter-1 deficiency syndrome (GLUT-1DS) in Japan. *Brain and Development*. 2015 Sep 1;37(8):780-9.
 280. Park MS. Molecular dynamics simulations of the human glucose transporter GLUT1. *PLoS One*. 2015 Apr 28;10(4):e0125361.
 281. Varlamis S, Vavatsi N, Pavlou E, Kotsis V, Spilioti M, Kavga M, Varlamis G, Sotiriadou F, Agakidou E, Voutoufianakis S, Evangelidou AE. Evaluation of oral glucose tolerance test in children with epilepsy. *Journal of child neurology*. 2013 Nov;28(11):1437-42.
 282. Deng D, Xu C, Sun P, Wu J, Yan C, Hu M, Yan N. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature*. 2014 Jun;510(7503):121.
 283. Mueckler M, Makepeace C. Transmembrane segment 5 of the Glut1 glucose transporter is an amphipathic helix that forms part of the sugar permeation pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 1999 Apr 16;274(16):10923-6.
 284. Lebon S, Suarez P, Alija S, Korff CM, Fluss J, Mercati D, Datta AN, Poloni C, Marcoz JP, Campos-Xavier AB, Bonafé L. When should clinicians search for GLUT1 deficiency syndrome in childhood generalized epilepsies?. *European journal of paediatric neurology*. 2015 Mar 1;19(2):170-5.
 285. Wen H, Levitan IB. Calmodulin is an auxiliary subunit of KCNQ2/3 potassium channels. *Journal of Neuroscience*. 2002 Sep 15;22(18):7991-8001.
 286. Yus-Nájera E, Santana-Castro I, Villarroel A. The identification and characterization of a noncontinuous calmodulin-binding site in noninactivating voltage-dependent KCNQ potassium channels. *Journal of Biological Chemistry*. 2002 Aug 9;277(32):28545-53.
 287. Strulovich R, Tobelaim WS, Attali B, Hirsch JA. Structural insights into the M-channel proximal C-terminus/calmodulin complex. *Biochemistry*. 2016 Sep 12;55(38):5353-65.
 288. Singh NA, Westenskow P, Charlier C, Pappas C, Leslie J, Dillon J, Anderson VE, Sanguinetti MC, Leppert MF. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel genes in benign familial neonatal convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum. *Brain*. 2003 Dec 1;126(12):2726-37.
 289. Maihara T, Tsuji M, Higuchi Y, Hattori H. Benign familial neonatal convulsions followed by benign epilepsy with centrotemporal spikes in two siblings. *Epilepsia*. 1999 Jan;40(1):110-3.
 290. Coppola G, Castaldo P, Del Giudice EM, Bellini G, Galasso F, Soldovieri MV, Anzalone L, Sferro C, Annunziato L, Pascotto A, Taglialatela M. A novel KCNQ2 K⁺ channel mutation in benign neonatal convulsions and centrotemporal spikes. *Neurology*. 2003 Jul 8;61(1):131-4.
 291. Ishii A, Miyajima T, Kurahashi H, Wang JW, Yasumoto S, Kaneko S, Hirose S. KCNQ2 abnormality in BECTS: benign childhood epilepsy with centrotemporal spikes following benign neonatal seizures resulting from a mutation of KCNQ2. *Epilepsy research*. 2012 Nov 1;102(1-2):122-5.

292. Kurahashi H, Wang JW, Ishii A, Kojima T, Wakai S, Kizawa T, Fujimoto Y, Kikkawa K, Yoshimura K, Inoue T, Yasumoto S. Deletions involving both KCNQ2 and CHRNA4 present with benign familial neonatal seizures. *Neurology*. 2009 Oct 13;73(15):1214-7.
293. Marubio LM, del Mar Arroyo-Jimenez M, Cordero-Erausquin M, Léna C, Le Novère N, de Kerchove d'Exaerde A, Huchet M, Damaj MI, Changeux JP. Reduced antinociception in mice lacking neuronal nicotinic receptor subunits. *Nature*. 1999 Apr;398(6730):805.
294. Traylor RN, Bruno DL, Burgess T, Wildin R, Spencer A, Ganesamoorthy D, Amor DJ, Hunter M, Caplan M, Rosenfeld JA, Theisen A. A genotype-first approach for the molecular and clinical characterization of uncommon de novo microdeletion of 20q13. 33. *PLoS One*. 2010 Aug 27;5(8):e12462.
295. Mefford HC, Cook J, Gospe Jr SM. Epilepsy due to 20q13. 33 subtelomere deletion masquerading as pyridoxine- dependent epilepsy. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2012 Dec;158(12):3190-5.
296. Pascual FT, Wierenga KJ, Ng YT. Contiguous deletion of KCNQ2 and CHRNA4 may cause a different disorder from benign familial neonatal seizures. *Epilepsy & behavior case reports*. 2013 Jan 1;1:35-8.
297. Allen NM, Mannion M, Conroy J, Lynch SA, Shahwan A, Lynch B, King MD. The variable phenotypes of KCNQ- related epilepsy. *Epilepsia*. 2014 Sep;55(9):e99-105.
298. Avdjieva-Tzavella D, Hadjidekova S, Rukova B, Nesheva D, Litvinenko I, Hristova-Naydenova D, Simeonov E, Tincheva R, Toncheva D. Detection of genomic imbalances by array-based comparative genomic hybridization in bulgarian patients with autism spectrum disorders. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2012 Jan 1;26(6):3389-93.
299. Mihaylova M, Staneva R, Toncheva D, Pancheva M, Hadjidekova S. Benign, pathogenic and copy number variations of unknown clinical significance in patients with congenital malformations and developmental delay. *Balkan Journal of Medical Genetics*. 2017 Jun 30;20(1):5-12.
300. Suls A, Velizarova R, Yordanova I, Deprez L, Van Dyck T, Wauters J, Guergueltcheva V, Claes LR, Kremensky I, Jordanova A, De Jonghe P. Four generations of epilepsy caused by an inherited microdeletion of the SCN1A gene. *Neurology*. 2010 Jul 6;75(1):72-6.
301. Kirov A, Dimova P, Todorova A, Mefford H, Todorov T, Saraylieva G, Bojinova V, Mitev V, Helbig I. 15q13. 3 microdeletions in a prospectively recruited cohort of patients with idiopathic generalized epilepsy in Bulgaria. *Epilepsy research*. 2013 May 1;104(3):241-5.
302. Kashevarova AA, Nazarenko LP, Skryabin NA, Salyukova OA, Chechetkina NN, Tolmacheva EN, Sazhenova EA, Magini P, Graziano C, Romeo G, Kučinskas V. Array CGH analysis of a cohort of Russian patients with intellectual disability. *Gene*. 2014 Feb 15;536(1):145-50.
303. Wincent J, Kolbjør S, Martin D, Luthman A, Åmark P, Dahlin M, Anderlid BM. Copy number variations in children with brain malformations and refractory epilepsy. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2015 Mar;167(3):512-23.
304. Iourov IY, Vorsanova SG, Kurinnaia OS, Zelenova MA, Silvanovich AP, Yurov YB. Molecular karyotyping by array CGH in a Russian cohort of children with intellectual disability, autism, epilepsy and congenital anomalies. *Molecular Cytogenetics*. 2012 Dec;5(1):46.
305. Uwineza A, Caberg JH, Hitayezu J, Hellin AC, Jamar M, Dideberg V, Rusingiza EK, Bours V, Mutesa L. Array-CGH analysis in Rwandan patients presenting development delay/intellectual disability with multiple congenital anomalies. *BMC medical genetics*. 2014 Dec;15(1):79.
306. D'Arrigo S, Gavazzi F, Alfei E, Zuffardi O, Montomoli C, Corso B, Buzzi E, Sciacca FL, Bulgheroni S, Riva D, Pantaleoni C. The diagnostic yield of array comparative genomic

hybridization is high regardless of severity of intellectual disability/developmental delay in children. *Journal of child neurology*. 2016 May;31(6):691-9.

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

308. De Vries BB, White SM, Knight SJ, Regan R, Homfray T, Young ID, Super M, McKeown C, Splitt M, Quarrell OW, Trainer AH. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *Journal of medical genetics*. 2001 Mar 1;38(3):145-50.

309. Rodríguez-Revenga L, Vallespín E, Madrigal I, Palomares M, Mur A, García-Miñaur S, Santos F, Mori MÁ, Lapunzina P, Mila M, Nevado J. A parallel study of different array-CGH platforms in a set of Spanish patients with developmental delay and intellectual disability. *Gene*. 2013 May 25;521(1):82-6.

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

311. Shin S, Yu N, Choi JR, Jeong S, Lee KA. Routine chromosomal microarray analysis is necessary in Korean patients with unexplained developmental delay/mental retardation/autism spectrum disorder. *Annals of laboratory medicine*. 2015 Sep 1;35(5):510-8.

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

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

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

315. Kania A, Johnson RL, Jessell TM. Coordinate roles for LIM homeobox genes in directing the dorsoventral trajectory of motor axons in the vertebrate limb. *Cell*. 2000 Jul 21;102(2):161-73.

316. Shawlot W, Behringer RR. Requirement for Lim1 in head-organizer function. *Nature*. 1995 Mar;374(6521):425.

317. Mefford HC, Clauin S, Sharp AJ, Moller RS, Ullmann R, Kapur R, Pinkel D, Cooper GM, Ventura M, Ropers HH, Tommerup N. Recurrent reciprocal genomic rearrangements of 17q12 are associated with renal disease, diabetes, and epilepsy. *The American Journal of Human Genetics*. 2007 Nov 1;81(5):1057-69.

318. Murakami Y, Siripanyapinyo U, Hong Y, Kang JY, Ishihara S, Nakakuma H, Maeda Y, Kinoshita T. PIG-W is critical for inositol acylation but not for flipping of glycosylphosphatidylinositol-anchor. *Molecular biology of the cell*. 2003 Oct;14(10):4285-95.

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

320. Hardies K, Weckhuysen S, Peeters E, Holmgren P, Van Esch H, De Jonghe P, Van Paesschen W, Suls A. Duplications of 17q12 can cause familial fever-related epilepsy syndromes. *Neurology*. 2013 Oct 15;81(16):1434-40.

321. Battaglia A, Hoyme HE, Dallapiccola B, Zackai E, Hudgins L, McDonald-McGinn D, Bahi-Buisson N, Romano C, Williams CA, Brailey LL, Zuberi SM. Further delineation of deletion 1p36 syndrome in 60 patients: a recognizable phenotype and common cause of developmental delay and mental retardation. *Pediatrics*. 2008 Feb 1;121(2):404-10.
322. Delplanque J, Devos D, Huin V, Genet A, Sand O, Moreau C, Goizet C, Charles P, Anheim M, Monin ML, Buee L. TMEM240 mutations cause spinocerebellar ataxia 21 with mental retardation and severe cognitive impairment. *Brain*. 2014 Jul 27;137(10):2657-63.
323. Harel T, Yoon WH, Garone C, Gu S, Coban-Akdemir Z, Eldomery MK, Posey JE, Jhangiani SN, Rosenfeld JA, Cho MT, Fox S. Recurrent de novo and biallelic variation of ATAD3A, encoding a mitochondrial membrane protein, results in distinct neurological syndromes. *The American Journal of Human Genetics*. 2016 Oct 6;99(4):831-45.
324. Rosso SB, Sussman D, Wynshaw-Boris A, Salinas PC. Wnt signaling through Dishevelled, Rac and JNK regulates dendritic development. *Nature neuroscience*. 2005 Jan;8(1):34.
325. Nishino J, Yamashita K, Hashiguchi H, Fujii H, Shimazaki T, Hamada H. Meteorin: a secreted protein that regulates glial cell differentiation and promotes axonal extension. *The EMBO journal*. 2004 May 5;23(9):1998-2008.
326. Min JN, Whaley RA, Sharpless NE, Lockyer P, Portbury AL, Patterson C. CHIP deficiency decreases longevity, with accelerated aging phenotypes accompanied by altered protein quality control. *Molecular and cellular biology*. 2008 Jun 15;28(12):4018-25.
327. Shi CH, Schisler JC, Rubel CE, Tan S, Song B, McDonough H, Xu L, Portbury AL, Mao CY, True C, Wang RH. Ataxia and hypogonadism caused by the loss of ubiquitin ligase activity of the U box protein CHIP. *Human molecular genetics*. 2013 Oct 9;23(4):1013-24.
328. Depondt C, Donatello S, Simonis N, Rai M, Van Heurck R, Abramowicz M, D'hooghe M, Pandolfo M. Autosomal recessive cerebellar ataxia of adult onset due to STUB1 mutations. *Neurology*. 2014 May 13;82(19):1749-50.
329. Martin HC, Kim GE, Pagnamenta AT, Murakami Y, Carvill GL, Meyer E, Copley RR, Rimmer A, Barcia G, Fleming MR, Kronengold J. Clinical whole-genome sequencing in severe early-onset epilepsy reveals new genes and improves molecular diagnosis. *Human molecular genetics*. 2014 Jan 25;23(12):3200-11.
330. Wong TH, Chiu WZ, Breedveld GJ, Li KW, Verkerk AJ, Hondius D, Hukema RK, Seelaar H, Frick P, Severijnen LA, Lammers GJ. PRKAR1B mutation associated with a new neurodegenerative disorder with unique pathology. *Brain*. 2014 Apr 9;137(5):1361-73.
331. Frost EE, Zhou Z, Krasnesky K, Armstrong RC. Initiation of oligodendrocyte progenitor cell migration by a PDGF-A activated extracellular regulated kinase (ERK) signaling pathway. *Neurochemical research*. 2009 Jan 1;34(1):169-81.
332. Zhang X, Lei K, Yuan X, Wu X, Zhuang Y, Xu T, Xu R, Han M. SUN1/2 and Syne/Nesprin-1/2 complexes connect centrosome to the nucleus during neurogenesis and neuronal migration in mice. *Neuron*. 2009 Oct 29;64(2):173-87.
333. Gervasini C, Russo S, Cereda A, Parenti I, Masciadri M, Azzollini J, Melis D, Aravena T, Doray B, Ferrarini A, Garavelli L. Cornelia de Lange individuals with new and recurrent SMC1A mutations enhance delineation of mutation repertoire and phenotypic spectrum. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2013 Nov;161(11):2909-19.
334. Kline AD, Krantz ID, Sommer A, Kliever M, Jackson LG, FitzPatrick DR, Levin AV, Selicorni A. Cornelia de Lange syndrome: clinical review, diagnostic and scoring systems, and anticipatory guidance. *American journal of medical genetics part A*. 2007 Jun 15;143(12):1287-96.

335. Salas- Labadía C, Cervantes- Barragán DE, Cruz- Alcívar R, Daber RD, Conlin LK, Leonard LD, Spinner NB, Durán- McKinster C, Dávila- Ortiz de Montellano DJ, Del Castillo- Ruiz V, Pérez- Vera P. Cytogenomic and phenotypic analysis in low- level monosomy 7 mosaicism with non- supernumerary ring chromosome 7. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2014 Jul;164(7):1765-9.
336. Nimmakayalu M, Noble N, Horton VK, Willing M, Copeland S, Sheffield V, Nagy PL, Wassink T, Patil S, Shchelochkov OA. 2q24 deletions: further characterization of clinical findings and their relation to the SCN cluster. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2012 Nov;158(11):2767-74.
337. Tavassoli T, Kolevzon A, Wang AT, Curchack-Lichtin J, Halpern D, Schwartz L, Soffes S, Bush L, Grodberg D, Cai G, Buxbaum JD. De novo SCN2A splice site mutation in a boy with Autism spectrum disorder. *BMC medical genetics*. 2014 Dec;15(1):35.
338. Vanoye CG, Gurnett CA, Holland KD, George Jr AL, Kearney JA. Novel SCN3A variants associated with focal epilepsy in children. *Neurobiology of disease*. 2014 Feb 1;62:313-22.
339. Langer S, Geigl JB, Wagenstaller J, Lederer G, Hempel M, Daumer-Haas C, Leifheit HJ, Speicher MR. Delineation of a 2q deletion in a girl with dysmorphic features and epilepsy. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2006 Apr 1;140(7):764-8.
340. Pescucci C, Caselli R, Grosso S, Mencarelli MA, Mari F, Farnetani MA, Piccini B, Artuso R, Bruttini M, Priolo M, Zuffardi O. 2q24-q31 deletion: report of a case and review of the literature. *European journal of medical genetics*. 2007 Feb 28;50(1):21-32.
341. Krepischi AC, Knijnenburg J, Bertola DR, Kim CA, Pearson PL, Bijlsma E, Szuhai K, Kok F, Vianna-Morgante AM, Rosenberg C. Two distinct regions in 2q24. 2-q24. 3 associated with idiopathic epilepsy. *Epilepsia*. 2010 Dec;51(12):2457-60.
342. Takatsuki S, Nakamura R, Haga Y, Mitsui K, Hashimoto T, Shimojima K, Saji T, Yamamoto T. Severe pulmonary emphysema in a girl with interstitial deletion of 2q24. 2q24. 3 including ITGB6. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2010 Apr;152(4):1020-5.
343. Magri C, Piovani G, Pilotta A, Michele T, Buzi F, Barlati S. De novo deletion of chromosome 2q24. 2 region in a mentally retarded boy with muscular hypotonia. *European journal of medical genetics*. 2011 Jun 30;54(3):361-4.
344. Palumbo O, Palumbo P, Palladino T, Stallone R, Zelante L, Carella M. A novel deletion in 2q24. 1q24. 2 in a girl with mental retardation and generalized hypotonia: a case report. *Molecular cytogenetics*. 2012 Dec;5(1):1.
345. Traylor RN, Dobyns WB, Rosenfeld JA, Wheeler P, Spence JE, Bandholz AM, Bawle EV, Carmany EP, Powell CM, Hudson B, Schultz RA. Investigation of TBR1 hemizyosity: four individuals with 2q24 microdeletions. *Molecular syndromology*. 2012;3(3):102-12.
346. Belengeanu V, Gamage TH, Farcas S, Stoian M, Andreescu N, Belengeanu A, Frengen E, Misceo D. A de novo 2.3 Mb deletion in 2q24. 2q24. 3 in a 20-month-old developmentally delayed girl. *Gene*. 2014 Apr 10;539(1):168-72.
347. Hevner RF, Hodge RD, Daza RA, Englund C. Transcription factors in glutamatergic neurogenesis: conserved programs in neocortex, cerebellum, and adult hippocampus. *Neuroscience research*. 2006 Jul 1;55(3):223-33.
348. Gurnett CA, Veile R, Zempel J, Blackburn L, Lovett M, Bowcock A. Disruption of sodium bicarbonate transporter SLC4A10 in a patient with complex partial epilepsy and mental retardation. *Archives of neurology*. 2008 Apr 1;65(4):550-3.
349. Hilgen G, Huebner AK, Tanimoto N, Sothilingam V, Seide C, Garrido MG, Schmidt KF, Seeliger MW, Löwel S, Weiler R, Hübner CA. Lack of the sodium-driven chloride bicarbonate

exchanger NCBE impairs visual function in the mouse retina. *PLoS One*. 2012 Oct 9;7(10):e46155.

350. Sinning A, Liebmann L, Hübner CA. Disruption of *Slc4a10* augments neuronal excitability and modulates synaptic short-term plasticity. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015 Jun 16;9:223.

351. Papa M, Boscia F, Canitano A, Castaldo P, Sellitti S, Annunziato L, Taglialatela M. Expression pattern of the ether-a-gogo-related (ERG) K⁺ channel-encoding genes *ERG1*, *ERG2*, and *ERG3* in the adult rat central nervous system. *Journal of Comparative Neurology*. 2003 Nov 3;466(1):119-35.

352. Strauss KA, Markx S, Georgi B, Paul SM, Jinks RN, Hoshi T, McDonald A, First MB, Liu W, Benkert AR, Heaps AD. A population-based study of *KCNH7* p. Arg394His and bipolar spectrum disorder. *Human molecular genetics*. 2014 Jun 30;23(23):6395-406.

353. Cox GA, Mahaffey CL, Nystuen A, Letts VA, Frankel WN. The mouse fidgetin gene defines a new role for AAA family proteins in mammalian development. *Nature genetics*. 2000 Oct;26(2):198.

354. Klepper J. Absence of *SLC2A1* mutations does not exclude Glut1 deficiency syndrome. *Neuropediatrics*. 2013 Aug;44(04):235-6.

355. Matsumine H, Yamamura Y, Hattori N, Kobayashi T, Kitada T, Yoritaka A, Mizuno Y. A microdeletion of D6S305 in a family of autosomal recessive juvenile parkinsonism (*PARK2*). *Genomics*. 1998 Apr 1;49(1):143-6.

356. Gai X, Xie HM, Perin JC, Takahashi N, Murphy K, Wenocur AS, D'arcy M, O'hara RJ, Goldmuntz E, Grice DE, Shaikh TH. Rare structural variation of synapse and neurotransmission genes in autism. *Molecular psychiatry*. 2012 Apr;17(4):402.

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

358. Mak AS, Chiu AT, Leung GK, Mak CC, Chu YW, Mok GT, Tang WF, Chan KY, Tang MH, Yim ET, So KW. Use of clinical chromosomal microarray in Chinese patients with autism spectrum disorder—implications of a copy number variation involving *DPP10*. *Molecular autism*. 2017 Dec;8(1):31.

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

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

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

362. Elia J, Gai X, Xie HM, Perin JC, Geiger E, Glessner JT, D'arcy M, Frackelton E, Kim C, Lantieri F, Muganga BM. Rare structural variants found in attention-deficit hyperactivity disorder are preferentially associated with neurodevelopmental genes. *Molecular psychiatry*. 2010 Jun;15(6):637.

363. Gimelli S, Capra V, Di Rocco M, Leoni M, Mirabelli-Badenier M, Schiaffino MC, Fiorio P, Cuoco C, Gimelli G, Tassano E. Interstitial 7q31. 1 copy number variations disrupting IMMP2L gene are associated with a wide spectrum of neurodevelopmental disorders. *Molecular cytogenetics*. 2014 Dec;7(1):54.
364. Lu B, Poirier C, Gaspar T, Gratzke C, Harrison W, Busija D, Matzuk MM, Andersson KE, Overbeek PA, Bishop CE. A mutation in the inner mitochondrial membrane peptidase 2-like gene (*Immp2l*) affects mitochondrial function and impairs fertility in mice. *Biology of reproduction*. 2008 Apr 1;78(4):601-10.
365. Ma Y, Mehta SL, Lu B, Li PA. Deficiency in the inner mitochondrial membrane peptidase 2-like (*Immp21*) gene increases ischemic brain damage and impairs mitochondrial function. *Neurobiology of disease*. 2011 Dec 31;44(3):270-6.
366. Gokoolparsadh A, Fang Z, Braidy N, Lin P, Pardy CJ, Eapen V, Clarke R, Voineagu I. Transcriptional response to mitochondrial protease IMMP2L knockdown in human primary astrocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2017 Jan 22;482(4):1252-8.
367. Szafranski P, Schaaf CP, Person RE, Gibson IB, Xia Z, Mahadevan S, Wiszniewska J, Bacino CA, Lalani S, Potocki L, Kang SH. Structures and molecular mechanisms for common 15q13. 3 microduplications involving *CHRNA7*: benign or pathological?. *Human mutation*. 2010 Jul;31(7):840-50.
368. Soler-Alfonso C, Carvalho CM, Ge J, Roney EK, Bader PI, Kolodziejska KE, Miller RM, Lupski JR, Stankiewicz P, Cheung SW, Bi W. *CHRNA7* triplication associated with cognitive impairment and neuropsychiatric phenotypes in a three-generation pedigree. *European Journal of Human Genetics*. 2014 Sep;22(9):1071.
369. Xie Y. Is Chromosome 15q13. 3 Duplication Involving *CHRNA7* Associated With Oral Clefts?. *Child neurology open*. 2015 Dec 11;2(4):2329048X15618918.
370. Gillentine MA, Schaaf CP. The human clinical phenotypes of altered *CHRNA7* copy number. *Biochemical pharmacology*. 2015 Oct 15;97(4):352-62.
371. Gillentine MA, Yin J, Bajic A, Zhang P, Cummock S, Kim JJ, Schaaf CP. Functional Consequences of *CHRNA7* Copy-Number Alterations in Induced Pluripotent Stem Cells and Neural Progenitor Cells. *The American Journal of Human Genetics*. 2017 Dec 7;101(6):874-87.
372. Zheng C, Heintz N, Hatten ME. CNS gene encoding astrotactin, which supports neuronal migration along glial fibers. *Science*. 1996 Apr 19;272(5260):417-9.
373. Wilson PM, Fryer RH, Fang Y, Hatten ME. *Astn2*, a novel member of the astrotactin gene family, regulates the trafficking of *ASTN1* during glial-guided neuronal migration. *Journal of Neuroscience*. 2010 Jun 23;30(25):8529-40.
374. Lionel AC, Tammimies K, Vaags AK, Rosenfeld JA, Ahn JW, Merico D, Noor A, Runke CK, Pillalamarri VK, Carter MT, Gazzellone MJ. Disruption of the *ASTN2/TRIM32* locus at 9q33. 1 is a risk factor in males for autism spectrum disorders, ADHD and other neurodevelopmental phenotypes. *Human molecular genetics*. 2013 Dec 30;23(10):2752-68.
375. Wang KS, Liu XF, Aragam N. A genome-wide meta-analysis identifies novel loci associated with schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophrenia research*. 2010 Dec 1;124(1-3):192-9.
376. van Hengel J, Calore M, Baucé B, Dazzo E, Mazzotti E, De Bortoli M, Lorenzon A, Li Mura IE, Boffagna G, Rigato I, Vleeschouwers M. Mutations in the area composita protein α T-catenin are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *European heart journal*. 2012 Nov 7;34(3):201-10.
377. Lesca G, Rudolf G, Labalme A, Hirsch E, Arzimanoglou A, Genton P, Motte J, de Saint Martin A, Valenti MP, Boulay C, De Bellescize J. Epileptic encephalopathies of the Landau-

Kleffner and continuous spike and waves during slow-wave sleep types: Genomic dissection makes the link with autism. *Epilepsia*. 2012 Sep;53(9):1526-38.

378. Bacchelli E, Ceroni F, Pinto D, Lomartire S, Giannandrea M, D'Adamo P, Bonora E, Parchi P, Tancredi R, Battaglia A, Maestrini E. A CTNNA3 compound heterozygous deletion implicates a role for α T-catenin in susceptibility to autism spectrum disorder. *Journal of neurodevelopmental disorders*. 2014 Dec;6(1):17.

379. Bullard JM, Cai YC, Demeler B, Spremulli LL. Expression and characterization of a human mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase1. *Journal of molecular biology*. 1999 May 14;288(4):567-77.

380. Shamseldin HE, Alshammari M, Al-Sheddi T, Salih MA, Alkhalidi H, Kentab A, Repetto GM, Hashem M, Alkuraya FS. Genomic analysis of mitochondrial diseases in a consanguineous population reveals novel candidate disease genes. *Journal of medical genetics*. 2012 Apr 1;49(4):234-41.

381. Elo JM, Yadavalli SS, Euro L, Isohanni P, Götz A, Carroll CJ, Valanne L, Alkuraya FS, Uusimaa J, Paetau A, Caruso EM. Mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase mutations underlie fatal infantile Alpers encephalopathy. *Human molecular genetics*. 2012 Jul 23;21(20):4521-9.

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

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

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

387. Chergui K, Svenningsson P, Greengard P. Physiological role for casein kinase 1 in glutamatergic synaptic transmission. *Journal of Neuroscience*. 2005 Jul 13;25(28):6601-9.

388. Hardingham GE, Bading H. The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends in neurosciences*. 2003 Feb 1;26(2):81-9.

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

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

391. Dulubova I, Khvotchev M, Liu S, Huryeva I, Südhof TC, Rizo J. Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007 Feb 20;104(8):2697-702.

392. Ho A, Morishita W, Atasoy D, Liu X, Tabuchi K, Hammer RE, Malenka RC, Südhof TC. Genetic analysis of Mint/X11 proteins: essential presynaptic functions of a neuronal adaptor protein family. *Journal of Neuroscience*. 2006 Dec 13;26(50):13089-101.

393. Simons A, Shaffer LG, Hastings RJ. Cytogenetic nomenclature: changes in the ISCN 2013 compared to the 2009 edition. *Cytogenetic and genome research*. 2013;141(1):1-6.

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

395. Желязкова, С. „Клинико-генетично проучване на някои форми на наследствена парциална епилепсия и генетична епилепсия с фебрилни гърчове плюс” 2013, дисертационен труд.
396. Йорданова, И. „Изясняване на основните молекулни характеристики на епилепсии с фебрилно-провокирани пристъпи и неонатални епилептични пристъпи при български пациенти“ 2013, дисертационен труд.

Цитирани електронни източници:

- BMC Bioinformatics. 2010 Nov 8;11(1):548. DOI: 10.1186/1471-2105-11-548. PubMed: 21059217. Project HOPE
- Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu>)
- PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/>)
- PROVEAN/SIFT (<http://provean.jcvi.org/>)
- Mutation taster (www.mutationtaster.org/)
- NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk>)
- Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF3/>)
- Ensembl (<http://www.ensembl.org>)
- 1000Genomes (<http://www.internationalgenome.org/>)
- Human Gene Mutation Database - HGMD (www.hgmd.cf.ac.uk)
- Exome Aggregation Consortium (<http://exac.broadinstitute.org>)
- ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>)
- база - данни за SCN1A мутации на Лабораторията по Молекулярна генетика, Университет на Антверпен (<http://www.molgen.vib-ua.be/SCN1AMutations/>)
- OMIM - Online Mendelian Inheritance of Man: (<https://www.omim.org>)
- GeneCards: (<https://www.genecards.org>)
- DECIPHER: (<https://decipher.sanger.ac.uk/>)
- ISCA Consortium: (<http://dbsearch.clinicalgenome.org>)
- ClinVar: (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>)
- Database of Genomic Variants: (<http://dgv.tcag.ca>)



Център по Молекулна Медицина Медицински Университет- София

Аз, долуподписаният (баща): _____

Аз, долуподписаната (майка): _____

даваме съгласието си за включването на нашето дете _____ в _____ изследване _____ за молекулни дефекти при епилепсия.

ИНФОРМИРАНО СЪГЛАСИЕ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА МОЛЕКУЛНИ ДЕФЕКТИ ПРИ ЕПИЛЕПСИЯ

Информиран(а) съм, че:

■ Участието на нашето дете в настоящето изследване е напълно **ДОБРОВОЛНО** и че **съгласието или отказът ни за включването на детето ни в него, по никакъв начин няма да повлияе на лечението му**. Имаме право да прекратим участието му в това изследване по всяко време, като изразим писмено желанието си за това пред лекуващия го лекар или водещия изследовател. При необходимост от допълнителна информация за изследването и правата на детето ни като участник в него, можем да се обърнем към гореспоменатите.

■ Приемайки детето ни да участва в това изследване, ние даваме съгласието си да му бъде взета около 10 мл кръв по начина, по който това се прави при всички медицински изследвания на кръвта в Р. България и сме наясно, че рискът от тази манипулация не е по-висок от средностатистическия за медицинските заведения в страната. В някои случаи материалът за анализ може да се окаже недостатъчен или некачествен и тогава може да е необходимо отново да му се вземе кръв. Ако това се случи, запазваме правото си да откажем и приемаме, че в резултат на отказа ни, генетичният анализ на нашето дете може би няма да бъде проведен до край.

■ Кръвта ще се използва за извличане на ДНК, която ще бъде използвана за генетично изследване. ДНК пробата ще бъде обозначена с код, което ще осигури неговата анонимност. Информацията за детето ни ще бъде достъпна само на насочващия лекар и оторизираните членове на изследователския екип, които носят отговорност за запазване на анонимността му.

■ След приключване на изследванията, част от ДНК на детето ни ще се съхранява в ДНК банката на Център по Молекулна Медицина при пълно спазване на условията за конфиденциалност на личната му информация, единствено за целите на бъдещи научни изследвания на епилепсията. Центърът може да повтори анализите в бъдеще чрез нови, разширени или подобрени методи с остатък от ДНК, ако това е необходимо и възможно.

■ При необходимост анонимно ДНК пробите и клиничните данни на нашето дете могат да бъдат транспортирани до други научни институции в страната и чужбина за участие в други изследвания, както и публикувани в научни списания и бази данни.

Поставените от нас подписи по-долу потвърждават доброволното участие на нас и детето ни в това изследване, но в никакъв случай не освобождава лабораторията и персонала ѝ от тяхната професионална и етична отговорност.

В случай, че получените резултати имат отношение към диагностиката или лечението на заболяването на детето ни, желаем те да ни бъдат съобщени лично, чрез насочващия лекар. Резултатите му са поверителни и могат да бъдат съобщавани на други лица само след нашето писмено съгласие.

Получихме копие от това съгласие:

Дата: _____

Подпис (баща): _____

Подпис (майка): _____

Обясних същността на изследването на горепосочения(ната) и отговорих на всички зададени въпроси.

Име: _____ Дата: _____ Подпис: _____



Център по Молекулна Медицина
Медицински Университет- София

Аз, долуподписаният(ната): _____ съм съгласен(на) да участвам в изследване за молекулни дефекти при епилепсията. С настоящото давам съгласието си за включване в изследването.

**ИНФОРМИРАНО СЪГЛАСИЕ
ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА МОЛЕКУЛНИ ДЕФЕКТИ ПРИ ЕПИЛЕПСИЯ**

Информиран(а) съм, че:

Участието ми в настоящето изследване е напълно **ДОБРОВОЛНО** и че съгласието или отказът за включването ми в него, по никакъв начин няма да повлияе на лечението на детето ми. Имам право да прекратя участието ни в това изследване по всяко време, като изразя писмено желанието си за това пред лекуващия лекар или водещия изследовател. При необходимост от допълнителна информация за изследването и правата на мен и детето ми като участници в него, мога да се обърна към гореспоменатите.

Приемайки детето ми да участва в това изследване, аз давам съгласието си да ми бъде взета около 10 мл кръв по начина, по който това се прави при всички медицински изследвания на кръвта в Р. България и съм наясно, че рискът от тази манипулация не е по-висок от среднестатистическия за медицинските заведения в страната. В някои случаи материалът за анализ може да се окаже недостатъчен или некачествен и тогава може да е необходимо отново да ми се вземе кръв. Ако това се случи, запазвам правото си да откажа и приемам, че в резултат на отказа ми, генетичният анализ на моето дете може би няма да бъде проведен до край.

Кръвта ще се използва за извличане на ДНК, която ще бъде използвана за генетично изследване. ДНК пробата ще бъде обозначена с код, което ще осигури моята анонимност. Информацията за мен ще бъде достъпна само на насочващия лекар и оторизираните членове на изследователския екип, които носят отговорност за запазване на анонимността ми.

След приключване на изследванията, част от моята ДНК ще се съхранява в ДНК банката на Център по Молекулна Медицина при пълно спазване на условията за конфиденциалност на личната ми информация, единствено за целите на бъдещи научни изследвания на епилепсията. Центърът може да повтори анализите в бъдеще чрез нови, разширени или подобрени методи с остатъка от ДНК, ако това е необходимо и възможно.

При необходимост анонимно моите ДНК проби и клинични данни могат да бъдат транспортирани до други научни институции в страната и чужбина за участие в други изследвания, както и публикувани в научни списания и бази данни.

Поставеният от мен подпис по-долу потвърждава доброволното ми участие в това изследване, но в никакъв случай не освобождава лабораторията и персонала ѝ от тяхната професионална и етична отговорност.

В случай, че получените резултати имат отношение към диагностиката или лечението на заболяването на детето ми, желая те да ми бъдат съобщени лично, чрез насочващия лекар. Резултатите му са поверителни и могат да бъдат съобщавани на други лица само след моето писмено съгласие.

Получих копие от това съгласие:

Дата: _____

Подпис: _____

Обясних същността на изследването на горепосочения(ната) и отговорих на всички зададени въпроси.

Име: _____ Дата: _____ Подпис: _____

Медицински университет - София

Эпилепсия

/noðnuc/

/телефон/

☐ ДА ☐ НЕ епикриза ☐ ДА ☐ НЕ родословно дърво

☐ ДА ☐ НЕ Директно секвениране на SCN1A гена ☐ ДА ☐ НЕ Сравнителна геномна☐ ДА ☐ НЕ Сравниелна геномна

□ ДА □ НЕ Next Generation

дата на вземане кръв

БАЩА /трите имена/

|| || || || || ||

Етн.произход

11

телефон

НАЧЕРТАЙТЕ РОДОСЛОВНО ДЪРВО

(Включете всички членове на семейството, за които сте получили информация, отбележете засегнатите родственици и означете със звездичка тези от които изпращате кръв с настоящата поръчка)

Лица от които е взет БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ

N	Трите имена	Диагноза	Роден/а на	Връзка с пробанда	Дата на вземане
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					

1. БРЕМЕННОСТ, РАЖДАНЕ И ОБЩО РАЗВИТИЕ

Бременност: ☐ Нормална ☐ С усложнения.....
Продължителност на бременността: ☐ Нормална ☐ Преждевременно прекъсване в седмица [] + [] ден
Раждане: ☐ Нормално ☐ С усложнения.....
Развитие на детето: ☐ Нормално ☐ Забавено, *уточнете*.....
Доминираща ръка: ☐ Лява ☐ Дясна

2. ЕТИОЛОГИЯ НА ЕПИЛЕПСИЯТА

☐ НЕ ☐ ДА Травма: ☐ Без загуба на съзнание ☐ Със загуба на съзнание
☐ НЕ ☐ ДА Мозъчна инфекция: ☐ Менингит ☐ Енцефалит ☐ Мозъчен абцес ☐
Друго.....
☐ НЕ ☐ ДА Мозъчна операция: *уточнете*..... ☐ НЕ ☐ ДА Асфиксия:
уточнете.....
☐ НЕ ☐ ДА Употреба на алкохол ☐ НЕ ☐ ДА Други вероятни причини

3. ФЕБРИЛНИ ГЪРЧОВЕ (FS)

Начало: [] Последен припадък: [] Продължителност: []
Локализация на FS: ☐ Фокална ☐ Генерализирана
Тип на FS*: ☐ Прост ☐ Сложен
*Прост =генерализирани тонично-клонични без латерализация, продължителност по-малка от 15мин., без повторение през следващите 24 часа;
Сложен =фокален или с фокално начало, или с продължителност по-голяма от 15мин., или 2 или повече гърча за 24 часа

4. ЕПИЛЕПСИЯ

Възраст на първи пристъп: [] Възраст на последен пристъп: []
Честота на пристъпите: []
☐ НЕ ☐ ДА Провокационни фактори: ☐ Инфекция ☐ Безсъние ☐ Фоточувствителност ☐ Друго
☐ НЕ ☐ ДА Епилептичен статус до момента: ☐ Частични ☐ Генерализирани ☐ Брой: []

☐ НЕ ☐ ДА Аура:

описание.....

Тип епилепсия:

Източник на информация:.....

Описание на ВСЕКИ тип припадък:.....

КЛАСИФИКАЦИЯ НА ЕПИЛЕПТИЧНИТЕ ПРИСТЪПИ

(Задължителна и максимално точна; при несигурни или недостатъчни данни да се отбелязват с “?” възможните варианти):

☐ НЕ ☐ ДА ЧАСТИЧНИ (фокални) пристъпи:

Прости парциални (без загуба на съзнание):

С двигателни симптоми:

- ☐ Частични моторни с Джаксънов марш
- ☐ Частични моторни с Джаксонов марш, Адверзивни
- ☐ Постурални
- ☐ Фонаторни (вокализация и прекъсване на речта)

Със соматосензорни или специални
сензорни симптоми:

- ☐ Соматосензорни
- ☐ Визуални
- ☐ Слухови
- ☐ Обонятелни
- ☐ Вкусови
- ☐ Вертигинозни

Начало:[.....]

С автономни симптоми включващи:

- ☐ Епигастриални усещания
- ☐ Други висцерални симптоми
- ☐ Бледост
- ☐ Потен

С психични симптоми

(смущение на висшите мозъчни функции):

- ☐ Дисфазични
- ☐ Дисмнестични (déjà-vu, др.)
- ☐ Познавателни (изкривяване на чувството за време и т.н)
- ☐ Афективни (страх и т.н)
- ☐ Илюзии
- ☐ Халюцинации

Последен припадък:[.....]

Комплексни частични (със загуба на съзнание)

☐ Начало с прост парциален пристъп последван от
загуба на съзнание (=> точно определяне на вида
на простия парциален пристъп от таблицата по-горе)
уточнение.....

симптоми:.....

Начало:[.....]

☐ Начало на загуба на съзнание:

- ☐ Само загуба на съзнание
- ☐ С автоматизъм,
- ☐ С други

Последен припадък:[.....]

Частични пристъпи с развитие във вторично генерализирани пристъпи

Начало:[.....]

Последен припадък:[.....]

☐ НЕ ☐ ДА ГЕНЕРАЛИЗИРАНИ пристъпи:

- ☐ Абсансни ☐ Миоклонични ☐ Клонични ☐ Тонични ☐ Тонично-клонични
- ☐ Атонични

Начало:[.....]

Последен припадък:[.....]

КЛАСИФИКАЦИЯ НА ЕПИЛЕПТИЧНИЯ СИНДРОМ

(При несигурни или недостатъчни данни да се отбелязват с «?» възможните варианти):

☐ НЕ ☐ ДА ИДИОПАТИЧЕН ЕПИЛЕПТИЧЕН СИНДРОМ

ПАРЦИАЛЕН идиопатичен епилептичен синдром:

- ☐ Автозомно-доминантна нощна фронтална епилепсия (ADNFLE)
- ☐ Фамилна парциална епилепсия с вариабилни фокуси (FPEVF)
- ☐ Фамилна мезиална темпорална епилепсия (FMTLE)
- ☐ Роландова епилепсия (BECTS)
- ☐ Автозомно-доминантна парциална епилепсия със
слухови прояви (ADPEAF)
- ☐ Синдром на Gastaut (Идиопатична окципитална епилепсия с
късно начало GS)
- ☐ Парциална епилепсия с периферални пики (PEPS)
- ☐ Синдром на Panayiotopoulos (PS)

☐ Друго, уточнете.....

Начало:[.....]

Последен припадък:[.....]

ГЕНЕРАЛИЗИРАН идиопатичен епилептичен синдром:

- | | |
|--|---|
| ☐ Генерализирана епилепсия с фебрилни гърчове (GEFS+) | ☐ Епилепсия с ГТКП при събуждането |
| ☐ Детска абсансна епилепсия | ☐ West синдром |
| ☐ Ювенилна абсансна епилепсия | ☐ Lenox Gastaut синдром |
| ☐ Ювенилна миоклонична епилепсия | ☐ Друго, уточнете |

Начало:[.....]

Последен припадък:[.....]

5. КОМОРБИДНОСТ

- | | |
|--|--|
| ☐ НЕ ☐ ДА Мигрена | ☐ НЕ ☐ ДА Атаксия |
| ☐ НЕ ☐ ДА Тремор | ☐ НЕ ☐ ДА Депресия |
| ☐ НЕ ☐ ДА Хореоатетоза | ☐ НЕ ☐ ДА Паметови затруднения |
| ☐ НЕ ☐ ДА Психоза | |
| ☐ НЕ ☐ ДА Умствено изоставане: използван тест (напр. IQ-тест) и резултати..... | |
| ☐ НЕ ☐ ДА Други психиатрични заболявания, уточнете | |
| ☐ НЕ ☐ ДА Други допълнителни особености, уточнете | |

6. ЛЕЧЕНИЕ

☐ НЕ ☐ ДА Текущо анти-епилептично

лечение:.....

- | | | |
|---|---------------------------------------|---|
| ☐ НЕ ☐ ДА Странични ефекти | ☐ Без пристъпи | ☐ Намаляване на честотата с над 50% |
| ☐ НЕ ☐ ДА Ефект от настоящото лечение: | ☐ Без ефект | ☐ Намаляване на честотата с под 50% ☐ Влошаване |
| ☐ НЕ ☐ ДА Епилепсията е терапевтично-резистентна | | |
| ☐ НЕ ☐ ДА Допълнителна медикация (напр. невролептици, антидепресанти и др.) | | |

7. НЕВРОЛОГИЧЕН ПРЕГЛЕД:

ЧМН:	☐ Норма ☐ Отклонение	Моторика:	☐ Норма ☐ Отклонение
Походка:	☐ Норма ☐ Отклонение.....	Сетивност:	☐ Норма ☐ Отклонение
Рефлекси:	☐ Норма ☐ Отклонение	Координация:	☐ Норма ☐ Отклонение
Друго:.....			

8. ИЗСЛЕДВАНЕ:

ЕЕГ

описание:.....

.....

.....

Основна активност: ☐ Норма ☐ Отклонение

Дифузни абнормности: ☐ Норма ☐ Отклонение

Огнищни абнормности: ☐ Норма ☐ Отклонение

Приложение 4

Праймери, използвани за амплификация на *SCN1A* гена (Claes et al., 2001)

Екзон	Forward	Reverse	Дължина на продукта (бдв)	Т°С на хибридизация
1	TCATGGCACAGTTCCTGTATC	GCAGTAGGCAATTAGCAGCAA	589	62
2	TGGGGCACTTTAGAAATTGTG	TGACAAAGATGCAAAATGAGAG	391	56
3	GCAGTTTGGGCTTTTCAATG	TGAGCATTGTCCTCTTGCTG	314	56
4	AGGGCTACGTTTCATTTGTATG	TGTGCTAAATTGGAATCCAGAG	421	62
5	CAGCTCTTCGCACTTTCAGA	TCAAGCAGAGAAGGATGCTGA	307	60
6	AGCGTTGCAAAACATTCTTGG	GGGATATCCAGCCCCTCAAG	477	60
7	GACAAATACTTGTGCCTTTGAATG	ACATAATCTCATACTTTATCAAAAACC	362	58
8	GAAATGGAGGTGTTGAAAATGC	AATCCTTGGCATCACTCTGC	581	58
9	AGTACAGGGTGCTATGACCAAC	TCCTCATAACAACACCTGCTC	440	60
10	TCTCCAAAAGCCTTCATTAGG	TTCTAATTCTCCCCCTCTCTCC	544	60
11	TCCTCATTCTTTAATCCCAAGG	GCCGTCTGTAGAAACACTGG	670	58
12	GTCAGAAATATCTGCCATCACC	GAATGCACTATTCCCAACTCAC	372	60
13	TGGGCTCTATGTGTGTGTCTG	GGAAGCATGAAGGATGGTTG	543	60
14	TACTTCGCGTTTCCACAAGG	GCTATGCAGAACCCTGATTG	433	56
15	ATGAGCCTGAGACGGTTAGG	ATACATGTGCCATGCTGGTG	544	62
16	TGCTGTGGTGTTTCCTTCTC	TGTATTCATACCTTCCACACC	658	60
17	AAAAGGGTTAGCACAGACAATG	ATTGGGCAGATATAATCAAAGC	489	60
18	CACACAGCTGATGAATGTGC	TGAAGGGCTACACTTTCTGG	567	58
19	TCTGCCCTCCTATTCCAATG	GCCCTTGTCTTCCAGAAATG	445	56
20	AAAAATTACATCCTTTACATCAAATG	TTTTGCATGCATAGATTTTCC	395	60
21	TGAACCTTGCTTTTACATATCC	ACCCATCTGGGCTCATAAAC	579	56
22	TGCTCTGGTCCAAAATCTGTG	TTGGTCGTTTATGCTTTATTCG	283	56
23	CCCTAAAGGCCAATTTTCAGG	ATTTGGCAGAGAAAACACTCC	378	60
24	GAGATTTGGGGGTGTTTGTG	GGATTGTAATGGGGTGCTTC	600	58
25	CAAAAATCAGGGCCAATGAC	TGATTGCTGGGATGATCTTG	483	60
26a*	AGGACTCTGAACCTTACCTTGG	TGTACATGTTCCACCACAACCAG	589	62
26b*	TGTGGGAACCCATCTGTTG	CCATGAATCGCTCTTCCATC	418	55
26c*	TGCTTTTACAAAGCGGGTTC	GTTTGCTGACAAGGGGTCAC	592	58

*Екзон 26 се амплифицира в три части, тъй като е с голяма дължина; Удебелените праймери са тези, използвани по време на секвенционната реакция за получаване на секвенционен продукт.

Приложение 5

Праймери, използвани за амплификация на *KCNQ2* гена (Claes et al., 2004)

Екзон	Forward	Reverse	Дължина на продукта (бдв)	Т°С на хибризация
1	CGGCAGGAGTGCGGAAC	TGTACAATCGCTCTCCGGTC	604	59
2	CTATGGGGGTGCCCTCTGG	GGAAGTACAGGGCACAAAGAC	426	66
3	GCTCAGCTGTGTTCCCGGAT	GCCACATTCCTCTTCCTGACATT	543	64
4	CACAGGCAGGGTGGACGATAGTA	AGTCACGAGAAGAAGCACCCGAGA	552	64
5	TGCTTCTGGTGATGGTGCTC	AGGTGGCCCCAAAGAGATG	286	62
6	TAGGGGAAGAGGAGAGAGGGCT	GAACAAGGCCTCTGACCCTGAG	278	66
7	CAGCACCCACACAAGGCAAG	TGGGGATATGGGTTCTTGATTA	616	64
8	AGAGTCCTGAGTGCCTGGCCTAC	GTCTTGCAACGCACAAAACAC	491	66
9	CTGGAAGCCCCGACCTTAGGAG	GGAGGCAGGACGAGAAGGGT	538	66
10	CATATCAACCTTCGCCCCCTCC	CTCTTCCCTCCTCCCTGCTGTC	577	66
11	CCATGGAGTCCCTCTTCCCTCT	CACAGTGCTGCAAAGTAAAACCG	492	66
12	CTGTGGCTTTGGAAGGAAAAGGT	GTTTCAAGAGCCCCTGGCTGG	576	66
13	GTGTGGCTGGCTGTTCTTCAGAC	ATAGGGGGTTCCCACTCCAAGAG	488	64
14	GGGAAGGTCCTGACTCGAGA	AGTGCCTCCAGGACATTCAG	471	64
15	AGAGCAGGGCCACATAAAGGC	GGAGAGATGGGAGAGACAGCAGA	500	66
16	GAACCTCACGGTGCCAGAAGAC	TGAAGCCCACACTGCCACAG	401	66
17-1	CTGGGTCCCCACATCTCCT	CTGAAGGAACGCTCCAGCTC	582	62
17-2	CGCCAGCATGGAGTTCCT	CCCATCCTTCAGCCCACAT	494	62

Забележка: Удебелените праймери са тези, използвани по време на секвенционната реакция за получаване на секвенционен продукт.

Приложение 6

Праймери, използвани за амплификация на *SLC2A1* гена

Екзон	Forward	Reverse	Дължина на продукта (бдв)	T°C на хибридизация
1	GCCGGGGTCCTATAAACGCTAC	CGCTAGATCCGAAGCCCATC	484	66
2	CTCCACCAGGGAAATGAGAC	GAATTCTGCCACCCTGATTC	601	60
3, 4	TCATCCCAGCAAGTCACACTGAG	CCTGGAACAGGCAGATAAGTCTCC	555	66
5, 6, 7, 8*	CTGAAGCAGCAGCTGACACAAAG	GGGGTTGCTGTGAAGATGAATTG	1532	63
9	TTCTGTTTCCCCTGAGGATC	CCTCCTCAGCATGATTCCTA	372	60
10a**	TGGGTAGGTGGATGTTCCCTTTT	AATCCTGGAGCCGTTAAGTCCTG	498	66
10b**	GGCTGATTCCCAAGTGTGAG	CCTCTCCTCCCTGCACTCC	622	62
10c- 3'UTR	ACAAAGCTTCTATCCCAGGAGGTG	TCTGTCTCACTCCCATCCAAACC	519	66
10d- 3'UTR	GGACAAGCCAACCTTGTAATACACCA	AGGAGGTGGGTGGAGTTAATGGA	516	66

*Заради близостта на екзони 5, 6, 7 и 8, както и късите интронни последователности между тях, те се амплифицират заедно. Поради големината на фрагмента, PCR програмата за амплификация е различна (виж Таблица 5). **Екзон 10 се амплифицира в две части, тъй като е с голяма дължина; Удебелените праймери са тези, използвани по време на секвенционната реакция за получаване на секвенционен продукт.

Приложение 7

Списък с откритите варианти с неясно клинично значение и вероятно непатогенен ефект, както и такива, неподлежащи на класификация

Пробанд	aCGH резултат, ISCN 2013 (393) (GRCh37/hg19)	Размер (Mb)	RefSeq гени
Варианти с неясна клинична значимост, неподлежащи на класификация			
172	12q24.21(114,269,080-114,518,222)x3	0.209	<i>RBM19</i>
405	12q24.21(114,375,674-114,488,102)x6	0.112	<i>RBM19</i>
446	1p32.1(60,012,563-60,046,416)x1	0.340	<i>FGGY</i>
330	5q15(94,764,426-94,864,722)x1	0.100	<i>TTC37</i>
365	1p36.13(16,865,855-17,363,695)x3	0.498	13 RefSeq гени; OMIM гени: <i>NBPF1</i> , <i>CTOCC</i> , <i>MFAP2</i> , <i>ATP13A2</i> , <i>SDHB</i>
406	1p35.2(31,524,655-31,875,619)x3	0.351	6 RefSeq гени; OMIM гени: <i>PUM1</i> , <i>NKAIN1</i> , <i>SNRNP40</i> , <i>ZCCHC17</i> , <i>FABP3</i>
Варианти с неясно клинично значение и вероятно непатогенен ефект			
171	9p24.3(194,193-386,907)x4	0.193	<i>DOCK8</i>
246	9p24.3(428,582-579,849)x3	0.151	<i>DOCK8</i> , <i>KANK1</i>
373	7q21.11(79,622,198-80,050,649)x3	0.428	<i>GNAI1</i>