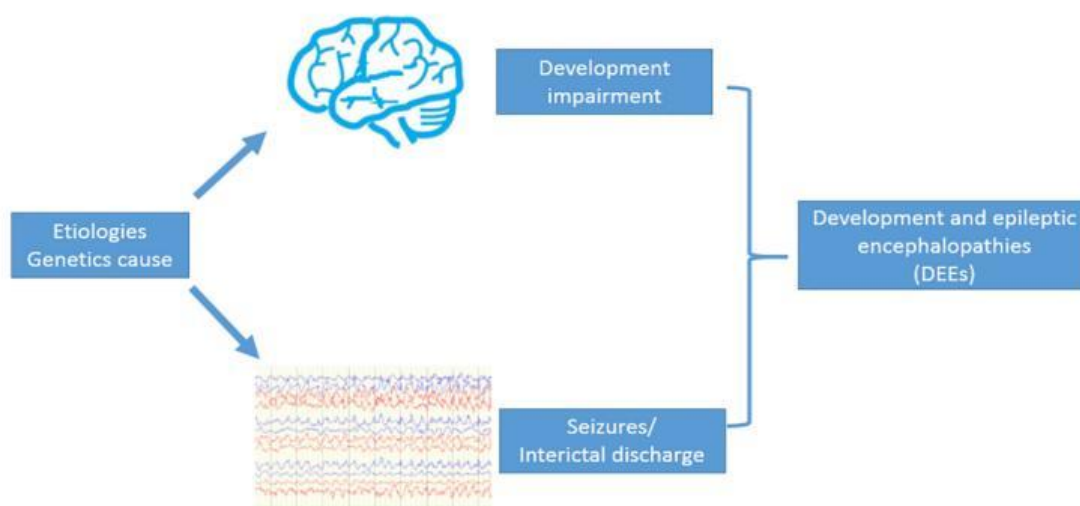




**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΥΓΕΙΑΣ ΜΗΤΕΡΑΣ- ΠΑΙΔΙΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ
ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΠΑΙΔΩΝ «Η ΑΓΙΑ ΣΟΦΙΑ»
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Ι.-Ρ. ΤΡΑΕΓΕΡ-ΣΥΝΟΔΙΝΟΥ**



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μοριακή γενετική διερεύνηση ασθενών με πρώιμη επιληπτική και πρώιμη μιτοχονδριακή εγκεφαλοπάθεια

Βελτρά Δανάη

Μοριακή Βιολόγος & Γενετίστρια

Αθήνα 2022

Ὄρκος του Ιπποκράτη

Ὅμνυμι Απόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε.

Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωντέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξῃν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσι τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι του ἔμῃ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλω δὲ οὐδενί.

Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἶρξιν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑψηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ομοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνώως δὲ καὶ οσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τησδε.

Ἐς οἰκίας δὲ οκόσας ἂν εἶώ, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς εὖν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα.

Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγχέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένω παρὰ πασιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιορκοῦντι, τάναντία τουτέων.

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΙΤΗΣΕΩΣ ΤΗΣ ΥΠΟΨΗΦΙΑΣ ΓΙΑ ΟΡΙΣΜΟ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 23/11/2015

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 3/6/2015

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

- κα. Μαρία-Ροζέ Πονς-Ροντρίγκεθ, Αναπλ. Καθηγήτρια Παιδιατρικής Νευρολογίας (Επιβλέπουσα)
- κα. Κίτσιου-Τζέλη Σοφία, Καθηγήτρια Γενετικής*
- κα. Τζέτη Μαρία, Καθηγήτρια Γενετικής

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΘΕΜΑΤΟΣ: 04/06/16

*Λόγω αφυπηρέτησης της κας Σοφίας Κίτσιου-Τζέλη, πραγματοποιήθηκε αλλαγή μέλους της Τριμελούς Συμβουλευτικής επιτροπής και αντικατάσταση από την κα. Ιωάννα - Ραχήλ Συνοδινού Traeger, Καθηγήτρια Γενετικής

Το ερευνητικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Γενικού Νοσοκομείου Παιδων «Η Αγία Σοφία» κατά τη συνεδρίαση του στις 09/06/16. (Αρ.πρωτ: 12160/23-05-16)

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΙΤΗΣΗΣ ΠΑΡΑΤΑΣΗΣ: 17/02/2022

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΠΑΡΑΤΑΣΗΣ: 23/09/2022

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 22/09/2022

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής

κ. Γεράσιμος Σιάσος, Καθηγητής Καρδιολογίας

ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

- κα. Μαρία-Ροζέ Πονς-Ροντρίγκεθ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής Νευρολογίας (Επιβλέπουσα)
- κα. Ιωάννα-Ραχήλ Συνοδινού-Traeger, Καθηγήτρια Γενετικής
- κα. Μαρία Τζέτη, Καθηγήτρια Γενετικής
- κα. Χρυσταλλένα Σοφοκλέους, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής
- κ. Περικλής Μακρυθανάσης, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής
- κ Γεώργιος Βάρτζελης, Επίκουρος Καθηγητής Παιδιατρικής Νευρολογίας
- κ. Αργύριος Ντινόπουλος, Καθηγητής Παιδιατρικής Νευρολογίας

Ξενογλωσσες δημοσιεύσεις από την παρούσα διατριβή

- **Danai Veltra**, Faidon-Nikolaos Tilemis, Nikolaos M. Marinakis, Maria Svingou, Anastasios Mitrakos, Konstantina Kosma, Irene Tsoutsou, Periklis Makrythanasis, Virginia Theodorou, Marina Katsalouli, Pelagia Vorgia, Georgios Niotakis, Georgios Vartzelis, Argirios Dinopoulos, Athanasios Evangeliou, Stella Mouskou, Anastasia Korona, Sotiria Mastroiyanni, Antigone Papavasiliou, Maria Tzetis, Roser Pons, Joanne Traeger-Synodinos, Christalena Sofocleous (2022) **Combined exome analysis and exome depth assessment achieves a high diagnostic yield in an epilepsy cohort, revealing significant genomic heterogeneity and novel mechanisms**. Submitted in Expert Review of Molecular Diagnostics.
- **Veltra D.**, Kosma K., Papavasiliou A., Tilemis F.-N., Traeger-Synodinos J., Sofocleous C. (2022) **A novel pathogenic ATP6V1B2 variant: widening the genotypic spectrum of the epileptic neurodevelopmental phenotype**. American Journal of Medical Genetics Part A, DOI: 10.1002/ajmg.a.62971
- Pavinato L., Delle Vedove A., Carli D., Ferrero M., Carestiato S., Howe J. L., Agolini E., Coviello D. A., van de Laar I., Au P. Y. B., Di Gregorio E., Fabbiani A., Croci S., Mencarelli M. A., Bruno L. P., Renieri A., **Veltra D.**, Sofocleous C., Faivre L., Mazel B., Safraou H., Denommé-Pichon A. S., Slegtenhorst M. A., Noor Giesbertz N., van Jaarsveld R. H., Childers A., Rogers R. C., Novelli A., De Rubeis S., Buxbaum J. D., Scherer S. W., Ferrero G. B., Wirth B., Brusco A. (2022) **CAPRIN1 haploinsufficiency causes a neurodevelopmental disorder with language impairment, ADHD and ASD**. Brain, Jul 27;awac278. DOI: 10.1093/brain/awac278.
- Marinakis, N. M., Svingou, M., **Veltra, D.**, Kekou, K., Sofocleous, C., Tilemis, F. N., Kosma, K., Tsoutsou, E., Fryssira, H., & Traeger-Synodinos, J. (2021). **Phenotype-driven variant filtration strategy in exome sequencing toward a high diagnostic yield and identification of 85 novel variants in 400 patients with rare Mendelian disorders**. American Journal of Medical Genetics Part A, 185(8), 2561–2571. DOI: 10.1002/ajmg.a.62338

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΒΕΛΤΡΑ ΔΑΝΑΗ

Μοριακή Βιολόγος & Γενετίστρια

ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

2015- 2022:

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή
Υποψήφια διδάκτωρ στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών

2009 - 2014:

Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής
Απόφοιτη Τμήματος Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής με βαθμό πτυχίου «Καλώς».

2009

Απολυτήριο δευτεροβάθμιας εκπαίδευσης από την Ελληνογαλλική Σχολή Jeanne D' Arc, με βαθμό «Άριστα».

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΣΤΑΔΙΟΔΡΟΜΙΑ

2015 - 2022:

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή
Υποψήφια διδάκτωρ στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής
Πεδίο έρευνας : «Μοριακή γενετική διερεύνηση ασθενών με πρώιμη επιληπτική και πρώιμη μιτοχονδριακή εγκεφαλοπάθεια».

Τεχνικές:

Παρασκευή πηκτωμάτων αγαρόζης, ηλεκτροφόρηση, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), ανάλυση της πρωτοταγούς δομής DNA (DNA sequencing), μελέτη του προτύπου απενεργοποίησης του X χρωμοσώματος, ECMA (Enzymatic cleavage mismatched analysis), MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification), MS-MLPA (Methylation-Specific MLPA), σχεδιασμός εργαστηριακών πρωτοκόλλων και εφαρμογή τεχνικών ανίχνευσης παραλλαγών στο DNA, ανάλυση σύνδεσης (linkage analysis) θραυσμάτων με πολυμορφικούς δείκτες (STRs analysis), χρήση in silico προγράμματος αξιολόγησης ευρημάτων και βιοπληροφορικής ανάλυσης αποτελεσμάτων από αλληλούχηση επόμενης γενιάς NGS: PolyPhen 2, VarMap, Human Splicing Finder 3, Mutation Taster, SIFT, VarSome, VarAFT, Franklin.

2013 - 2014:

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή

Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής

Διπλωματική Εργασία για την απόκτηση του πτυχίου

Τίτλος : «Αλληλούχηση του γονιδίου ENaC, υπομονάδα β σε ασθενείς με Κυστική Ίνωση».

Τεχνικές:

Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα, σχεδιασμός εκκινητών, τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction), ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR, ανάλυση της πρωτοταγούς δομής DNA (DNA sequencing), χρήση in silico προγραμμάτων ανάλυσης.

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

2018-σήμερα

Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών Νοσοκομείο Παιδών «Αγία Σοφία»

Συμβάσεις εργασίας ορισμένου χρόνου με αντικείμενο «Μοριακή διάγνωση επιληπτικών εγκεφαλοπαθειών συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων *MeCP2, CDKL5, ARX, FOXG1* και *SCN1A*».

2017-2018:

Συμβάσεις εργασίας ορισμένου χρόνου με το Ερευνητικό Πανεπιστημιακό Ινστιτούτο Μελέτης και Αντιμετώπισης Γενετικών και Κακοηθών Νοσημάτων της Παιδικής Ηλικίας (ΕΠΙΜΑΓΚΝΠΗ).

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1) **The genetic etiology in cerebral palsy mimics: The results from a Greek tertiary care center.**

Zouvelou V, Yubero D, Apostolakopoulou L, Kokkinou E, Bilanakis M, Dalivigka Z, Nikas I, Kollia E, Perez-Dueñas B, Macaya A, Marcé-Grau A, Voutetakis A, Anagnostopoulou K, Kekou K, Sofocleous C, **Veltra D**, Kokkinis X, Fryssira H, Torres RJ, Amstrong J, Santorelli FM, Artuch R, Pons R. Eur J Paediatr Neurol, 2019 May;23(3):427-437. doi: 10.1016/j.ejpn.2019.02.001.

2) **Detection of a novel unbalanced X;21 translocation in a girl with Turner syndrome phenotype.**

Elisavet Kouvidi , Sophia Zachaki , Nikoletta Selenti , **Danai Veltra** , Theodora Evmorforopoulou , Eirini Tsoutsou , Garifallia Tzifa , Christalena Sofocleous , Sarantis Gagos & Ariadni Mavrou Gynecol Endocrinol, 2021 Apr;37(4):377-381., doi:10.1080/09513590.2020.1865907.

3) **Phenotype-driven variant filtration strategy in exome sequencing toward a high diagnostic yield and identification of 85 novel variants in 400 patients with rare Mendelian disorders**

Nikolaos M. Marinakis, Maria Svingou, **Danai Veltra**, Kyriaki Kekou, Christalena Sofocleous, Faidon-Nikolaos Tilemis, Konstantina Kosma, Eirini Tsoutsou, Helen Fryssira, Joanne Traeger-Synodinos,

Am J Med Genet A, 2021, May 19. doi: 10.1002/ajmg.a.62338.

4) **Ovarian insufficiency and secondary amenorrhea in a patient with a novel variant within GDF9 gene.**

Marinakis NM, Tsoutsou E, Sofocleous C, **Veltra D**, Papaefthimiou P, Lytras A, Traeger-Synodinos J, Kanaka-Gantenbein C.

Menopause, 2022, Jan 10, doi: 10.1097/GME.0000000000001928.

5) **CAPRIN1 haploinsufficiency causes a neurodevelopmental disorder with language impairment, ADHD and ASD.**

Lisa Pavinato, Andrea Delle Vedove, Diana Carli, Marta Ferrero, Silvia Carestiato, Jennifer L Howe, Emanuele Agolini, Domenico A Coviello, Ingrid van de Laar, Ping Yee Billie Au, Eleonora Di Gregorio, Alessandra Fabbiani, Susanna Croci, Maria Antonietta Mencarelli, Lucia P Bruno, Alessandra Renieri, **Danai Veltra**, Christalena Sofocleous, Laurence Faivre, Benoit Mazel, Hana Safraou, Anne Sophie Denommé-Pichon, Marjon A van Slegtenhorst, Noor Giesbertz, Richard H van Jaarsveld, Anna Childers, R Curtis Rogers, Antonio Novelli, Silvia De Rubeis, Joseph D Buxbaum, Stephen W Scherer, Giovanni Battista Ferrero, Brunhilde Wirth, Alfredo Brusco

Brain, 2022, Jul 27, doi: 10.1093/brain/awac278.

6) **A novel pathogenic ATP6V1B2 variant: widening the genotypic spectrum of the epileptic neurodevelopmental phenotype.**

Veltra D., Kosma K., Papavasiliou A., Tilemis F.-N., Traeger-Synodinos J., Sofocleous C.

American Journal of Medical Genetics Part A, 2022, DOI: 10.1002/ajmg.a.62971

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Κατσούλα Γεωργία, Κέκου Κυριακή, Σβίγγου Μαρία, **Βελτρά Δανάη**, Κίτσιου-Τζέλη Σοφία, Λάμνησου Κλεονίκη **Μελέτη του αριθμού των επαναλήψεων του εξανουκλεοτιδίου GGGGCC στη μη κωδική περιοχή των γονιδίων C9ORF72 στον ελληνικό πληθυσμό.** (8η συνεδρία, P43, 38ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών).
2. **Δ. Βελτρά**, Χ. Σοφοκλέους, R. Pons, Α. Ευαγγελίου, Σ. Κίτσιου-Τζέλη **Μελέτη των γονιδίων CDKL5, FOXG1, ARX σε ασθενείς με επιληπτική εγκεφαλοπάθεια.** (Αναρτημένη Ανακοίνωση 1, 16ο Ετήσιο Παιδονευρολογικό Συνέδριο).
3. **Δανάη Βελτρά**, Χρισταλένα Σοφοκλέους, Roser Pons, Βασιλική Ζούβελου, Ελευθερία Κόκκινου, Μαρία Τζέτη, Σοφία Κίτσιου-Τζέλη **Μετάλλαξη στο γονίδιο FOXG1 σε ασθενή με Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency (MCAD).** (Αναρτημένη Ανακοίνωση 3, 11ο Πανελλήνιο Συνέδριο Επιληψίας)
4. Παναγιώτα Αθανασοπούλου, **Δανάη Βελτρά**, Αικατερίνη Γιαννίση, Χρισταλένα Σοφοκλέους, Ευτυχία Κολιού, Χριστόδουλος Ταλιαδώρος, Σάββας - Κωνσταντίνος Αλεβητσοβίτης, Παναγιώτης - Αθανάσιος Γεωργής, Ελένη Μαγκούτη, Σοφία Κίτσιου – Τζέλη, Βιργινία Θεοδώρου. **Διαυλοπάθεια νατρίου λόγω μετάλλαξης στο γονίδιο SCN1A σε αγόρι με ανθεκτική επιληψία και σκλήρυνση ιπποκάμπου.** (Αναρτημένη Ανακοίνωση 7, 11ο Πανελλήνιο Συνέδριο Επιληψίας).
5. **Βελτρά Δ.**, Σοφοκλέους Χ., Τζέτη Μ., Κίτσιου-Τζέλη Σ., Βάρτζελος Γ., Μαστρογιάννη Σ., Μούσκου Σ., Κατσαρού-Πεκτασίδη Ε., Βούδρης Κ., Φρυσίρα Ε. **Νεογνικοί σπασμοί σε κορίτσι με μετάλλαξη στο γονίδιο CDKL5.** (Προφορική Ανακοίνωση 1, 17ο Ετήσιο Παιδονευρολογικό Συνέδριο).
6. Ζαμπούνη Δ., Πολυμενοπούλου Μ.-Ε., Κώτσια Α., **Βελτρά Δ.**, Γαλετσέλλη Μ., Δρακωνάκη Σ., Κέκου Κ. **Ραβδομύωση σε αγόρι 9 ετών.** (Αναρτημένη Ανακοίνωση 10, 17ο Ετήσιο Παιδονευρολογικό Συνέδριο).
7. **Veltra D.**, Sofocleous C., Marinakis N., Pons R., Kitsiou-Tzeli S., Traeger-Synodinos J., Fryssira H. **Epileptic Encephalopathies: Exploring the underlying genetic defects – preliminary data**, Symposium in Clinical Genetics & Genomics, Athens, Greece, 2018
8. Marinakis N, Christopoulou G, **Veltra D**, Sviggou M, Kekou K, Sofocleous C, Tsoutsou E, Kosma K, Oikonomaki A, Constantoulakis P, Fryssira H, Traeger-Synodinos J. **Next**

- Generation Sequencing (NGS) as a key player in improving diagnostic yield for rare diseases (RDs): the collaborative experience of 2 centers in Greece.** European Journal of Human Genetics. 2019 Oct; 27: 1623-162
9. Marinakis, N., Sofocleous, C., Tsoutsou, E., **Veltra, D.**, Svingou, M., Traeger-Synodinos, J., & Fryssira, E. **Next Generation Sequencing in Marfan syndrome: rare genetic variants improve genotype phenotype correlation.** European Journal of Human Genetics, Vol. 28, No. SUPPL 1, pp. 837-838. European Human Genetics Conference, 2020
 10. Μαρινάκης Ν., **Βελτρά Δ.**, Σβίγγου Μ., Τηλέμης Φ., Σοφοκλέους Χ., Κέκου Κ., Traeger-Synodinos J., (2021). **Η συνεισφορά της Αλληλούχησης Επόμενης Γενιάς στον τερματισμό 20 ετών Διαγνωστικής Οδύσσειας**, 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο του Συνδέσμου Ιατρικών Γενετιστών Ελλάδας (ΣΙΓΕ), 20-21 Νοεμβρίου 2021.
 11. Τσαρουχά Χ., Σβίγγου Μ., Κοσμά Κ., **Βελτρά Δ.**, Σελέντη Ν., Κέκου Κ., Σοφοκλέους Κ., Συνοδινού-Traeger I. (2021). **Διερεύνηση θήλεος ατόμου με καρύοτυπο 46,XX,T(X,20)(P21,P12) και υπερCKαιμία.** 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΣΙΓΕ "Διερευνώντας το γονιδίωμα του ανθρώπου αντιμετωπίζοντας τα γενετικά νοσήματα", 20-21 Νοεμβρίου 2021
 12. **Βελτρά Δ.**, Σβίγγου Μ., Μαρινάκης Ν., Κοσμά Κ., Σοφοκλέους Χ., Κέκου Κ., Traeger-Synodinos J. (2021). **Αναστροφή φύλου και δυστροφιοπάθεια σε άτομο με καρύοτυπο 46,XY.** 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΣΙΓΕ "Διερευνώντας το γονιδίωμα του ανθρώπου αντιμετωπίζοντας τα γενετικά νοσήματα", 20-21 Νοεμβρίου 2021
 13. Σελέντη Ν., Τσαρουχά Χ., **Βελτρά Δ.**, Σοφοκλέους Χ., Κολιαλέξη Α., Traeger-Synodinos J. **Ισοδικεντρικό Y (idic Y) και διαταραχές ανάπτυξης του φύλου (Disorders of sex development/DSD).** 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΣΙΓΕ "Διερευνώντας το γονιδίωμα του ανθρώπου αντιμετωπίζοντας τα γενετικά νοσήματα", 20-21 Νοεμβρίου 2021
 14. Argyropoulou Maria, Sigala Ioanna, Nikolakopoulos Angeliki, Papatheodorou Olga, Karastathi Christina, Mouskou Stella, Korona Anastasia, Sakellaropoulou Afroditi, **Veltra Danai**, Mastroyianni Sotiria **Progressive myoclonic epilepsy type 2b (Iafora disease) in a 13-year-old boy with a novel pathogenic variant in the NHLRC1 gene.** (E-poster PO08-164, 14th European Pediatric Neurology Society Congress, Glasgow, 28 April- 2 May 2022)
 15. Pavinato L, Delle Vedove A, Carli D, Ferrero M, Carestiatto S, Howe J, Agolini E, Coviello D, van de Laar IMBH, Billie Au P, Di Gregorio E, Fabbiani A, Croci S, Mencarelli MA, Bruno L, Renieri A, **Veltra D**, Sofocleous C, Faivre L, Mazel B, Safraou H, Denommé-Pichon A-S, van Slegtenhorst M, Giesbertz N, van Jaarsveld R, Childers A, Rogers CC, Novelli A, De Rubeis S, Joseph Buxbaum J, Trajkova S, Haghshenas S, McConkey H, Kerkhof, J Sadikovic B, Scherer S, Battista Ferrero G, Wirth B, Brusco A. **CAPRIN1 haploinsufficiency causes an autosomal dominant neurodevelopmental disorder with defects in hiPSCs-derived neurons and an identifiable episignature in patients.** European Human Genetics Conference (ESHG), 2022
 16. Faidon-Nikolaos Tilemis, **Danai Veltra**, Nikolaos Marinakis, Maria Svingou, Konstantina Kosma, Joanne Traeger-Synodinos, Christalena Sofocleous **Diagnosis of Williams Syndrome by Whole Exome Sequencing (WES)** ESHG Congress 2022, Vienna, Austria
 17. **Veltra D.**, Tilemis F. N., Marinakis M. N., Katsalouli M., Traeger-Synodinos J., Sofocleous C., **Inherited Maternal Duplication at 15q11.2-q13.1: A new case, detected by Whole Exome Sequencing (WES),** European Human Genetics Conference (ESHG), 2022.
 18. Marinakis N., Konstantinidou A., **Veltra D.**, Sofocleous C., Tilemis F. N., Kosma K., Traeger-Synodinos J., **Melnick-Needles syndrome: a male with severe and perinatally lethal phenotype,** European Human Genetics Conference (ESHG), 2022.

ΟΜΙΛΙΕΣ

1. Βελτρά Δ. **Γενετική διερεύνηση επιληπτικών εγκεφαλοπαθειών.** Ομιλία στα πλαίσια του 3^{ου} Πανελληνίου Συμπόσιου στην Κλινική Γενετική και Γονιδιωματική με διεθνή συμμετοχή, Μάϊος 2019.
2. Βελτρά Δ. **Σύγχρονη διαγνωστική προσπέλαση των γενετικών επιληψιών με εφαρμογή NGS.** Ομιλία στα πλαίσια του 3^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου Σπανίων παθήσεων και ορφανών φαρμάκων, Σεπτέμβριος 2022.

ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Μητρική Γλώσσα: Ελληνική

Λοιπές γλώσσες: Αγγλικά (Lower, University of Cambridge) και Γαλλικά (Sorbonne 1er degree).

Εθελοντισμός: Συμμετοχή στην ομάδα «Brain Malformations Gene Curation Expert Panel» της βάσης δεδομένων ClinGen με στόχο την ταυτοποίηση σχέσεων γονοτύπου-φαινοτύπου σε άτομα με δομικές παραλλαγές του εγκεφάλου.

Πρόλογος

Η παρούσα διατριβή αποτελεί μια προσπάθεια με σκοπό την καταγραφή αιτιοπαθογόνων παραλλαγών καθώς και του υποκείμενου μηχανισμού που οδηγεί σε επιληπτογένεση σε ασθενείς με επιληψία με ή χωρίς συνοδή ψυχοκινητική καθυστέρηση. Στα πλαίσια της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές διαγνωστικές προσεγγίσεις που αφορούσαν στοχευμένο έλεγχο γονιδίων ή εφαρμογή αλληλούχησης επόμενης γενιάς. Η εκπόνηση της διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής της Ιατρικής Σχολής Αθηνών στο Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία» υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Παιδιατρικής Νευρολογίας Μαρία-Ροζέ Πονς-Ροντρίγκεθ.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής Νευρολογίας κυρία Μαρία-Ροζέ Πονς-Ροντρίγκεθ για την στήριξη και την καθοδήγησή της κατά την περάτωση της διατριβής. Επιπρόσθετα ιδιαίτερα ευχαριστώ τις Καθηγήτριες Γενετικής κυρίες Ιωάννα - Ραχήλ Συνοδινού Traeger και Μαρία Τζέτη για τις πολύτιμες υποδείξεις τους και την καθοδήγησή τους κατά τη διεξαγωγή της διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Παιδιατρικής Νευρολογίας κύριο Αργύριο Ντινόπουλο, τον Επίκουρο Καθηγητή Παιδιατρικής Νευρολογίας κύριο Γεώργιο Βάρτζελη και τον Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής κύριο Περικλή Μακρυθανάση που απάρτισαν την Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή της παρούσας διατριβής και παρέπεμψαν ασθενείς με επιληψία για γενετική διάγνωση.

Προσωπικές ευχαριστίες οφείλω στην Επίκουρη Καθηγήτρια Γενετικής κυρία Χρισταλένα Σοφοκλέους, που μετείχε στην Επταμελή επιτροπή και στάθηκε δίπλα μου σε κάθε δυσκολία σε προσωπικό και ακαδημαϊκό επίπεδο και μου άνοιξε νέους ορίζοντες σκέψης με την εξέχουσα επιστημονική της κατάρτιση και το διερευνητικό της πνεύμα. Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ Κυριακή Κέκου, Βιολόγο, ΕΔΙΠ, για τις πολύτιμες συμβουλές και τη στήριξή της καθόλη τη διάρκεια της διατριβής.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους εξαίρετους συναδέλφους με τους οποίους είχα την χαρά να συνεργαστώ Ε. Δανιήλ, Σ. Βρέττα, Δρ. Μ. Σβίγγου, Δρ Ν. Μαρινάκη και υπ. Δρ. Φ. Τηλέμη καθώς και όλα τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής για την άριστη συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω επίσης στους ασθενείς και στις οικογένειες τους για την εμπιστοσύνη που μας έδειξαν στη διάγνωση των αγαπημένων τους και στους Νευρολόγους από όλη την Ελλάδα για την άψογη συνεργασία και την παραπομπή των ασθενών. Ευχαριστώ

επίσης τους Κλινικούς Γενετιστές του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής κυρίες Κωνσταντίνα Κοσμά και Ειρήνη Τσούτσου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Σοφία και Νίκο και τον αδελφό μου Άκη για την αμέριστη στήριξη και αγάπη που μου προσφέρουν απλόχερα.

Περίληψη

Εισαγωγή: Οι αναπτυξιακές και επιληπτικές εγκεφαλοπάθειες (ΑΕΕ) αποτελούν μία υποκατηγορία επιληπτικών συνδρόμων με την γενετική βάση να αφορά κυρίως σε γονίδια που κωδικοποιούν για διαύλους, πρωτεΐνες απαραίτητες για την ορθή λειτουργία των συνάψεων, μεταγραφικούς παράγοντες καθώς και για άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες με ρόλο σε βασικές κυτταρικές διεργασίες. Μέχρι σήμερα, καταγράφονται περισσότερες από 100 διαφορετικές ΑΕΕ ενώ σε καθημερινή βάση ανακαλύπτονται και νέα γονίδια που σχετίζονται με αυτήν την κλινική εικόνα. Η γενετική διάγνωση των ΑΕΕ αφορά την ανίχνευση παθογόνων ή πιθανώς παθογόνων παραλλαγών σε ένα (ή περισσότερα) γονίδια και συνιστά μια τεράστια πρόκληση. Η μεγάλη φαινοτυπική ετερογένεια, η αλληλοεπικάλυψη κλινικών χαρακτηριστικών ανάμεσα στα διαφορετικά επιληπτικά σύνδρομα καθώς και ο μεγάλος αριθμός γονιδίων που εμπλέκονται στην επιληπτογένεση δυσχεραίνουν τη διαφορική διάγνωση και καθιστούν την αποκάλυψη της γενετικής βλάβης και του υποκείμενου μηχανισμού απαραίτητα για την τελική διάγνωση. **Σκοπός:** Η παρούσα μελέτη έχει ως σκοπό την μελέτη των υποκείμενων γενετικών μηχανισμών επιληπτογένεσης με στοχευμένη μελέτη παραλλαγών των γονιδίων *MECP2*, *CDKL5*, *FOXG1*, *ARX*, *SCN1A* ή *POLG*, σε ασθενείς με ΑΕΕ ή μέσω αλληλούχησης επόμενης γενιάς (Next generation sequencing, NGS) ασθενών με σπασμούς με ή χωρίς συνοδή ψυχοκινητική καθυστέρηση. Στην ευρύτερη προσέγγιση περιλαμβάνεται και η μελέτη του προτύπου απενεργοποίησης του χρωμοσώματος X σε περιπτώσεις ανίχνευσης παραλλαγών σε φυλοσύνδετα γονίδια σε θήλεα άτομα, η καταγραφή φαινοτυπικής ετερογένειας και η καταχώρηση νέων παραλλαγών σε βάσεις δεδομένων σύμφωνα με την παθογονικότητα τους, η αναζήτηση νέων συσχετίσεων γονοτύπου-φαινοτύπου και η σύγκριση της διαγνωστικής απόδοσης των διαφορετικών τεχνικών. **Υλικά και μέθοδοι:** Μελετήθηκαν 48 ασθενείς με στοχευμένο έλεγχο των γονιδίων *CDKL5* και *FOXG1*, 42 στο γονίδιο *ARX*, 6 στο γονίδιο *POLG*, 122 στο γονίδιο *MECP2* και 270 στο γονίδιο *SCN1A*. Με αλληλούχηση επόμενης γενιάς μελετήθηκαν 107 ασθενείς. **Αποτελέσματα:** Μέσω του NGS ανιχνεύθηκαν παθογόνες ή πιθανώς παραλλαγές σε 64 ασθενείς αναδεικνύοντας ποσοστό συνολικής διαγνωστικής απόδοσης 59,8%, ενώ με τους στοχευμένους ελέγχους διαγνώσθηκε το 9,88% των ασθενών. Στις παραλλαγές περιλαμβάνονται αλλοιώσεις σε νέα γονίδια ή και σε γονίδια που δεν ήταν σαφές ότι εμπλέκονται στην επιληπτογένεση και τα αποτελέσματα συνέβαλαν στον χαρακτηρισμό νέων και την κατανόηση ήδη υπάρχοντων κλινικών οντοτήτων. **Συμπεράσματα:** Η σύγχρονη διαγνωστική προσπέλαση της γενετικής βάσης των επιληπτικών συνδρόμων είναι σαφώς αποτελεσματικότερη με τη χρήση WES σε σχέση με τη μελέτη μεμονομένων ή και ομαδοποιημένων (panel) γονιδίων όπως καταγράφεται και σε διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες. Η ευελιξία της επανάλυσης των δεδομένων του NGS συμβάλει στην τελική διάγνωση των ασθενών λόγω της διαρκούς αποκάλυψης νέων συσχετίσεων γονοτύπου-φαινοτύπου, ενώ η αποκάλυψη μοριακής βλάβης διαφορετικής από την αναμενόμενη υπογραμμίζει την διαρκώς εξελισσόμενη γνώση του γενετικού υποβάθρου που οδηγεί σε επιληπτογένεση.

Abstract

Introduction: Developmental and epileptic encephalopathies (DEEs) are a specific category of epileptic syndromes and are caused due to defects in neuron-expressed genes encoding for either channels, or proteins that have crucial role in the correct function of synapses, or transcription factors (as well as other proteins) with regulatory action in various cellular processes. To date over 100 different DEEs have been described and almost daily new genes are discovered and associated with this clinical entity. Genetic diagnosis of DEEs involves the detection of pathogenic or likely pathogenic variants in a potentially large number of genes, and this constitutes a large challenge. The broad phenotypic heterogeneity, the overlap of clinical features between different epileptic syndromes and the large number of genes involved in epileptogenesis make differential diagnosis difficult, and thus the identification of the specific genetic defect(s) and the underlying mechanism(s) are necessary for a final diagnosis in most patients. **Aim:** The present work aims to study the underlying genetic mechanisms that lead to epileptogenesis in patients with DEE through the targeted screening for variants in previously associated genes (*MECP2*, *CDKL5*, *FOXP1*, *ARX*, *SCN1A* or *POLG*) and, in epilepsy patients with or without accompanying global developmental delay via Next generation sequencing (NGS). The overall study will also include the pattern of X-inactivation in females with variants in X-linked genes, the recording of phenotypic heterogeneity, the submission of novel variants in databases according to their classification, the search for new genotype-phenotype associations and the comparison of the diagnostic yield using different molecular techniques. **Materials and Methods:** 48 patients were studied for variants in *CDKL5* and *FOXP1* genes, 42 in *ARX*, 6 in *POLG*, 122 in *MECP2* and 270 in *SCN1A*. With NGS 107 patients were studied. **Results:** NGS detected pathogenic or likely pathogenic variants in 64 patients leading to a diagnostic yield of 59,8%, in comparison to targeted gene studies that resulted in a diagnostic yield of 9,88%. Amongst the variants observed, there are molecular defects in new genes or in genes not yet clearly involved in epileptogenesis, whereby such results potentially contribute to the elucidation of new, or clearer characterization of existing clinical entities. **Conclusions:** The current diagnostic approach is clearly more efficient with the use of NGS than the targeted screening of a single gene or the use of epilepsy gene panels as recorded by international guidelines when testing for epilepsy syndromes. The ability to re-analyze NGS data contributes to the final diagnosis of the patients due to the continuous discovery of new genotype-phenotype associations; while the discovery of unexpected genetic defects reflects the ever-evolving knowledge of the genetic background underlying epileptogenesis.

Περιεχόμενα

Όρκος του Ιπποκράτη.....	2
Στοιχεία Διδακτορικής διατριβής.....	3-4
Βιογραφικό Σημείωμα.....	5-9
Πρόλογος.....	10-11
Περίληψη.....	12
Abstract.....	13
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή.....	25-117
1.1 Αυτοπεριοριζόμενα επιληπτικά σύνδρομα νεογνικής-βρεφικής ηλικίας.....	38-42
1.1.1. Αυτοπεριοριζόμενη (Οικογενής) Νεογνική Επιληψία (Self-Limited (Familial) Neonatal Epilepsy, SLFNE).....	38
1.1.2 Αυτοπεριοριζόμενη (Οικογενής) Νεογνική-Βρεφική Επιληψία (Self-Limited (Familial) Neonatal-Infantile Epilepsy, SLFNIE).....	39
1.1.3 Αυτοπεριοριζόμενη (Οικογενής) Βρεφική Επιληψία (Self-Limited (Familial) Infantile Epilepsy, SLFIE).....	39-41
1.1.4 Γενετική Επιληψία με πυρετικούς σπασμούς + (Genetic Epilepsy with Febrile Seizures +, GEFS+).....	41-42
1.2 Αναπτυξιακές και Επιληπτικές Εγκεφαλοπάθειες (ΑΕΕ).....	42-75
1.2.1 Πρώιμη-Νεογνική Αναπτυξιακή και Επιληπτική Εγκεφαλοπάθεια (Early-Infantile Developmental and Epileptic Encephalopathy, EIDEE).....	42-50
1.2.1.1 Πρώιμη μυοκλονική εγκεφαλοπάθεια (Early Myoclonic Encephalopathy, EME).....	43-45
1.2.1.2 Πρώιμη βρεφική επιληπτική εγκεφαλοπάθεια (Early infantile epileptic encephalopathy, EIEE).....	45-50
1.2.2 Επιληψία της βρεφικής ηλικίας με μεταναστεύοντες εστιακούς σπασμούς (Epilepsy of Infancy with Migrating Focal Seizures, EIMFS).....	50-51
1.2.3 Σύνδρομο βρεφικών σπασμών (Infantile Spasms Syndrome, ISS).....	51-61
1.2.3.1 Γονίδιο <i>CDKL5</i>	53-55
1.2.3.2 Γονίδιο <i>FOXG1</i>	55-57
1.2.3.3 Γονίδιο <i>PCDH19</i>	58-60
1.2.3.4 Γονίδιο <i>SLC2A1</i>	60-61
1.2.4 Διαυλοπάθειες νατρίου.....	61-67
1.2.4.1. Γονίδιο <i>SCN1A</i>	63-64
1.2.4.2 Γονίδιο <i>SCN2A</i>	64-65

1.2.4.3	Σύνδρομο Dravet.....	65-67
1.2.5	Διαυλοπάθειες καλίου.....	67-73
1.2.5.1	Γονίδιο <i>KCNQ2</i>	68-69
1.2.5.2	Γονίδιο <i>KCNT1</i>	69-72
1.2.5.3	Γονίδιο <i>KCNJ10</i>	72-73
1.2.6	Διαυλοπάθεια χλωρίου.....	73-75
1.3	Νευροαναπτυξιακές και επιληπτικές εγκεφαλοπάθειες της παιδικής ηλικίας.....	75-77
1.3.1	Σύνδρομο Lennox Gastaut (Lennox Gastaut Syndrome, LGS).....	75
1.3.2	Αναπτυξιακή και/ή Επιληπτική Εγκεφαλοπάθεια με συνεχείς εκφορτίσεις αιχμής-κύματος στη διάρκεια του ύπνου (Developmental and/or Epileptic Encephalopathy with Spike-Wave Activation in Sleep, D/EE-SWAS).....	76
1.3.3	Μυοκλονική-Ατονική επιληψία (Myoclonic-Atonic Epilepsy, MAE).....	76-77
1.4	Επιληπτικά σύνδρομα με ποικίλη ηλικία έναρξης.....	77-88
1.4.1	Γενετική Γενικευμένη Επιληψία (Genetic Generalized Epilepsy, GGE).....	77-78
1.4.2	Σύνδρομα Εστιακής Επιληψίας (Focal Epilepsy Syndromes).....	78-79
1.4.2.1	Υπερκινητική επιληψία σχετιζόμενη με τον ύπνο (Sleep-related Hypermotor Epilepsy, SHE).....	79
1.4.2.2	Οικογενής εστιακή επιληψία με ποικίλες εστίες (Familial Focal Epilepsy with Variable Foci, FFEVF).....	80-83
1.4.2.3	Επιληψία με ακουστικά στοιχεία (Epilepsy with Auditory Features, EAF).....	83
1.4.3	Αναπτυξιακές και επιληπτικές εγκεφαλοπάθειες με ποικίλη ηλικία έναρξης.....	83-84
1.4.3.1	Νόσος Lafora.....	84-86
1.4.3.2	Νόσος Unverricht-Lundborg (Unverricht-Lundborg Disease, ULD).....	86-87
1.4.3.3	Νευρωνική κηροειδής λιποφουσκίνωση (Neuronal Ceroid Lipofuscinosis, NCL).....	87-88
1.5	Μιτοχονδριακές αναπτυξιακές και επιληπτικές εγκεφαλοπάθειες.....	88-92
1.5.1	Γονίδιο <i>POLG</i>	88-91
1.5.2	Ανεπάρκεια της αφυδρογόνωσης του πυροσταφυλικού οξέος (PDHD).....	91
1.5.3	Σύνδρομο Leigh.....	91-92
1.6	ΑΕΕ ως σύμπτωμα γενετικών νοσημάτων.....	92-98
1.6.1	Σύνδρομο Angelman (Angelman Syndrome, AS).....	92-93
1.6.2	Σύνδρομο Rett (Rett Syndrome, RS).....	93-95

1.6.3	Σύνδρομο Ευθραύστου X (Fragile X Syndrome, FXS).....	95
1.6.4	Σύνδρομο Pitt-Hopkins.....	96-98
1.7	Άλλες χαρακτηρισμένες ΑΕΕ.....	98-112
1.7.1	Κολλαγονοπάθειες.....	98-100
1.7.2	Σπάνια νευροαναπτυξιακά σύνδρομα που σχετίζονται με εμφάνιση ΑΕΕ.....	100-112
1.7.2.1	Σύνδρομο Poirier-Bienvenue - Γονίδιο <i>CSNK2B</i>	100-101
1.7.2.2	ΑΕΕ τύπου 66 - Γονίδιο <i>PACS2</i>	101-102
1.7.2.3	Σύνδρομο Nicolaidis-Baraitser - Γονίδιο <i>SMARCA2</i>	103-104
1.7.2.4	ΑΕΕ σχετιζόμενη με το γονίδιο <i>ATP6V1B2</i>	104-106
1.7.2.5	Σύνδρομο PURA - Γονίδιο <i>PURA</i>	107-108
1.7.2.6	ΑΕΕ τύπου 54 – Γονίδιο <i>HNRNPU</i>	108-109
1.7.2.7	ΑΕΕ σχετιζόμενη με το γονίδιο <i>SYNGAP1</i>	109-111
1.7.2.8	ΑΕΕ σχετιζόμενη με το γονίδιο <i>AFF3</i>	111-112
1.8	Νευροανοσολογικά Σύνδρομα και ΑΕΕ.....	112-114
1.9	Νευροεκφυλιστικά νοσήματα και ΑΕΕ.....	114
1.10	Ο ρόλος του μωσαϊκισμού στη διάγνωση ασθενών με επιληπτικά σύνδρομα.....	115
1.11	Επιγενετικές αλλοιώσεις και ΑΕΕ.....	115-117
Κεφάλαιο 2: Σκοπός Μελέτης.....		118-120
Κεφάλαιο 3: Υλικό και μέθοδοι.....		121-168
3.1	Υλικό Μελέτης.....	122-130
3.2	Μεθοδολογία.....	131-168
3.2.1	Λήψη βιολογικού υλικού.....	131
3.2.2	Απομόνωση DNA.....	131-133
3.2.3	Στοχευμένη ανάλυση της πρωτοταγούς δομής ενός γονιδίου: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και Αλληλούχηση κατά Sanger.....	133-140
3.2.3.1	Σχεδιασμός εκκινητών για την κωδικοποιούσα περιοχή του εκάστοτε γονιδίου.....	133-134
3.2.3.2	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για τον πολλαπλασιασμό των υπό μελέτη περιοχών.....	134-135
3.2.3.3	Έλεγχος της απόδοσης της PCR με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της.....	135-136
3.2.3.4	Καθαρισμός προϊόντων PCR (PCR clean-up).....	136-137

3.2.3.5 Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του DNA με αντίδραση αλληλούχησης κατά Sanger.....	137-138
3.2.3.6 Καθαρισμός των προϊόντων της αντίδρασης αλληλούχησης.....	138-140
3.2.3.7 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της αντίδρασης αλληλούχησης με in silico προγράμματα.....	140
3.2.4 Μελέτη του αριθμού αντιγράφων του εξονικών περιοχών γονιδίων με τη χρήση πολλαπλής ενίσχυσης υβριδοποιημένων ανιχνευτών με το ένζυμο της λιγάσης (Multiplex Ligation – dependant Probe Amplification, MLPA).....	140-148
3.2.5 Μελέτη προτύπου απενεργοποίησης X χρωμοσώματος (X-inactivation).....	148-151
3.2.6 Μελέτη της διάταξης παραλλαγών σε θήλυ ασθενή με δυο παθογόνες παραλλαγές στο γονίδιο <i>MECP2</i>	151-155
3.2.7 Αλληλούχησης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS).....	155-164
3.2.8. Απομόνωση RNA και σύνθεση cDNA για τη διερεύνηση ευρημάτων από αλληλούχηση επόμενης γενιάς	164-168
Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα	169-203
4.1.1 Αποτελέσματα από την μελέτη του γονιδίου <i>MECP2</i>	170-176
4.1.2 Αποτελέσματα από την αλληλούχηση του γονιδίου <i>MECP2</i> και της διερεύνησης της διάταξης των παραλλαγών για την ασθενή 16.....	177-178
4.1.3 Αποτελέσματα από την μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης σε θήλεα με παραλλαγές του γονιδίου <i>MECP2</i>	178-179
4.2 Αποτελέσματα από την μελέτη των γονιδίων <i>CDKL5</i> , <i>FOXG1</i> , <i>ARX</i> , <i>POLG</i>	180-183
4.3 Αποτελέσματα από την μελέτη του γονιδίου <i>SCN1A</i>	184-193
4.4 Αποτελέσματα από την αλληλούχηση επόμενης γενιάς.....	194-200
4.5 Αποτελέσματα από τη μελέτη RNA για την οικογένεια 21166.....	201-202
4.6 Αποτελέσματα από την μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης σε θήλεα με παραλλαγές σε φυλοσύνδετα γονίδια.....	202-203
Κεφάλαιο 5: Συζήτηση	204-251
5.1 Σχολιασμός παραλλαγών που εντοπίστηκαν με αλληλούχηση κατά Sanger ή MLPA	205-214
5.1.1 Παραλλαγές γονιδίου <i>MECP2</i>	205-208
5.1.2 Παραλλαγές γονιδίου <i>CDKL5</i>	208
5.1.3 Παραλλαγές γονιδίου <i>FOXG1</i>	208-209
5.1.4 Παραλλαγές γονιδίου <i>ARX</i>	210
5.1.5 Παραλλαγή γονιδίου <i>POLG</i>	211

5.1.6 Παραλλαγές γονιδίου <i>SCN1A</i>	211-214
5.2 Σχολιασμός παραλλαγών που ανιχνεύθηκαν μέσω αλληλούχησης επόμενης γενιάς.....	214-243
5.2.1 Διαυλοπάθειες.....	215-218
5.2.2 Συναπτοπάθειες.....	218-223
5.2.3 Εγκεφαλικές αγγειοπάθειες.....	223-225
5.2.4 Φυλοσύνδετη και φυλοπεριοριζόμενη κληρονομηση.....	225-226
5.2.5 Νόσος Lafora.....	226
5.2.6 Σύνδρομο Leigh.....	226-227
5.2.7 Σύνδρομο Poirier-Bienvenu.....	227
5.2.8 Σύνδρομο Pitt-Hopkins.....	227-228
5.2.9 Παραλλαγές σε γονίδια που συσχετίστηκαν πρόσφατα με κλινική εικόνα ΑΕΕ.....	228-229
5.2.10 Παραλλαγές σε γονίδια με επιγενετική-ρυθμιστική δράση.....	229-234
5.2.10.1 Γονίδια που εμπλέκονται σε επιγενετικούς μηχανισμούς.....	229-232
5.2.10.2 Γονίδια που εμπλέκονται σε βασικές κυτταρικές διαδικασίες (μεταγραφή, αντιγραφή, μετάφραση).....	232-234
5.2.11 Παραλλαγές σε γονίδια που επηρεάζουν τη νευρωνική μετανάστευση – Interneurotopathies.....	234-237
5.2.12 Παραλλαγή σε γονίδιο με νευροανοσολογικές εκδηλώσεις.....	237-238
5.2.13 Παραλλαγή γονιδίου <i>TSC1</i>	238
5.2.14 Παραλλαγές σε γονίδια με νευροεκφυλιστική δράση.....	238-240
5.2.15 Νέα συσχέτιση γονοτύπου-φαινοτύπου, γονίδιο <i>CAPRIN1</i>	240-241
5.2.16 Παραλλαγές αβέβαιης κλινικής σημασίας που αποκαλύφθηκαν από αλληλούχηση επόμενης γενιάς.....	241-243
5.3 Συμπεράσματα.....	243-251
5.3.1 Επιλογή κατάλληλης διαγνωστικής προσέγγισης ασθενών με ΑΕΕ: σύγχρονες κατευθυντήριες οδηγίες και συμπεράσματα από την παρούσα μελέτη.....	243-248
5.3.2 Μελλοντικές προοπτικές.....	248-250
5.3.2.1 Εφαρμογή Whole genome sequencing (WGS) στη διάγνωση ασθενών με ΑΕΕ....	248-249
5.3.2.2 Εφαρμογή Optical genome mapping στη διάγνωση ασθενών με ΑΕΕ.....	249-250
5.3.3 Κλινική αντιμετώπιση επιληπτικών συνδρόμων.....	250-251

5.3.3.1 Κετογόνος διαίτα.....	250
5.3.3.2 Χειρουργική της επιληψίας.....	250
5.3.3.3 Πρόγνωση ασθενών με επιληψία.....	250-251
Βιβλιογραφία.....	252-265
Παράρτημα.....	266-280

Ευρετήριο πινάκων

<u>Πίνακας 1:</u> Είδη σπασμών.....	30-31
<u>Πίνακας 2:</u> Φαινοτυπική σύγκριση Πρώιμης Μυοκλονικής Εγκεφαλοπάθειας και Πρώιμης Βρεφικής Επιληπτικής Εγκεφαλοπάθειας.....	50
<u>Πίνακας 3:</u> Φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ ασθενών με διαφορετικών ειδών μοριακές βλάβες του γονιδίου <i>FOXG1</i>	57
<u>Πίνακας 4:</u> Σύνοψη διαγνωστικών κριτηρίων συνδρόμου Lennox Gastaut.....	75
<u>Πίνακας 5:</u> Συχνότερες PMEs και υπεύθυνα γονίδια.....	84
<u>Πίνακας 6:</u> Καθαρισμός προϊόντων PCR με χρήση ενζύμων Exo I και rSAP.....	136
<u>Πίνακας 7:</u> Καθαρισμός προϊόντων PCR με χρήση του κιτ ExS-Pure.....	137
<u>Πίνακας 8:</u> Στοιχειομετρία αντίδρασης αλληλούχησης ανά δείγμα.....	138
<u>Πίνακας 9:</u> Στοιχειομετρία μίγματος υβριδοποίησης.....	142
<u>Πίνακας 10:</u> Στοιχειομετρία μίγματος λιγάσης.....	143
<u>Πίνακας 11:</u> Στοιχειομετρία μίγματος PCR.....	143
<u>Πίνακας 12:</u> Στοιχειομετρία μίγματος για τριχοειδή ηλεκτροφόρηση.....	144
<u>Πίνακας 13:</u> Κριτήρια ACMG για την κατηγοριοποίηση παραλλαγών αριθμού αντιγράφων και περιπτώσεις εφαρμογής τους.....	145-148
<u>Πίνακας 14:</u> Πρωτόκολλο πέψης για τα γονίδια <i>AR</i> και <i>FMR1</i>	150
<u>Πίνακας 15:</u> Πρωτόκολλο πέψης για το γονίδιο <i>PCSK1N</i>	150
<u>Πίνακας 16:</u> Πρωτόκολλο PCR για τα γονίδια <i>AR</i> , <i>PCSK1N</i> και <i>FMR1</i>	151
<u>Πίνακας 17:</u> Πρωτόκολλο PCR για την περιοχή ενδιαφέροντος του γονιδίου <i>MECP2</i>	153
<u>Πίνακας 18:</u> Πρωτόκολλο πέψης για την περιοχή ενδιαφέροντος του γονιδίου <i>MECP2</i>	153
<u>Πίνακας 19:</u> Κριτήρια ACMG για κατηγοριοποίηση παραλλαγών ως παθογόνες και περιπτώσεις εφαρμογής τους.....	160-161
<u>Πίνακας 20:</u> Κριτήρια ACMG για κατηγοριοποίηση παραλλαγών ως ήπιες και περιπτώσεις εφαρμογής τους.....	161-162
<u>Πίνακας 21:</u> Συνδυασμός κριτηρίων για την τελική ταξινόμηση της παραλλαγής.....	162
<u>Πίνακας 22:</u> Πρωτόκολλο RT-PCR για το έλλειμμα του γονιδίου <i>ABAT</i>	168

Πίνακας 23: Αποτελέσματα και κλινικά στοιχεία ασθενών με σημειακές παραλλαγές του γονιδίου <i>MECP2</i>	171-173
Πίνακας 24: Αποτελέσματα και κλινικά στοιχεία ασθενών με παραλλαγές αριθμού αντιγράφων τμήματος ή ολόκληρου του γονιδίου <i>MECP2</i>	174
Πίνακας 25: Αποτελέσματα από μελέτη προτύπου μεθυλίωσης.....	179
Πίνακας 26: Αποτελέσματα και κλινικά στοιχεία ασθενών με παραλλαγές των γονιδίων <i>POLG</i> , <i>CDKL5</i> , <i>FOXG1</i> , <i>ARX</i>	181-182
Πίνακας 27: Αποτελέσματα και κλινικά στοιχεία ασθενών με παραλλαγές του γονιδίου <i>SCN1A</i>	186-189
Πίνακας 28: Αποτελέσματα από εφαρμογή αλληλούχησης επόμενης γενιάς.....	195-200

Ευρετήριο εικόνων

Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση νευρώνα και των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν σε επιληπτογένεση.....	37
Εικόνα 2: Δομή γονιδίου <i>PRRT2</i> και τοπολογία πρωτεΐνης <i>PRRT2</i> στην μεμβράνη.....	40
Εικόνα 3: Δομή γονιδίου <i>ARX</i>	47
Εικόνα 4: Δομή γονιδίου <i>STXBP1</i>	49
Εικόνα 5: Δομικές περιοχές γονιδίου <i>CDKL5</i>	54
Εικόνα 6: Δομή γονιδίου <i>FOXG1</i>	56
Εικόνα 7: Δομή γονιδίου <i>PCDH19</i>	58
Εικόνα 8: Μηχανισμός κυτταρικής παρεμβολής σε άτομα με μοριακή βλάβη του γονιδίου <i>PCDH19</i>	59
Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της δομής διαύλων νατρίου.....	62
Εικόνα 10: Δομή γονιδίου <i>KCNQ2</i>	69
Εικόνα 11: Δομή γονιδίου <i>KCNT1</i>	71
Εικόνα 12: Δομή πρωτεΐνης <i>KCNJ10</i>	72
Εικόνα 13: Δομή πρωτεΐνης <i>CIC-4</i>	74
Εικόνα 14: Τα τρία κυριότερα είδη επιληπτικών εστιακών συνδρόμων με συνοδά στοιχεία για την γενετική αιτιολογία και την τοπολογία της επιληπτικής δραστηριότητας που παρατηρείται στον εγκέφαλο.....	79
Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση μονοπατιού <i>mTOR</i>	81
Εικόνα 16: Δομή πρωτεΐνης <i>DEPDC5</i>	82
Εικόνα 17: Δομικές περιοχές γονιδίων <i>EPM2A</i> και <i>NHLRC1</i>	85
Εικόνα 18: Δομικές περιοχές πρωτεΐνης <i>POLG</i>	89
Εικόνα 19: Διαταραχές συνδεόμενες με μοριακή βλάβη του γονιδίου <i>POLG</i> σύμφωνα με την ηλικία έναρξης συμπτωμάτων και τις βλάβες σε επίπεδο μιτοχονδριακού DNA.....	90
Εικόνα 20: Δομή πρωτεϊνών <i>MeCP2</i>	94
Εικόνα 21: Δομικές περιοχές πρωτεΐνης <i>TCF4</i>	97
Εικόνα 22: Δομή πρωτεϊνών <i>COL4A1</i> και <i>COL4A2</i> καθώς και δομή του ετεροτριμερούς των βασικών μεμβρανών.....	99

Εικόνα 23: Δομικές περιοχές πρωτεΐνης CSNK2B.....	101
Εικόνα 24: Δομικές περιοχές πρωτεΐνης PACS2 και τοπολογία της πιο συχνής παθολογίας παραλλαγής.....	102
Εικόνα 25: Δομή πρωτεΐνης SMARCA2.....	104
Εικόνα 26: Σχηματική απεικόνιση της V-ATPάσης και των συνοδών υπομονάδων της.....	106
Εικόνα 27: Δομή πρωτεΐνης PURA.....	108
Εικόνα 28: Δομικές περιοχές πρωτεΐνης HNRPN1.....	109
Εικόνα 29: Δομικές περιοχές πρωτεϊνών SYNGAP1.....	111
Εικόνα 30: Δομή γονιδίων <i>AFF</i>	112
Εικόνα 31: Δομικές περιοχές πρωτεΐνης IFIH1.....	114
Εικόνα 32: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας απομόνωσης DNA με χρήση συστήματος QIASymphony DNA DSP DNA mini Blood.....	132
Εικόνα 33: Σχηματική απεικόνιση της αρχής της μεθόδου MLPA.....	141
Εικόνα 34: Απεικόνιση των αναμενόμενων αποτελεσμάτων μετά την πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση <i>AluI</i> παρουσία των παραλλαγών σε <i>cis</i> διάταξη.....	152
Εικόνα 35: Σχηματική απεικόνιση της ροής εργασίας για τη διεξαγωγή αλληλούχησης επόμενης γενιάς.....	157
Εικόνα 36: Ροή εργασίας για τη βιοπληροφορική ανάλυση αρχείου .vcf με το πρόγραμμα VarAFT.....	158-159
Εικόνα 37: Ροή εργασίας για τη βιοπληροφορική ανάλυση αρχείου μέσω της πλατφόρμας VarSome Clinical.....	160
Εικόνα 38: Αποτελέσματα από την μελέτη με MLPA στους ασθενείς με μοριακή βλάβη του γονιδίου <i>MECP2</i>	175-176
Εικόνα 39: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης μετά την πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση <i>AluI</i>	177
Εικόνα 40: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης πριν (A) και μετά την πέψη (B).....	178
Εικόνα 41: Εικόνες από τα δεδομένα της αλληλούχησης κατά Sanger ή MLPA σε ασθενείς με μοριακή βλάβη των γονιδίων <i>POLG</i> , <i>CDKL5</i> , <i>FOXP1</i> , <i>ARX</i>	183
Εικόνα 42: Σχηματική απεικόνιση του εντοπισμού των παραλλαγών του γονιδίου <i>SCN1A</i> στο δίαυλο.....	184
Εικόνα 43: Γενεαλογικά δέντρα και εικόνες από τα δεδομένα της αλληλούχησης κατά Sanger σε ασθενείς με μοριακή βλάβη του γονιδίου <i>SCN1A</i>	190-192
Εικόνα 44: Γενεαλογικό δέντρο και εικόνα από τα δεδομένα του MLPA σε ασθενή με μοριακή βλάβη του γονιδίου <i>SCN1A</i>	193
Εικόνα 45: Τύπος, ταξινόμηση και πρότυπο κληρονόμησης των παραλλαγών των ασθενών που διαγνώστηκαν με αλληλούχηση επόμενης γενιάς.....	194
Εικόνα 46: Απεικόνιση των αναμενόμενων αποτελεσμάτων μετά την RT-PCR για τα εξόνια 2-8 του γονιδίου <i>ABAT</i> σε αλληλία με φυσιολογική αλληλουχία ή φέροντα το έλλειμμα των εξονίων 4-6.....	201

Εικόνα 47: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης μετά την εφαρμογή RT-PCR για τα εξόνια 2-8 του γονιδίου <i>ABAT</i> στην ασθενή και τους γονείς της.....	201
Εικόνα 48: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης μετά την RT-PCR για τα εξόνια 2-8 του γονιδίου <i>ABAT</i>	202
Εικόνα 49: Σχηματική απεικόνιση της τοπολογίας των παραλλαγών που ταυτοποιήθηκαν στο γονίδιο <i>MECP2</i> στα πλαίσια της παρούσας μελέτης.....	207
Εικόνα 50: Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου <i>ATP6V1B2</i> και των γνωστών παραλλαγών του.....	223
Εικόνα 51: Σχηματική απεικόνιση της τοπολογίας της παραλλαγής του γονιδίου <i>CAPRIN1</i>	240

Ευρετήριο γραφημάτων

Γράφημα 1: Κατανομή είδους σπασμών ή επιληπτικού συνδρόμου στους ασθενείς που μελετήθηκαν στο γονίδιο <i>MECP2</i>	123
Γράφημα 2: Κατανομή ηλεκτροεγκεφαλογραφικών ευρημάτων των ασθενών που μελετήθηκαν στο γονίδιο <i>MECP2</i>	123
Γράφημα 3: Κατανομή απεικονιστικών ευρημάτων των ασθενών που μελετήθηκαν στο γονίδιο <i>MECP2</i>	124
Γράφημα 4: Κατανομή ηλεκτροεγκεφαλογραφικών ευρημάτων στους ασθενείς που μελετήθηκαν στα γονίδια <i>CDKL5</i> , <i>FOXG1</i> και <i>ARX</i>	125
Γράφημα 5: Κατανομή των απεικονιστικών ευρημάτων των ασθενών που μελετήθηκαν στα γονίδια <i>CDKL5</i> , <i>FOXG1</i> και <i>ARX</i>	125
Γράφημα 6: Κατανομή είδους σπασμών ή επιληπτικού συνδρόμου στους ασθενείς που μελετήθηκαν στο γονίδιο <i>SCN1A</i>	128
Γράφημα 7: Κατανομή των ηλεκτροεγκεφαλογραφικών ευρημάτων των ασθενών που μελετήθηκαν στο γονίδιο <i>SCN1A</i>	128
Γράφημα 8: Κατανομή των απεικονιστικών ευρημάτων των ασθενών που μελετήθηκαν στο γονίδιο <i>SCN1A</i>	129
Γράφημα 9: Μηχανισμοί που οδήγησαν σε επιληπτογένεση στους ασθενείς που διαγνώστηκαν με αλληλούχηση επόμενης γενιάς.....	215
Γράφημα 10: Διαγνωστική απόδοση αλληλούχησης επόμενης γενιάς ανά τύπο επιληπτικού συνδρόμου στα πλαίσια της παρούσας μελέτης.....	246

Πηγή εικόνας εξωφύλλου: Lin, J.-J., et al. (2022) "Developmental and epileptic encephalopathies: Is prognosis related to different epileptic network dysfunctions?" *Epilepsy Behav*, Jun;131(Pt B):107654. doi: 10.1016/j.yebeh.2020.107654.

Συντομογραφίες και απόδοση όρων στα ελληνικά

AEE	Αναπτυξιακές και Επιληπτικές Εγκεφαλοπάθειες
EE	Επιληπτικές Εγκεφαλοπάθειες
HEΓ	Ηλεκτροεγκεφαλογράφημα
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
CAE	Childhood Absence Epilepsy Αφαιρέσεις της παιδικής ηλικίας
cDNA	Complementary DNA Συμπληρωματικό DNA
CES	Clinical Exome Sequencing Αλληλούχηση των εξονικών περιοχών 5.000 γονιδίων με γνωστή κλινική σημασία
CMGs	Chromatin Modifying Genes Γονίδια που συμμετέχουν στην ρύθμιση της χρωματίνης
CNVs	Copy Number Variations Παραλλαγές αριθμού αντιγράφων
De novo	Εκ νέου
DE	Decreased Excitability Μειωμένη διεγερσιμότητα
D/EE-SWAS	Developmental and/or Epileptic Encephalopathy with Spike-Wave Activation in Sleep Αναπτυξιακή και/ή Επιληπτική Εγκεφαλοπάθεια με συνεχείς εκφορτίσεις αιχμής-κύματος στη διάρκεια του ύπνου
DNMTs	DNA methyltransferases DNA μεθυλοτρανσφεράσες
EAF	Epilepsy with Auditory Features Επιληψία με ακουστικά στοιχεία
EIDEE	Early-Infantile Developmental and Epileptic Encephalopathy Πρώιμη βρεφική αναπτυξιακή και επιληπτική εγκεφαλοπάθεια
EIEE	Early Infantile Epileptic Encephalopathy Πρώιμη βρεφική επιληπτική εγκεφαλοπάθεια
EIMFS	Epilepsy of Infancy with Migrating Focal Seizures Επιληψία της βρεφικής ηλικίας με μεταναστεύοντες εστιακούς σπασμούς
EME	Early Myoclonic Encephalopathy Πρώιμη μυοκλονική εγκεφαλοπάθεια
FFEVF	Familial Focal Epilepsy with Variable Foci Οικογενής εστιακή επιληψία με ποικίλες εστίες
G-LOF	Gain-Loss of function Ταυτόχρονη ενίσχυση και απώλεια της λειτουργίας
GABA	Gamma-Aminobutyric Acid γ-αμινοβουτυρικό οξύ
GEFS+	Genetic Epilepsy with Febrile Seizures + Γενετική Επιληψία με πυρετικούς σπασμούς +
GGE	Genetic Generalized Epilepsy Γενετική Γενικευμένη Επιληψία
GOF	Gain Of Function Ενίσχυση της λειτουργίας
GTCA	Generalized Tonic-Clonic Seizures Alone Γενικευμένοι τονικοκλονικοί σπασμοί χωρίς συνοδά ευρήματα
hnRNPs	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins Ετερογενείς πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες
hot spot variant	Συχνή (επανεμφανιζόμενη) παραλλαγή
HUMARA	HUMAn Androgen Receptor Assay
IE	Increased Excitability Αυξημένη Διεγερσιμότητα
ILAE	International League Against Epilepsy
In cis	Στο ίδιο αλλήλιο
In trans	Στα δύο διαφορετικά αλλήλια
ISS	Infantile Spasms Syndrome Σύνδρομο βρεφικών σπασμών
JAE	Juvenile Absence Epilepsy Αφαιρέσεις της εφηβικής ηλικίας

JME	Juvenile Myoclonic Epilepsy Μυοκλονική επιληψία της εφηβικής ηλικίας
LGS	Lennox Gastaut Syndrome Σύνδρομο Lennox Gastaut
LOF	Loss Of Function Απώλεια λειτουργίας
MAE	Myoclonic-Atonic Epilepsy Μυοκλονική-Ατονική επιληψία
Manifesting carrier	Συμπτωματική φορέας
MLPA	Multiplex Ligation – dependant Probe Amplification Πολλαπλή ενίσχυση υβριδοποιημένων ανιχνευτών με το ένζυμο της λιγάσης
NCL	Neuronal Ceroid Lipofuscinosis Νευρωνική κηροειδής λιποφουσκίνωση
NMD	Nonsense Mediated mRNA Decay Αποδόμηση mRNA ως απόρροια παρανοηματικών παραλλαγών
NGS	Next Generation Sequencing Αλληλούχηση επόμενης γενιάς
P5PDEE	Pyridoxamine 5-Phosphate Oxidase Deficiency-DEE ΑΕΕ λόγω ανεπάρκειας οξειδάσης πυριδοξίνης-5-φωσφορικού
PCR	Polymerase Chain Reaction Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PDEE	Pyridoxine Dependent DEE Εξαρτώμενη από πυριδοξίνη ΑΕΕ
PEFS+	Partial Epilepsy with Febrile Seizure plus Εστιακή επιληψία με πυρετικούς σπασμούς +
PKD	Paroxysmal kinesigenic dyskinesia Παροξυσμική κινησιογενής δυσκινησία
pLI	Probability of being Loss-of-function Intolerant Πιθανότητα οι παραλλαγές που οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας του γονιδίου να μην είναι ανεκτές
pLOF	Partial Loss Of Function Μερική απώλεια της λειτουργίας
PME	Progressive Myoclonus Epilepsies Προοδευτικές μυοκλονικές επιληψίες
RBPs	RNA-binding proteins Πρωτεΐνες που προσδέουν RNA
RT	Reverse Transcription Αντίστροφη μεταγραφή
SHE	Sleep related Hypermotor Epilepsy Υπερκινητική επιληψία σχετιζόμενη με τον ύπνο
SLFIE	Self-Limited (Familial) Infantile Epilepsy Αυτοπεριοριζόμενη (Οικογενής) Βρεφική Επιληψία
SLFNE	Self-Limited (Familial) Neonatal Epilepsy Αυτοπεριοριζόμενη (Οικογενής) Νεογνική Επιληψία
SLFNIE	Self-Limited (Familial) Neonatal-Infantile Epilepsy Αυτοπεριοριζόμενη (Οικογενής) Νεογνική-Βρεφική Επιληψία
SMEI	Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy Σοβαρή μυοκλονική επιληψία της βρεφικής ηλικίας
STRs	Short Tandem Repeats Μικρού μεγέθους πολυμορφικές επαναλήψεις / Μικροδορυφορικές αλληλουχίες
SUDEP	Sudden and Unexplained Death in Epilepsy Αιφνίδιος και αναίτιος θάνατος σε άτομο με επιληψία
ULD	Unverricht-Lundborg Disease Νόσος Unverricht-Lundborg
Variant interpretation	Ερμηνεία παραλλαγής
WES	Whole Exome Sequencing Αλληλούχηση των εξονικών περιοχών του γονιδιώματος
X-inactivation	Απενεργοποίηση X χρωμοσώματος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η επιληψία είναι η πιο συχνή νευρολογική διαταραχή και πλήττει άτομα όλων των ηλικιών, οικονομικών τάξεων και γεωγραφικής προέλευσης. Η συχνότητα της στον γενικό πληθυσμό εκτιμάται ότι είναι 61.4 στα 100.000 άτομα [1] ενώ στη νεογνική και παιδική ηλικία έχει συχνότητα ~70 σε 100.000 παιδιά ηλικίας μικρότερης των δύο ετών [2]. Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας σε ποσοστό έως 10% των ατόμων του γενικού πληθυσμού είναι πιθανόν να αναφέρεται μία επιληπτική κρίση -οποιασδήποτε μορφής συμπεριλαμβανομένων των πυρετικών σπασμών ή μετατραυματικών κρίσεων- σε κάποια στιγμή της ζωής τους [3]. Η εμφάνιση επεισοδίων σπασμών δεν είναι πάντα ταυτόσημη με την ύπαρξη επιληψίας. Η επιληψία ως νόσος χαρακτηρίζεται από σπασμούς, όμως η εμφάνιση των σπασμών δεν είναι πάντα συνδεδεμένη με επιληψία καθώς μπορεί να σχετίζεται και με πρόσθετους εκλυτικούς παράγοντες όπως λοίμωξη, τοξικότητα, δομικές παραλλαγές εγκεφάλου ή μεταβολικές διαταραχές που όταν σταματήσουν να υφίστανται τότε σταματούν και οι σπασμοί. Γενετικοί παράγοντες, είτε με τη μορφή μονογονιδιακών βλαβών είτε στο πλαίσιο πολυπαραγοντικού νοσήματος, θεωρείται ότι ευθύνονται για το 70-80% των επιληψιών [4].

Ο αρχικός ορισμός της επιληψίας σύμφωνα με τον H. Jackson αναφέρει ότι η επιληπτική κρίση αντιστοιχεί στη γένεση μιας αιφνίδιας, υπέρμετρης και γρήγορης εκφόρτισης σε ένα πληθυσμό νευρώνων εντοπισμένο στη φαιά ουσία του εγκεφάλου [5]. Βάσει των κλινικών ευρημάτων ο ILAE (International League Against Epilepsy) ορίζει ως επιληψία οποιαδήποτε από τις κάτωθι καταστάσεις [6]:

- τουλάχιστον 2 επεισόδια σπασμών που συμβαίνουν με >24 ώρες διαφορά χωρίς εμφανή εκλυτικό παράγοντα
- ένα επεισόδιο σπασμών και την πιθανότητα επανεμφάνισης σπασμών (τουλάχιστον 60%) μετά από 2 επεισόδια σπασμών εντός δεκαετίας
- διάγνωση επιληπτικού συνδρόμου το οποίο αναφέρεται σε μια σειρά χαρακτηριστικών όπως η ηλικία έναρξης, το είδος των σπασμών, τα ηλεκτροεγκεφαλογραφικά ευρήματα, οι πιθανές συννοσηρότητες καθώς και απεικονιστικά ευρήματα τα οποία τείνουν να εμφανίζονται ταυτόχρονα [7].

Περαιτέρω ταξινόμηση της επιληψίας μπορεί να πραγματοποιηθεί σε τρία επίπεδα ανάλογα με [7]:

I. το είδος των σπασμών σε εστιακής έναρξης, γενικευμένης έναρξης και αγνώστου έναρξης.

II. το είδος της επιληψίας σε εστιακή επιληψία, γενικευμένη επιληψία, συνδυασμό γενικευμένης και εστιακής επιληψίας και αγνώστου είδους.

Στην **εστιακή** επιληψία παρατηρούνται επεισόδια επιληψίας με μία ή πολλαπλές εστίες και εστιακούς σπασμούς με ή χωρίς απώλεια συνειδήσεως, με ή χωρίς κινητικές εκδηλώσεις καθώς και αμφοτερόπλευροι εστιακοί τονικοκλονικοί σπασμοί και ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (ΗΕΓ) με εστιακές επιληπτόμορφες εκφορτίσεις.

Στη **γενικευμένη** επιληψία παρατηρούνται πολλαπλά είδη κρίσεων όπως απώλεια συνειδήσεως, μυοκλονίες, ατονικές, τονικές ή τονικοκλονικές κρίσεις. Το ΗΕΓ εμφανίζει γενικευμένη δραστηριότητα αιχμής-κύματος. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν και οι παλαιότερα γνωστές ως ιδιοπαθείς γενικευμένες επιληψίες και πλέον γνωστές ως γενετικές γενικευμένες επιληψίες.

Στην **γενικευμένη και εστιακή** επιληψία οι ασθενείς εμφανίζουν τόσο γενικευμένους όσο και εστιακούς σπασμούς και τα ευρήματα στο ΗΕΓ είναι γενικευμένη δραστηριότητα αιχμής-κύματος και εστιακές επιληπτικές εκφορτίσεις. Παραδείγματα νοσημάτων που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία είναι το σύνδρομο Dravet και το σύνδρομο Lennox-Gastaut.

Ως **αγνώστου αιτιολογίας** επιληψία ταξινομούνται περιπτώσεις με κλινική διάγνωση επιληψίας η οποία δεν μπορεί να ταξινομηθεί σε μία από τις παραπάνω κατηγορίες είτε λόγω ελλιπούς ιστορικού, είτε λόγω μη πρόσβασης σε περαιτέρω ηλεκτροφυσιολογικό έλεγχο, είτε λόγω μη πληροφοριακού ΗΕΓ.

III. το είδος του επιληπτικού συνδρόμου το οποίο αναφέρεται σε ένα σύνολο χαρακτηριστικών, που συχνά παρατηρούνται μαζί, όπως, το είδος των σπασμών, τα ευρήματα σε ΗΕΓ και απεικονιστικό έλεγχο εγκεφάλου, την ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων, την πρόγνωση και τις πιθανές συννοσηρότητες.

Η αιτιολογία της επιληψίας είναι άγνωστη για το 50% των ανθρώπων που νοσοούν. Ένας αδρός διαχωρισμός που πραγματοποιείται κλινικό-εργαστηριακά την

κατατάσσει, κυρίως βάσει του εκλυτικού παράγοντα που αποκαλύπτεται ανά περίπτωση σε έξι υποκατηγορίες:

1. **δομική**: περιλαμβάνει επίκτητες βλάβες λόγω εγκεφαλικού ισχαιμικού ή υποξαιμικού επεισοδίου, τραύματος κεφαλής ή λοίμωξης. Παράλληλα μπορεί να εμπεριέχει γενετικά νοσήματα στα οποία οι ασθενείς εμφανίζουν δυσπλασίες του εγκεφαλικού φλοιού.
2. **γενετική**: αφορά την επιβεβαιωμένη παρουσία ενός γενετικού συνδρόμου με κύριο κλινικό σύμπτωμα την εμφάνιση σπασμών.
3. **λοιμώδης**: εμφανίζεται κατόπιν λοίμωξης από κάποιο παθογόνο μικροοργανισμό.
4. **μεταβολική**: οφείλεται σε συγγενείς μεταβολικές ανωμαλίες (inborn errors of metabolism) συχνά συνδεδεμένες με παθογόνες παραλλαγές γονιδίων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό οργανικών οξέων, αμινοξέων, βιταμινών, διαταραχές του κύκλου της ουρίας, φαινυλκετονουρία κ.α.
5. **ανοσολογική**: ως απόρροια αυτοάνοσης φλεγμονής του κεντρικού νευρικού συστήματος.
6. **άγνωστη**: περιλαμβάνει όλες τις περιπτώσεις που δεν ταξινομούνται στις ανωτέρω κατηγορίες.

Είδη σπασμών

Η ταξινόμηση των ειδών των σπασμών σύμφωνα με τον ILAE συνοψίζεται στον Πίνακα

1. Για τον χαρακτηρισμό του είδους των σπασμών αξιολογούνται:

- η έναρξη των σπασμών σε εστιακή, γενικευμένη ή άγνωστης αιτιολογίας,
- το επίπεδο συνειδήσεως του ατόμου κατά τη διάρκεια του επεισοδίου των σπασμών,
- οι κινήσεις του ατόμου κατά τη διάρκεια του επεισοδίου των σπασμών σε κινητικής έναρξης ή μη κινητικής έναρξης.

Σπασμοί με γενικευμένη έναρξη οι σπασμοί επηρεάζουν και τις δύο πλευρές του εγκεφάλου ή κύτταρα και των δύο εγκεφαλικών ημισφαιρίων ταυτόχρονα. Όταν οι γενικευμένοι σπασμοί έχουν και κινητική συμπτωματολογία αυτή είναι κλονική, ή ατονική, ή τονική, ή μυοκλονική, ή επιληπτική. Όταν δεν έχουν κινητική

συμπτωματολογία συνήθως αναφέρονται ως επεισόδια αφαιρέσεων τα οποία μπορούν να συνοδεύονται και από μυοκλονίες.

Σπασμοί με εστιακή έναρξη οι σπασμοί ξεκινούν σε μία περιοχή ή σε ομάδες κυττάρων στο ένα εγκεφαλικό ημισφαίριο [8] ή σε υποφλοιώδεις περιοχές του εγκεφάλου [9]. Η κινητική συμπτωματολογία μπορεί να είναι κλονική, ατονική, τονική, μυοκλονική, επιληπτική ενώ παράλληλα μπορεί να συνυπάρχουν αυτοματισμοί όπως άνοιγμα-κλείσιμο οφθαλμών ή επαναλαμβανόμενες κινήσεις όπως τρίψιμο χεριών. Απουσία κινητικής συμπτωματολογίας, συνήθως αναφέρονται ως επεισόδια με διαταραχές αισθητηριακές, συναισθηματικές, συνειδήσεως και γνωσιακές. Επιπρόσθετα μπορούν να παρατηρηθούν σπασμοί εστιακής έναρξης που ξεκινούν στο ένα ημισφαίριο και εξαπλώνονται και στο άλλο οι οποίοι παλαιότερα χαρακτηρίζονταν ως δευτεροπαθής γενικευμένη κρίση και μετονομάστηκαν σε εστιακής έναρξης αμφοτερόπλευροι τονικοκλονικοί σπασμοί [9]. Το συχνότερο είδος σπασμών είναι εστιακοί σπασμοί με διαταραχές του επιπέδου συνειδήσεως σε ποσοστό 36% [1].

Σπασμοί με άγνωστη έναρξη σε αυτήν την κατηγορία δεν είναι γνωστή η χρονική στιγμή έναρξης των σπασμών κυρίως επειδή ο ασθενής ήταν μόνος και δεν υπήρχε κάποιο άτομο που να κατέγραψε το επεισόδιο κατά την έναρξη. Σπασμοί αγνώστου έναρξης με κινητική συμμετοχή είναι τονικοκλονικοί ή επιληπτικοί σπασμοί, ενώ χωρίς κινητική συμμετοχή συνήθως αφορούν σπασμούς όπου το άτομο εστιάζει σε ένα σημείο και δεν πραγματοποιεί άλλες κινήσεις.

Status epilepticus - επιληπτική κατάσταση: ορίζεται ως δύο ή περισσότερες επιληπτικές κρίσεις χωρίς ανάκτηση του επιπέδου συνειδήσεως στο ενδιάμεσο ή ως επιληπτική κρίση διάρκειας άνω των 30 λεπτών αν και στην κλινική πράξη έχει ορισθεί ως επεισόδιο σπασμών διάρκειας άνω των 5 λεπτών ή δύο ή περισσότερες επιληπτικές κρίσεις χωρίς ανάκτηση του επιπέδου συνειδήσεως μεταξύ τους [10]. Θεωρείται ότι προκαλείται είτε λόγω δυσλειτουργίας των μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για τον τερματισμό των κρίσεων, είτε λόγω έναρξης κάποιου μηχανισμού ο οποίος οδηγεί σε παρατεταμένη εμφάνιση κρίσεων. Ως κλινική οντότητα μπορεί να έχει μακροχρόνιες επιπτώσεις στην ζωή του ασθενούς, ειδικά όσον αφορά επεισόδια

με διάρκεια άνω των 30 λεπτών, οι οποίες προκύπτουν από νευρωνικό θάνατο καθώς και διαταραχές στο νευρωνικό δίκτυο. Στα παιδιά συχνότερες αιτιολογίες εμφάνισης επιληπτικής κατάστασης είναι οι λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος και οι εμπύρετες καταστάσεις. Άλλα αίτια μπορούν να είναι οι διαταραχές των ηλεκτρολυτών, η δηλητηρίαση από τοξικούς παράγοντες, η ύπαρξη μεταβολικής διαταραχής όπως η φαινυλκετονουρία ή άλλα γενετικά νοσήματα [11].

Πίνακας 1: Είδη σπασμών. Αναπροσαρμογή από Fisher R. S. et al. (2017), "Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types", *Epilepsia*, Apr;58(4):531-542.

Είδος σπασμών	Ορισμός (ILAE, 2017)
Τυπικό επεισόδιο απώλειας συνειδήσεως	Αιφνίδια έναρξη με διακοπή των δραστηριοτήτων του ατόμου και χωρίς ικανότητα επικοινωνίας. Διάρκεια: λίγα δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό. HEG, κατά τη διάρκεια της κρίσης, με επιληπτικές εκφορτίσεις.
Άτυπο επεισόδιο απώλειας συνειδήσεως	Εμφανής διαφορά στον τόνο ή μη απότομη έναρξη/παύση κρίσης. HEG με γενικευμένα συμπλέγματα αιχμής-κύματος.
Ατονικοί	Αιφνίδια απώλεια ή μείωση μυϊκού τόνου χωρίς να προηγούνται εμφανώς μυοκλονικά ή τονικά φαινόμενα. Διάρκεια:1-2 δευτερόλεπτα. Μπορεί να περιλαμβάνουν την κεφαλή, τη σιαγόνα, τον κορμό ή τα άκρα.
Αυτοματισμοί	Συντονισμένη κινητική δραστηριότητα, με μειωμένο επίπεδο συνειδήσεως και με τον ασθενή να μην έχει μνήμη του συμβάντος.
Αυτόνομοι	Διαταραχές του αυτόνομου νευρικού συστήματος που αφορούν τις κόρες των οφθαλμών, το καρδιαγγειακό, το γαστρεντερικό, την ομοίωση (της θερμοκρασίας) και το αγγειοκινητικό.
Κλονικοί	Συμμετρικές ή ασύμμετρες επαναλαμβανόμενες κινήσεις που αφορούν τις ίδιες μυϊκές ομάδες.
Γνωσιακοί	Αφορούν την σκέψη και άλλες λειτουργίες του εγκεφαλικού φλοιού.
Δυστονικοί	Συγκάψεις αγωνιστικών και ανταγωνιστικών μυών που οδηγούν σε αθροιστικές ή συστροφικές κινήσεις και τελικά σε μη

	φυσιολογική στάση σώματος.
Επιληπτικοί	Αιφνίδια κάμψη ή έκταση ή συνδυασμός αυτών σε κορμικούς και εγγύς μύες με διάρκεια μεγαλύτερη από μυοκλονικές κινήσεις και μικρότερη από τονικούς σπασμούς.
Βλεφαροκλονίες	Τουλάχιστον 3 επεισόδια ανοίγματος – κλεισίματος βλεφάρων εντός ενός δευτερολέπτου με συνοδή στροφή βλέμματος προς τα επάνω η οποία διαρκεί για λιγότερο από 10 δευτερόλεπτα και επηρεάζεται από το κλείσιμο των οφθαλμών. Ταυτόχρονα μπορεί να συνυπάρχει απώλεια συνειδήσεως.
Γελαστικοί	Απρόσφορες εκρήξεις γέλιου.
Γενικευμένοι τονικοκλονικοί	Αμφοτερόπλευρες συμμετρικές ή ασύμμετρες τονικές μυϊκές συστολές και μετά αμφοτερόπλευρες κλονικές μυϊκές συστολές οι οποίες συχνά συνοδεύονται από διαταραχές του αυτόνομου νευρικού συστήματος καθώς και από απώλεια επιπέδου συνειδήσεως.
Τζακσόνιος	Διασπορά κλονικών κινήσεων από μία ομάδα μυών και επεκτείνονται συστηματικά σε γειτονικές στην μία πλευρά του σώματος.
Κινητικοί	Αφορούν το μυϊκό σύστημα και μπορεί να περιλαμβάνουν αύξηση ή μείωση της μυϊκής συστολής για την παραγωγή κίνησης.
Μυοκλονικοί	Αιφνίδιες, σύντομες και ακούσιες μυϊκές συστολές μυϊκών ομάδων ποικίλης τοπολογίας.
Μυοκλονικοί-ατονικοί	Γενικευμένοι σπασμοί με μυοκλονικές κινήσεις που οδηγούν σε ατονικές κινητικές καταστάσεις.
Μυοκλονικοί τονικοκλονικοί	Μία ή πολλαπλές κινήσεις άκρων άμφω, ακολουθούμενες από τονικοκλονικούς σπασμούς. Οι αρχικές κινήσεις μπορεί να χαρακτηρίζονται ως κλόνος ή μυόκλονος. Αποτελούν συχνό είδος στην κλινική οντότητα της εφηβικής μυοκλονικής επιληψίας.
Μη κινητικοί	Εστιακοί ή γενικευμένοι σπασμοί στους οποίους δεν είναι εμφανής η κινητική δραστηριότητα.
Τονικοί	Παρατεταμένη αύξηση της μυϊκής συστολής. Διάρκεια από μερικά δευτερόλεπτα έως λεπτά.
Τονικοκλονικοί	Τονικοί σπασμοί που ακολουθούνται από κλονική φάση.

Το ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (ΗΕΓ) καταγράφει την δραστηριότητα του εγκεφάλου και έχει μεγάλη διαγνωστική αξία στην επιληψία. Οι κυματομορφές του είναι το άθροισμα των διεγερτικών και ανασταλτικών μετασυναπτικών δυναμικών που παράγονται από τα πυραμιδικά κύτταρα του εγκεφαλικού φλοιού. Τα μετασυναπτικά δυναμικά παράγονται από την ροή ιόντων κατά μήκος των μεμβρανών των μετασυναπτικών κυττάρων και διαχωρίζονται σε διεγερτικά και ανασταλτικά ανάλογα με τον τύπο ιοντικού διαύλου που ενεργοποιείται [12]. Για την ερμηνεία του ΗΕΓ αξιολογούνται η συχνότητα των κυμάτων (σε Hz), δηλαδή το δυναμικό τους, το ύψος της κυματομορφής και η συμμετρία.

Τα ευρήματα που απαντώνται συχνότερα σε ΗΕΓ με επιληπτόμορφες εκφορτίσεις είναι οι αιχμές και τα αιχμηρά κύματα. Οι αιχμές έχουν διάρκεια 20-70msec ενώ τα αιχμηρά κύματα 70-200msec. Άλλες μορφές που παρατηρούνται είναι αιχμές ή αιχμηρά κύματα τα οποία ακολουθούνται από βραδέα κύματα και χαρακτηρίζονται ως συμπλέγματα αιχμής-κύματος, οι πολυαιχμές με επαναλαμβανόμενες αιχμές στα 20 Hz και η υφαρρυθμία με διαρκή γενικευμένη επιβράδυνση και πολυεστιακές αιχμές στις υψηλές συχνότητες >200 Hz [12]. Κατά την **τονική φάση** των σπασμών συνήθως παρατηρούνται γρήγορης υψηλής συχνότητας αιχμές ενώ κατά την **κλονική φάση** ρυθμικά συμπλέγματα αιχμής-κύματος. Στις **μυοκλονίες** ανευρίσκονται πολυαιχμές με διάρκεια <1sec οι οποίες ακολουθούνται από βραδέα κύματα τα οποία μπορούν να είναι ρυθμικά ή μη. Στις **ατονικές κρίσεις** παρατηρούνται κυματοειδείς μορφές με ενδιάμεσα σημεία επιπέδωσης ή πολυαιχμές. Στους **γενικευμένους τονικοκλονικούς** σπασμούς εμφανίζεται γενικευμένη δραστηριότητα αιχμής – κύματος και στις **αφαιρέσεις** γενικευμένες εκφορτίσεις αιχμής κύματος στις τυπικές στα 3 Hz και στις άτυπες <2,5 Hz.

Επιληπτικές εκφορτίσεις ανευρίσκονται περίπου στο 2% του γενικού πληθυσμού και στο 50% των ατόμων με ιστορικό επιληψίας και χρησιμοποιούνται ως διαγνωστικό εργαλείο στην κλινική πράξη για τον καθορισμό της επιληψίας ως αιτιολογία για επεισόδια που δεν μπορούν να ταξινομηθούν από μόνα τους ως επιληπτικά. Ωστόσο ένα φυσιολογικό ΗΕΓ σε ένα άτομο με κλινική διάγνωση επιληψίας δεν απορρίπτει τη διάγνωση της επιληψίας [12].

Οι επιληπτικές εγκεφαλοπάθειες (ΕΕ) αρχικά ορίστηκαν ως σοβαρές διαταραχές της πρώιμης παιδικής ηλικίας που εκδηλώνονται με πολυμορφικές και δυσεπίλυτες επιληπτικές κρίσεις οι οποίες οδηγούν σε γνωσιακές, νευρολογικές και διαταραχές συμπεριφοράς [13]. Το 2017, μετονομάστηκαν από τον ILAE σε **Αναπτυξιακές και Επιληπτικές Εγκεφαλοπάθειες - ΑΕΕ (Developmental and Epileptic Encephalopathies - DEEs)** ώστε να συμπεριλαμβάνονται τόσο η αναπτυξιακή εγκεφαλοπάθεια χωρίς συχνή επιληπτική δραστηριότητα, η οποία να σχετίζεται με αναπτυξιακή παλινδρόμηση, όσο και η επιληπτική εγκεφαλοπάθεια χωρίς προϊούσα αναπτυξιακή υστέρηση. Η νέα ταξινόμηση έχει σκοπό την αναγνώριση - αξιολόγηση της συμβολής και των δύο αυτών παραγόντων στην κλινική εικόνα καθώς δεν είναι πάντα ξεκάθαρο ποιος έχει σημαντικότερο ρόλο στην ανάπτυξη της συμπτωματολογίας [7]. Η συχνότητα των ΑΕΕ εκτιμάται σε 1 στις 2.000 γεννήσεις ετησίως [3].

Η **αναπτυξιακή εγκεφαλοπάθεια** είναι ένας όρος που διαφοροποιείται από την αναπτυξιακή και επιληπτική εγκεφαλοπάθεια για να περιλαμβάνει ασθενείς με νευροαναπτυξιακή καθυστέρηση η οποία μπορεί να γίνεται πιο εμφανής όσο μεγαλώνει ο ασθενής. Σε αυτήν την κλινική οντότητα ο κίνδυνος εμφάνισης σπασμών είναι αυξημένος σε σχέση με το γενικό πληθυσμό ωστόσο δεν θεωρείται ότι ως πάσχουν από επιληπτική εγκεφαλοπάθεια. Ο διαχωρισμός αυτός στοχεύει στην πιο συντηρητική θεραπευτική αγωγή των σπασμών για αυτήν την ομάδα ασθενών [14].

Σύνοψη γενετικής βάσης επιληπτικών συνδρόμων

Η γενετική βάση των επιληπτικών συνδρόμων εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια. Εκ νέου (*de novo*) παραλλαγές σε γονίδια που διαταράσσουν την εύρυθμη λειτουργία του νευρώνα καθώς και γνωστά νευροαναπτυξιακά σύνδρομα παρατηρούνται συχνότερα στους ασθενείς. Σπανιότερα εντοπίζονται χρωμοσωμικές ανωμαλίες, εγγενείς βλάβες του μεταβολισμού και παθήσεις των μιτοχονδρίων.

Η λειτουργία του νευρώνα μπορεί να διαταραχθεί σε διαφορετικά στάδια (Εικόνα 1) που περιλαμβάνουν:

- ⇒ **Διαταραχή μεταγραφικών ρυθμίσεων:** αποδίδεται κυρίως σε νοσήματα που επηρεάζουν την ανάπτυξη, την μετανάστευση και τη λειτουργία GABA-νεργικών

διάμεσων νευρώνων και συνοψίζονται με τον όρο «**Interneuronopathies**» όπως αυτός προτάθηκε από τους Kato και Dobyns το 2005 [15, 16]. Απώλεια ή διαταραχή της μεταναστευτικής ικανότητας των διάμεσων νευρώνων οδηγεί σε διαταραχή του ανασταλτικού ελέγχου στον εγκέφαλο και στην έλλειψη της νευροτροπικής δράσης των μορίων GABA.

Οι GABA-νεργικοί νευρώνες αποτελούν το 10-25% του συνόλου των νευρώνων, είναι οι κυριότεροι ανασταλτικοί νευροδιαβιβαστές στο κεντρικό νευρικό σύστημα και έχουν εξέχοντα ρόλο στον έλεγχο του νευρωνικού δικτύου καθότι αλληλεπιδρούν με πολλαπλούς νευρωνικούς τύπους κυττάρων [17]. Η λειτουργία τους συνοψίζεται ως εξής: όταν το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) προσδένεται στους GABA_A υποδοχείς ώριμων νευρώνων πραγματοποιείται εισροή ιόντων χλωρίου και παρατηρείται υπερπόλωση της μεμβράνης των νευρωνικών κυττάρων και αναστολή των δυναμικών δράσης. Στους ανώριμους νευρώνες μετά την σύνδεση GABA – GABA_A παρατηρείται εκροή ιόντων χλωρίου και αποπόλωση της μεμβράνης αυξάνοντας την πιθανότητα πυροδότησης δυναμικού δράσης. Η βαθμίδωση της συγκέντρωσης των ιόντων χλωρίου μπορεί να αναστραφεί με τη δράση των γονιδίων *SLC12A2* και *SLC12A5*. Το γονίδιο *NKCC1* κωδικοποιεί το συμμεταφορέα νατρίου-καλίου-χλωρίου τύπου 1 με ρόλο την εισροή ιόντων χλωρίου ενώ το γονίδιο *SLC12A5* κωδικοποιεί για το συμμεταφορέα καλίου-χλωρίου τύπου 2 με ρόλο την εκροή ιόντων χλωρίου. Στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα παρατηρείται αυξημένη έκφραση *SLC12A2* σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης *SLC12A5* τα οποία μεγιστοποιούνται στο τέλος της ενδομήτριας ζωής [18]. Άλλα γονίδια παραλλαγές των οποίων οδηγούν σε αυτήν την κατηγορία νοσημάτων είναι τα: *ARX*, *CDKL5* και *TBC1D24*.

⇒ **Διαταραχές στη νευρωνική διεγερσιμότητα:** οφείλονται σε διαυλοπάθειες. Οι δίαυλοι είναι πρωτεΐνες που βρίσκονται στην λιπιδική διπλοστοιβάδα των κυτταρικών μεμβρανών και σχηματίζουν πόρους ώστε να ελέγχουν την εισροή και εκροή ιόντων ανάλογα με την ηλεκτροχημική τους βαθμίδωση [19].

Οι δίαυλοι ελέγχουν το δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης και η δυσλειτουργία τους μπορεί να οδηγήσει σε εμμένουσα και επαναλαμβανόμενη μεμβρανική διεγερσιμότητα η οποία αποδίδεται ηλεκτροεγκεφαλογραφικά, με την εμφάνιση γενικευμένων συμπλεγμάτων αιχμής κύματος στο ΗΕΓ, στη διάρκεια των επεισοδίων σπασμών [15]. Ο κάθε δίαυλος είναι εκλεκτικός και διαπερατός για συγκεκριμένα

ιόντα. Οι διάυλοι υφίστανται σε τρεις καταστάσεις ανοιχτοί, κλειστοί-μη ενεργοποιημένοι και κλειστοί σε ηρεμία. Το άνοιγμα των διαύλων καθορίζεται από το διαμεμβρανικό δυναμικό στους τασεο-ελεγχόμενους διαύλους, και την πρόσδεση άλλων μορίων-συνδετών στους προσδετο-εξαρτώμενους διαύλους ενώ συμμετέχουν και άλλοι μηχανισμοί όπως δεύτερα μηνύματα, θερμοκρασία, φωτεινότητα και μηχανική διέγερση. Τα πλέον συχνότερα γονίδια που κωδικοποιούν για διαύλους και παραλλαγές τους έχουν συσχετισθεί με εμφάνιση σπασμών είναι τα: *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN8A*, *KCNQ2*, *KCNQ3* και *KCNT1*.

⇒ **Διαταραχές στη συναπτική μεταβίβαση:** σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι συναπτοπάθειες, νοσήματα που επηρεάζουν την πρόσδεση ή την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών μέσω των συναπτικών κυστιδίων [15].

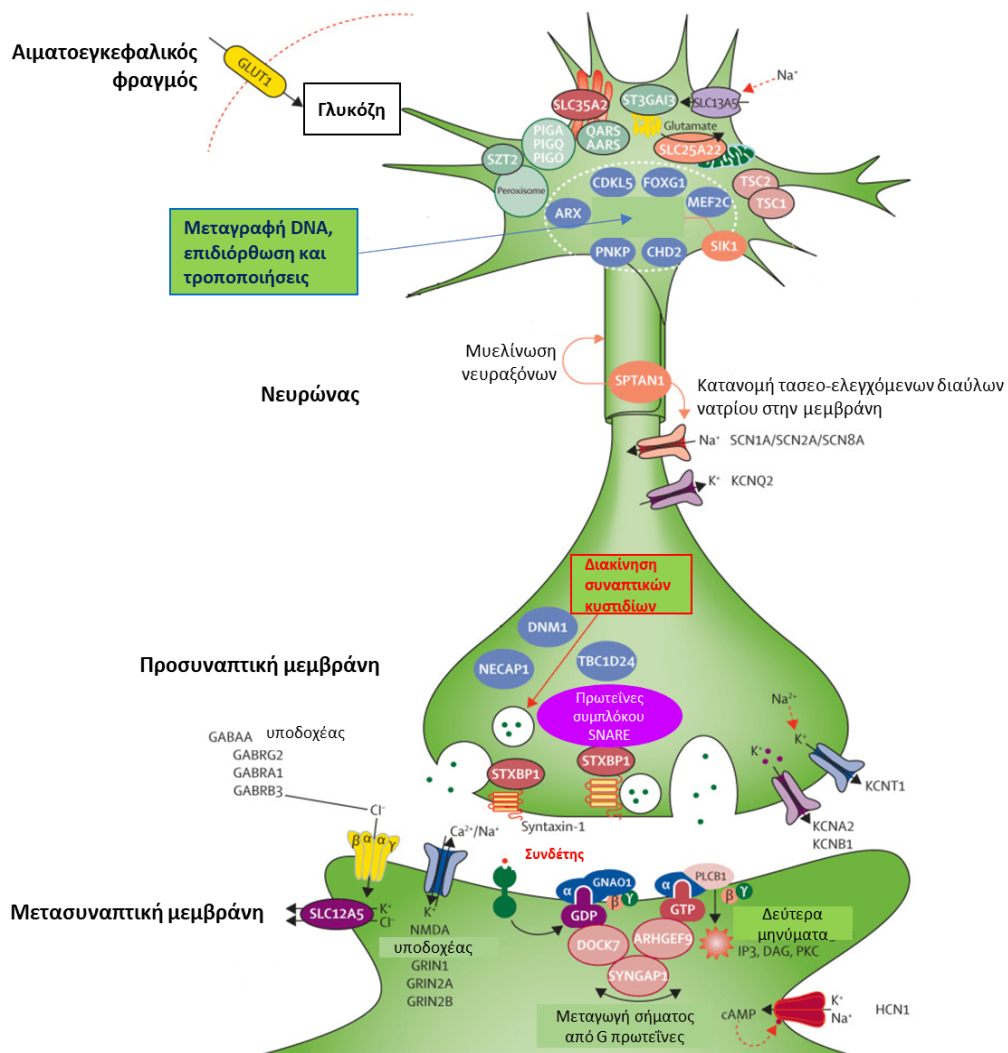
Η απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών πραγματοποιείται ως απόκριση των προσυναπτικών κυττάρων σε δυναμικά δράσης και είναι απαραίτητη για την ορθή λειτουργία του εγκεφάλου [20]. Τα συναπτικά κυστίδια γεμίζουν νευροδιαβιβαστές μέσω της δράσης ΑΤΡασών τύπου V οι οποίες δημιουργούν ηλεκτροχημική βαθμίδωση με εισροή πρωτονίων στο εσωτερικό των κυστιδίων και μεταφορέων νευροδιαβιβαστών. Έπειτα τα γεμάτα πλέον συναπτικά κυστίδια συνδέονται σε ένα πυκνό δίκτυο πρωτεϊνών στην ενεργή ζώνη (active zone) της νευρικής απόληξης. Με μία αντίδραση σύντηξης (fusion) το συναπτικό κυστίδιο εναποτίθεται στην προσυναπτική πλασματική μεμβράνη. Ακολουθεί ενδοκύττωση με διάφορους μηχανισμούς όπου ο καθένας διεγείρεται από διαφορετικά μοτίβα νευρωνικής δραστηριότητας. Τελικά στη νευρική απόληξη απαντώνται δύο τύποι συναπτικών κυστιδίων ο τύπος «resting» («ανάπαυσης») που είναι ανθεκτικός στη διέγερση από δυναμικά δράσης και ο τύπος «recycling» («ανακύκλωσης») ο οποίος είναι προσβάσιμος κατά τη διάρκεια της νευρωνικής διεγερσιμότητας.

Ο τύπος «recycling» εμπεριέχει δύο υποκατηγορίες τα readily releasable (RRP) συναπτικά κυστίδια που μπορούν εύκολα να απελευθερωθούν καθώς είναι αγκυροβολημένα και έτοιμα στην ενεργή ζώνη και τα reserved τα οποία είναι ακινητοποιημένα σε περιόδους έντονης νευρωνικής δραστηριότητας [20]. Αναλυτικότερα η διαδικασία της σύντηξης γίνεται με τη βοήθεια του συμπλόκου SNARE και των πρωτεϊνών VAMP2, STXBP1 και SNAP25. Η πρώτη εντοπίζεται στην μεμβράνη του συναπτικού κυστιδίου ενώ οι υπόλοιπες στην πλασματική μεμβράνη. Ο

συντονισμός του σχηματισμού το συμπλόκου SNARE πραγματοποιείται από τις πρωτεΐνες Munc-13 και Munc-18. Η σύντηξη είναι μια διαδικασία εξαρτώμενη από ιόντα Ca^{2+} οπότε η σωστή λειτουργία των τασεοελεγχόμενων διαύλων ασβεστίου Cav2.1 και Cav2.1 στην προσυναπτική ενεργή ζώνη είναι απαραίτητη. Ως αισθητήρας ασβεστίου δρα η πρωτεΐνη Syt-1, η οποία συνδέεται με το σύμπλοκο SNARE, ούτως ώστε ελλείψει ασβεστίου να μην γίνεται αυτόματη σύντηξη. Επιπρόσθετα η πρωτεΐνη PRRT2 αναστέλλει τον σχηματισμό του συμπλόκου SNARE συνδέεται με τις πρωτεΐνες VAMP2, Syt-1 και SNAP25 και δρα μειώνοντας τα RRP συναπτικά κυστίδια. Η ενδοκυττάρωση πραγματοποιείται με διάφορους τρόπους για τους οποίους βασική είναι η λειτουργία της δυναμίνης-1 και της κλαθρίνης [20].

Στην μετασυναπτική ενεργή ζώνη εντοπίζονται οι υποδοχείς NMDAR (N-methyl D-aspartate receptor) και AMPAR (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor). Όταν μόρια γλουταμινικού οξέος συνδέονται στον AMPAR πραγματοποιείται αποπόλωση της μετασυναπτικής μεμβράνης η οποία οδηγεί σε αφαίρεση ιόντων Mg^{2+} από τον υποδοχέα NMDAR ο οποίος προσδένει γλουταμινικό και προσλαμβάνει την ανοιχτή του διαμόρφωση. Ακολουθεί εισροή ιόντων Ca^{2+} στο κυτοσόλιο, φωσφορυλίωση της CaMKII (πρωτεϊνική κινάση II εξαρτώμενη από Ca^{2+} /καλμοδουλίνη) και φωσφορυλίωση της SYNGAP1 με στόχο των περιορισμό των διεργασιών ανάπτυξης όπως η μετάφραση καθώς και της τοποθέτησης AMPAR στην μεμβράνη όταν ο νευρώνας είναι στην βασική ανενεργή κατάσταση. Η SYNGAP1 είναι μία από τις πιο άφθονες πρωτεΐνες του μετασυναπτικού δικτύου πρωτεϊνών (PSD-post synaptic density proteins) και η συνδυαστική λειτουργία της μαζί με τους NMDAR υποδοχείς και την πρωτεΐνη PSD95 είναι ζωτικής σημασίας για την ορθή απόκριση των συνάψεων στα εισερχόμενα ερεθίσματα. Ο μηχανισμός που οδηγεί σε επιληπτογένεση σε ασθενείς με μοριακή βλάβη του γονιδίου *SYNGAP1* είναι η υπερδιεγερσιμότητα εξαιτίας της πρώιμης αφθονίας AMPAR στην μεμβράνη [21, 22].

Η συναπτογένεση παρατηρείται σε μέγιστο βαθμό κατά την νεογνική ηλικία και είναι κρίσιμης σημασίας για τη νευρογένεση, τη διαφοροποίηση και μετανάστευση των κυττάρων [18]. Γονίδια παραλλαγές των οποίων οδηγούν σε συναπτοπάθειες είναι τα: *STXBP1*, *SNAP25*, *SYN1*, *SYNGAP1*, *SHANK3*, *LGI1*, *PRRT2* και *DNM1*.



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση νευρώνα και των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν σε επιληπτογένεση. Αναπροσαρμογή από: McTague A. et al. (2016) "The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood." *Lancet Neurol*, Mar;15(3):304-16. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00250-1.

Επιληπτικά σύνδρομα νεογνικής - βρεφικής ηλικίας

Στην παρούσα κατηγορία περιλαμβάνονται σύνδρομα με ηλικία έναρξης σπασμών έως δύο ετών τα οποία χωρίζονται σε:

1. Αυτοπεριοριζόμενα (self-limited) με μεγάλη πιθανότητα ύφεσης.
2. Αναπτυξιακές και επιληπτικές εγκεφαλοπάθειες με σοβαρή αναπτυξιακή καθυστέρηση.

1.1 Αυτοπεριοριζόμενα επιληπτικά σύνδρομα νεογνικής-βρεφικής ηλικίας

1.1.1. Αυτοπεριοριζόμενη (Οικογενής) Νεογνική Επιληψία (Self-Limited (Familial) Neonatal Epilepsy, SLFNE)

Η οικογενής μορφή του συνδρόμου παλαιότερα ήταν γνωστή ως «Καλοήθεις οικογενείς νεογνικοί σπασμοί» και αφορούσε οικογένειες με περισσότερα του ενός πάσχοντα μέλη. Πλέον εδώ ανήκουν και ασθενείς χωρίς θετικό οικογενειακό ιστορικό. Η ηλικία έναρξης κυμαίνεται από 2 έως 7 ημερών και παρατηρείται ύφεση των σπασμών μέχρι της ηλικίας των 6 μηνών. Οι σπασμοί που παρατηρούνται είναι εστιακοί τονικοί ή κλονικοί και αφορούν το πρόσωπο και τα άκρα. Παράλληλα μπορεί να εμφανισθεί και η ακολουθία τονικών, κλονικών, μυοκλονικών σπασμών με συνοδά συμπτώματα άπνοια ή κυάνωση. Η διάρκεια των επεισοδίων είναι για αρκετά λεπτά και μπορεί να εμφανίζονται κατά κλάστερ (cluster - συνεχιζόμενες κρίσεις). Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά μπορεί να παρατηρείται επιβράδυνση, εστιακές επιληπτικές εκφορτίσεις ή το φαινόμενο «theta pointu alternant» όπου καταγράφεται συνύπαρξη κυμάτων θήτα μαζί με αιχμηρά στην εγρήγορση ή τον ύπνο και φαίνεται να μεταναστεύουν στα εγκεφαλικά ημισφαίρια χωρίς να μεταβάλλονται ως απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα ήχου, αφής ή φωτός [23, 24]. Σε μαγνητική εγκεφάλου δεν αναδύονται παθολογικά ευρήματα και η ανταπόκριση στην φαρμακευτική αγωγή είναι καλή.

Η νευροαναπτυξιακή εξέλιξη των ασθενών είναι φυσιολογική με εξαίρεση μικρό αριθμό ασθενών που μπορεί να παρουσιάσει μαθησιακές ή ήπιες κινητικές δυσκολίες αργότερα στην ζωή τους. Επανεμφάνιση σπασμών (κυρίως πυρετικοί ή εστιακοί) σε μεγαλύτερη ηλικία παρατηρείται στο 30% των ασθενών [25]. Το 80% των οικογενών περιπτώσεων αυτοπεριοριζόμενης νεογνικής επιληψίας αποδίδεται σε παραλλαγές του γονιδίου *KCNQ2* ενώ ακολουθούν σε συχνότητα παραλλαγές των γονιδίων *KCNQ3* και *SCN2A*. Η συχνότητα του νοσήματος υπολογίζεται σε 5,3 ανά 1.000 γεννήσεις [26].

1.1.2 Αυτοπεριοριζόμενη (Οικογενής) Νεογνική-Βρεφική Επιληψία (Self-Limited (Familial) Neonatal-Infantile Epilepsy, SLFNIE)

Η οικογενής νεογνική-βρεφική επιληψία μεταβιβάζεται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο και οι ασθενείς εμφανίζουν σπασμούς σε νεογνική ή βρεφική ηλικία. Απουσία θετικού ιστορικού συνήθως συνηγορεί υπέρ της ύπαρξης μιας εκ νέου παραλλαγής. Η έναρξη των σπασμών καταγράφεται από 2 ημερών έως 7 μηνών με στροφή κεφαλής και βλέμματος που ακολουθούνται από εστιακούς κλονικούς ή τονικούς κατά κλάστερ εξελισσόμενοι σε αμφοτερόπλευρους τονικοκλονικούς σπασμούς και πιθανώς συνοδεύονται από άπνοια ή επεισόδια προσήλωσης βλέμματος. Οι σπασμοί υποχωρούν μέχρι την ηλικία 12-24 μηνών, ελέγχονται καλά με την φαρμακευτική αγωγή (η οποία συνήθως εμπεριέχει φαινυτοΐνη) και δεν φαίνεται να σχετίζονται με νευροαναπτυξιακά ελλείμματα. Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά μπορούν να ανιχνευθούν επιληπτικές εκφορτίσεις. Η μοριακή βλάβη στην πλειοψηφία των ασθενών, αφορά το γονίδιο *SCN2A* και σε μικρότερο ποσοστό το *KCNQ2* [27, 28]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει μελέτη του 2019 στην οποία ασθενείς εμφάνισαν σε μεταγενέστερο στάδιο (μεταξύ 10 μηνών έως 14 ετών) επεισοδιακή αταξία που φάνηκε να ανταποκρίνεται (~50%) με τη θεραπεία με ακεταζολαμίδη [29].

1.1.3 Αυτοπεριοριζόμενη (Οικογενής) Βρεφική Επιληψία (Self-Limited (Familial) Infantile Epilepsy, SLFIE)

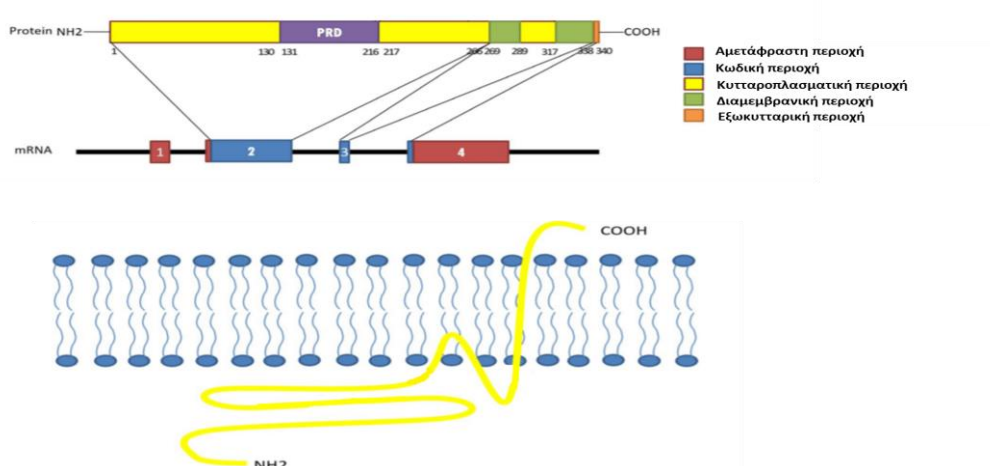
Η ηλικία έναρξης του νοσήματος είναι οι 3-8 μήνες οπότε και εμφανίζονται εστιακοί μεταναστεύοντες ή/και αμφοτερόπλευροι τονικοκλονικοί σπασμοί οι οποίοι μπορεί να είναι φαρμακοανθεκτικοί με αυτόματη ύφεση σε ηλικία 2 ετών. Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά μπορεί να αποκαλύπτονται εστιακές επιληπτικές εκφορτίσεις ενώ ο απεικονιστικός έλεγχος του εγκεφάλου είναι φυσιολογικός. Συνήθως δεν σημειώνονται άλλα νευροαναπτυξιακά ελλείμματα ωστόσο οι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν κινητικές διαταραχές όπως παροξυσμική κινησιογόνο δυσκινησία (paroxysmal kinesigenic dyskinesia-PKD) ή δυστονία κατά την εφηβεία οι οποίες μπορούν να αντιμετωπιστούν με χρήση καρβαμαζεπίνης [30]. Η συχνότητα του νοσήματος ανέρχεται σε 14,2/100.000 γεννήσεις [26]. Γονίδια των οποίων

παραλλαγές έχουν συσχετιστεί με αυτήν την κλινική οντότητα είναι τα: *PRRT2* (συχνότερο), *SCN2A*, *SCN8A*, *BFIS1* και *BFIS4*.

Γονίδιο *PRRT2*

Το γονίδιο *PRRT2* (proline-rich transmembrane protein 2) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 16p11.2 και κωδικοποιεί για την πλούσια σε προλίνη διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου 2. Παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου σχετίζονται με ένα ευρύ φαινοτυπικό φάσμα που περιλαμβάνει: αυτοπεριοριζόμενη βρεφική (οικογενή) επιληψία, βρεφικούς σπασμούς με παροξυσμική χοραιοθέτωση, σύνδρομο West, πυρετικούς σπασμούς, PKD η οποία χαρακτηρίζεται από επεισόδια χορείας, βαλλισμού, δυστονίας με διατήρηση του επιπέδου συνειδήσεως, επεισοδιακή αταξία μετέπειτα από τραυματισμό κεφαλής, οικογενή ημιπληγική ημικρανία καθώς και ημικρανία με αύρα [30-32].

Οι δομικές περιοχές το γονιδίου *PRRT2* περιλαμβάνουν μία περιοχή πλούσια σε προλίνη, μία εξωκυτταρική αμινοτελική περιοχή και μια καρβοξυτελική περιοχή που προσδένεται στην μεμβράνη [31]. Η πρωτεΐνη του γονιδίου *PRRT2* εκφράζεται κυρίως στις προσυναπτικές μεμβράνες και στο κυτταρόπλασμα νευρώνων του εγκεφαλικού φλοιού, των βασικών γαγγλίων, του ιπποκάμπου και της παρεγκεφαλίδας [30].



Εικόνα 2: Δομή γονιδίου *PRRT2* και τοπολογία πρωτεΐνης *PRRT2* στην μεμβράνη. Αναπροσαρμογή από: Yang L., et al. (2020) "Novel and de novo point and large

microdeletion mutation in PRRT2-related epilepsy." *Brain Behav*, May;10(5):e01597, doi: 10.1002/brb3.1597

Οι διαταραχές που σχετίζονται με παραλλαγές του γονιδίου *PRRT2* χαρακτηρίζονται ως **συναπτοπάθειες** και επηρεάζουν την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών. Συγκεκριμένα η *PRRT2* συμμετέχει στο στάδιο της σύντηξης κατά την εξωκυττάρωση των συναπτικών κυστιδίων και στη ρύθμιση της ευαισθησίας σε ιόντα Ca^{2+} αλληλεπιδρώντας με τις πρωτεΐνες SNAP25 (25kDa Synaptosomal associated protein), VAMP2 (Vesicle associated membrane protein 2) και τις συναπτοταγμίνες Syt1 και Syt2 [30, 31]. Επιπρόσθετα η *PRRT2* έχει αποδειχτεί ότι δρα ως αρνητικός ρυθμιστής των τασεοελεγχόμενων διαύλων νατρίου Nav1.2 και Nav1.6 επιδρώντας στην εξαρτώμενη από τάση κατάσταση απενεργοποίησης τους καθώς και στην επαναφορά τους από αυτήν την κατάσταση [31]. Οπότε σε κυτταρικό επίπεδο η δυσλειτουργία του γονιδίου *PRRT2* φαίνεται ότι επηρεάζει τους νευρώνες κατά τη νευρωνική διεγερσιμότητα και κατά την συναπτική μεταβίβαση.

Σε μοριακό επίπεδο το είδος των παραλλαγών που απαντώνται συχνότερα είναι απώλειας λειτουργίας του γονιδίου και συγκεκριμένα πρώιμου κωδικονίου λήξης (με πιο συχνή την παραλλαγή c.649dupC), ενώ επίσης καταγράφονται έλλειψη όλου του γονιδίου ή μικροελλείματα της περιοχής 16p11.2. Σε κλινικό επίπεδο φαίνεται ότι υπάρχει ατελής διεισδυτικότητα και φαινοτυπική ετερογένεια ακόμα και στα άτομα της ίδιας οικογένειας [32].

1.1.4 Γενετική Επιληψία με πυρετικούς σπασμούς + (Genetic Epilepsy with Febrile Seizures +, GEFS+)

Η GEFS+ αναγνωρίσθηκε ως διακριτή κλινική οντότητα το 1997 σε μεγάλες οικογένειες με πυρετικούς σπασμούς που ακολουθούσαν αυτοσωμικό επικρατητικό πρότυπο κληρονόμησης και οι ασθενείς εμφάνιζαν καλή ανταπόκριση στην φαρμακευτική αγωγή [33]. Ο χαρακτηρισμός + αποδίδεται σε άτομα που εμφανίζουν σπασμούς εκτός του αναμενόμενου ηλικιακού εύρους των 6 μηνών με 6 ετών ή εμφανίζουν πυρετικούς και απύρετους γενικευμένους τονικοκλονικούς σπασμούς [34].

Με την νεότερη ταξινόμηση του ILAE το φάσμα της GEFS+ περιλαμβάνει την μυοκλονική ατονική επιληψία, το σύνδρομο Dravet, τα σύνδρομα γενικευμένης γενετικής επιληψίας και τις εστιακές επιληψίες. Συχνότερα παρατηρούνται οι πυρετικοί σπασμοί σε παιδιά ηλικίας κάτω των 5 ετών (ποσοστό 3%) [3] και με ύφεση κατά την εφηβική ηλικία [34]. Τα ηλεκτροεγκεφαλογραφικά ευρήματα μπορεί να περιέχουν συμπλέγματα αιχμής-κύματος εστιακά ή γενικευμένα ενώ ο απεικονιστικός έλεγχος του εγκεφάλου είναι φυσιολογικός.

Γονίδια παραλλαγές των οποίων σχετίζονται με την εμφάνιση πυρετικών σπασμών είναι τα: *SCN1A* (στο 20% των ασθενών) [34], *SCN1B*, *SCN2A* [28], *GABRG2*, *STX1B*, *ANO3* [3].

1.2 Αναπτυξιακές και Επιληπτικές Εγκεφαλοπάθειες (ΑΕΕ)

1.2.1 Πρώιμη-Νεογνική Αναπτυξιακή και Επιληπτική Εγκεφαλοπάθεια (Early-Infantile Developmental and Epileptic Encephalopathy, EIDEE)

Σύμφωνα με την νεότερη πρόταση ταξινόμησης από τον ILAE το 2021 οι διακριτές κλινικές οντότητες της «Πρώιμης μυοκλονικής εγκεφαλοπάθειας» και της «Πρώιμης βρεφικής επιληπτικής εγκεφαλοπάθειας» μπορούν να συνυπάρξουν κάτω από την γενικότερη κατηγορία Πρώιμη-Νεογνική ΑΕΕ καθότι περιλαμβάνουν κοινά φαινοτυπικά στοιχεία και μοριακή βάση ενώ ο διαχωρισμός τους δεν εξυπηρετεί πλέον τη λήψη κλινικών αποφάσεων και δεν καθορίζει την πρόγνωση. Καθότι η συγχώνευση των ανωτέρω συνδρόμων είναι πολύ πρόσφατη επί του παρόντος θα αναλυθούν το καθένα ξεχωριστά, σύμφωνα με τα διαθέσιμα μέχρι στιγμής βιβλιογραφικά δεδομένα, και στο τέλος της ενότητας οι διαφορές τους συνοψίζονται στον Πίνακα 2.

1.2.1.1 Πρώιμη μυοκλονική εγκεφαλοπάθεια (Early Myoclonic Encephalopathy, EME)

Η πρώιμη μυοκλονική εγκεφαλοπάθεια περιγράφηκε το 1978 από τους Aicardi και Goutieres ως κλινική οντότητα διαφορετική από την μέχρι τότε γνωστή μυοκλονία σχετιζόμενη με μη κετωτική υπεργλυκαιμία, όταν μελέτησαν πέντε ασθενείς με μυοκλονική επιληψία χωρίς υπεργλυκαιμία. Οι παρατηρήσεις τους αφορούσαν την έναρξη των μυοκλονιών, ώρες μετά την γέννηση των ασθενών, κυρίως κατά τη διάρκεια της αφύπνισης (εξαφανίζονταν κατά τη διάρκεια του ύπνου) και τον χαρακτηρισμό τους ως γενικευμένες σε κορμό και άκρα. Τα ηλεκτροεγκεφαλογραφήματα καταδείκνυαν το πρότυπο του «burst suppression» (παροξυσμικές ριπές και οξύαιχμα στοιχεία μεγάλου εύρους διάρκειας 2 έως 5 δευτερολέπτων τα οποία επαναλαμβανόταν κάθε 3 με 20 δεύτερα) με την εικόνα των εγκεφαλικών κυμάτων ενδιάμεσα να εμφανίζει επιπέδωση ή πολύ φτωχή οργάνωση. Από την συνολική κλινικά εικόνα καταγράφηκαν κορμική υποτονία, υπέρτονια άκρων, μικροκεφαλία, μικρό προσδόκιμο επιβίωσης (μέγιστη διάρκεια οι 11 μήνες) και σοβαρή ΨΚΚ (ψυχοκινητική καθυστέρηση). Σε επίπεδο νευροπαθοφυσιολογίας παρατηρήθηκαν: πολλαπλασιασμός αστροκυττάρων στον εγκεφαλικό φλοιό, δομικές παραλλαγές του εγκεφαλικού φλοιού, έκτοποι νευρώνες στην λευκή ουσία ή ετεροτοπικά κύτταρα Purkinje στην παρεγκεφαλίδα. Η παρουσία επιπλέον μελών με παρόμοια συμπτωματολογία στην ίδια οικογένεια ανέδειξε τη γενετική συνιστώσα στο νόσημα [35].

Σύμφωνα με τα νεότερα βιβλιογραφικά δεδομένα και την μελέτη μεγαλύτερου αριθμού ασθενών με πρώιμη μυοκλονική εγκεφαλοπάθεια θεωρείται ότι ξεκινά στην νεογνική περίοδο με εστιακές μυοκλονίες προσώπου ή άκρων και μετανάστευση από το ένα μέρος του σώματος στο άλλο. Οι σπασμοί είναι φαρμακοανθεκτικοί και συχνά παρατηρείται στους ασθενείς άπνοια. Το πρότυπο του ΗΕΓ είναι όμοιο με αυτό που απαντάται σε ασθενείς με πρώιμη βρεφική επιληπτική εγκεφαλοπάθεια και εμφανίζει burst suppression [36, 37]. Αλλαγή του προτύπου του ΗΕΓ σε υψαρρυθμικό παρατηρείται περίπου στους μισούς ασθενείς ηλικίας 3 έως 5 μηνών, ωστόσο διαρκεί μόνο για μερικούς μήνες και έπειτα παρατηρείται επιστροφή του προτύπου του burst suppression καθόλη την παιδική ηλικία των ασθενών [38].

Η αιτιολογία της EME είναι κυρίως μεταβολική και εμπεριέχει διαταραχές οργανικών οξέων, αμινοξέων, του κύκλου της ουρίας, της πυριδοξίνης, της πυριδοξίνης-5-φωσφορικού, μη κετωτική υπεργλυκαιμία καθώς και μιτοχονδριακές βλάβες [39]. Συχνά παρατηρούνται δομικές παραλλαγές στο εγκεφαλικό στέλεχος και στην λευκή ουσία και οδηγούν σε υπερδιεγερσιμότητα του εγκεφαλικού φλοιού [38]. Οι ασθενείς στην πλειοψηφία τους εκδηλώνουν διάχυτη και προοδευτική εγκεφαλική ατροφία. Η πρόγνωση είναι φτωχή με περίπου τους μισούς ασθενείς να καταλήγουν μέχρι την ηλικία των 2 ετών και τους υπόλοιπους να εμφανίζουν σοβαρού βαθμού ψυχοκινητική υστέρηση [38]. Οι σπασμοί είναι φαρμακοανθεκτικοί και χρησιμοποιούνται αρκετά φαρμακευτικά σκευάσματα καθώς και κετογόνος δίαιτα για την κλινική αντιμετώπισή τους [40].

Συχνότερες EME

Οι AEE που χαρακτηρίζονται ως «εξαρτώμενη από πυριδοξίνη AEE (Pyridoxine Dependent DEE/PDEE)» και «ανεπάρκεια οξειδάσης πυριδοξίνης-5-φωσφορικού AEE (Pyridoxamine 5-Phosphate Oxidase Deficiency-DEE/P5PDEE)» οφείλονται σε παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές των γονιδίων *ALDH7A1* [41] και *PNPO* αντίστοιχα, ενώ σε μικρότερο αριθμό ασθενών με PDEE η μοριακή βλάβη μπορεί να εντοπίζεται και στο γονίδιο *PLPBP* [42]. Ο υποκείμενος παθογονικός μηχανισμός αφορά το μονοπάτι αποικοδόμησης της λυσίνης και ο τρόπος κληρονόμησης είναι αυτοσωμικός υπολειπόμενος [43]. Οι ασθενείς παρουσιάζουν εγκεφαλοπάθεια με τους σπασμούς να ξεκινούν αμέσως μετά τη γέννηση ενώ έχουν καταγραφεί και περιπτώσεις με ενδομήτρια έναρξη ή έναρξη τους τρεις πρώτους μήνες ζωής [41]. Η εισαγωγή των αντίστοιχων φαρμακευτικών σκευασμάτων (πυριδοξίνης και πυριδοξίνης-5-φωσφορικού) στο θεραπευτικό σχήμα των ασθενών καθώς και δίαιτα φτωχή σε λυσίνη φαίνεται να οδηγεί στον έλεγχο των σπασμών [44].

Το είδος των σπασμών που απαντάται είναι πολυεστιακοί μυοκλονικοί σε άκρα, κορμό, οφθαλμούς και στους μύες του προσώπου. Παράλληλα μπορούν να καταγραφούν και γενικευμένοι τονικοκλονικοί σπασμοί, επιληπτική κατάσταση, πυρετικοί σπασμοί και κλάστερ εστιακών σπασμών. Οι σπασμοί μπορούν να περάσουν σε περιόδους ύφεσης και να επανέλθουν κατά τη διάρκεια εμπύρετης

λοιμώξης. Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά παρατηρείται πρότυπο burst suppression ή εστιακές-πολυεστιακές επιληπτικές εκφορτίσεις και επιβράδυνση του ρυθμού και φαίνεται να ομαλοποιείται μετά την χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής. Η μαγνητική εγκεφάλου στο 50% των ασθενών αποκαλύπτει οίδημα της λευκής ουσίας, ενδοκοιλιακή αιμορραγία, διάταση των κοιλιών ή υποπλασία μεσολοβίου. Στις συννοσηρότητες καταγράφονται υποτονία, έμετοι και οξείδωση και η πλειοψηφία των ασθενών εμφανίζει ποικίλου βαθμού νοητική υστέρηση [45, 46]. Επί ισχυρών κλινικών ενδείξεων για εξαρτώμενη από πυριδοξίνη AEE συστήνεται η μέτρηση αAASA (α-amino adipic semialdehyde) και πιπεκολικού οξέος σε πλάσμα, ούρα και εγκεφαλονωτιαίο υγρό πριν την έναρξη της θεραπείας καθώς στους ασθενείς τα επίπεδα των ανωτέρω ενώσεων είναι αυξημένα [44].

1.2.1.2 Πρώιμη βρεφική επιληπτική εγκεφαλοπάθεια (Early infantile epileptic encephalopathy, EIEE)

Η πρώιμη βρεφική επιληπτική εγκεφαλοπάθεια με συμπλέγματα «burst suppression» γνωστή και ως σύνδρομο Ohtahara είχε περιγραφεί αρχικά το 1976 από τον ομώνυμο γιατρό ως η πιο πρώιμη μορφή ηλικιο-εξαρτώμενης επιληπτικής εγκεφαλοπάθειας. Το σύνδρομο σχετίζεται με δομικές παραλλαγές του εγκεφάλου με πιο συχνές τις δυσπλασίες του εγκεφαλικού φλοιού, την ημιμεγαλεγκεφαλία και την προοδευτική εγκεφαλική ατροφία [47]. Μπορεί επίσης να παρατηρείται νευρωνική δυσλειτουργία [38] με την γενετική αιτιολογία να αφορά παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές σε γονίδια όπως τα *ARX*, *CDKL5*, *KCNQ2* και *STXBP1* [48]. Μεταβολικά γενετικά νοσήματα της βρεφικής ηλικίας με αυτήν την συμπτωματολογία όπως η μη κετωτική υπεργλυκιναιμία, η ανεπάρκεια της οξειδάσης του κυτοχρώματος c και διαταραχές στην μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα, παρουσιάζουν παρόμοια συμπτωματολογία που περιπλέκουν τη διαφορική διάγνωση [38].

Η έναρξη της πρώιμης βρεφικής επιληπτικής εγκεφαλοπάθειας αφορά την νεογνική ηλικία με μέσο όρο τις 14 πρώτες μέρες ζωής. Συχνά οι ασθενείς εμφανίζουν τονικούς σπασμούς με επεισόδια που περιλαμβάνουν παροξυσμικές κινήσεις ακολουθούμενες από τονικές θέσεις έκτασης των άνω ή και των κάτω άκρων. Αυτά τα επεισόδια έχουν διάρκεια λίγων δευτερολέπτων και συνήθως συμβαίνουν σε κλάστερ

εκατοντάδες φορές μέσα στην ημέρα. Το ΗΕΓ των ασθενών εμφανίζει το πρότυπο του burst suppression.

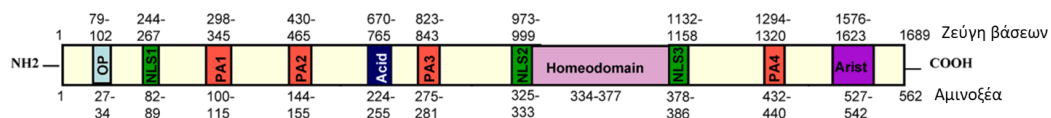
Η πρόγνωση των ασθενών είναι συνήθως φτωχή καθώς δεν παρατηρείται ανταπόκριση στην φαρμακευτική αγωγή ή στην κετογόνο δίαιτα. Η πλειοψηφία των ασθενών είναι αντιμέτωπη με σοβαρές νευροαναπτυξιακές διαταραχές και κινδυνεύει από πρώιμο θάνατο [49] και κυρίως από **SUDEP (sudden and unexplained death in epilepsy)**, μια οντότητα που ορίζεται ως αναίτιος, αιφνίδιος και μη αναζωογονήσιμος θάνατος σε άτομα με επιληψία. Το ποσοστό εμφάνισης SUDEP σε παιδιά κάτω των 16 ετών υπολογίζεται σε 1,1 στα 1.000 [1] ενώ σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία οι θάνατοι των υπολοίπων ασθενών αποδίδονται σε πνευμονική ή καρδιαγγειακή αιτιολογία [48]. Οι ασθενείς που επιβιώνουν μεταβαίνουν σε άλλες κλινικές οντότητες όπως το σύνδρομο Lennox-Gastaut ή το σύνδρομο West [47]. Η μετάβαση αυτή συνοδεύεται από αλλαγές στο ηλεκτροεγκεφαλογράφημα στο οποίο αποκαλύπτονται βραδέα συμπλέγματα αιχμής κύματος ή υφαρρυθμία αντίστοιχα [38]. Γονίδια που έχουν συσχετισθεί με αυτήν την κλινική οντότητα σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία είναι τα *ARX*, *CACNA1A*, *CDKL5*, *DOCK7*, *GABRB1*, *KCNT1*, *KCNQ2*, *PCDH19*, *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN8A*, *STXBP1* και *SLC25A22*.

Γονίδιο ARX

Το γονίδιο *ARX* (X-linked aristaless-related homeobox) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση Χρ21.3, αποτελείται από 5 εξόνια και έχει εξέχοντα ρόλο στη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των νευρώνων καθώς και στη μετανάστευση των προγονικών νευρωνικών κυττάρων στον αναπτυσσόμενο εγκεφαλικό φλοιό. Ανήκει στην οικογένεια των ομοοπρωτεϊνών Prd [50] και εκφράζεται κυρίως στον εμβρυϊκό και ενήλικο εγκέφαλο, στους σκελετικούς μύες, στο πάγκρεας και στους όρχεις [51-53]. Κωδικοποιεί για έναν μεταγραφικό παράγοντα που ρυθμίζει την έκφραση της πρωτεΐνης KDM5C (lysine specific demethylase 5C) και επιδρά άμεσα στο πρότυπο μεθυλίωσης των ιστονών και στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης. Το γονίδιο *MASH1* ενεργοποιεί τα γονίδια *DLX1* και *DLX2* τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούν τους μεταγραφικούς παράγοντες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *ARX*, *DLX5*, *DLX6*. Η μετανάστευση των GABAνεργικών διάμεσων νευρώνων

υποστηρίζεται από τα γονίδια *DLX1* και *DLX2* οπότε δυσλειτουργία του γονιδίου *ARX* οδηγεί σε διαταραχές στη διαδικασία μετανάστευσης [53].

Οι δομικές περιοχές που περιλαμβάνει το γονίδιο *ARX* (Εικόνα 3) είναι μια περιοχή οκταπεπτιδίου (OP), τρεις αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού (NLS1-3), τέσσερις πολυαλανινικές αλληλουχίες (PA1-4), μία όξινη (Acid), μία ομοιοτική (homeodomain) και μία περιοχή *Aristaless* (*Arist*) [53]. Η περιοχή του οκταπεπτιδίου και η PA4 μαζί με τμήμα της καρβοξυτελικής περιοχής (αμινοξέα 432-483) έχουν κατασταλτική δράση αλληλεπιδρώντας με τις πρωτεΐνες GROUCHO/TLE (transducing-like enhancer of split family) και CtBP (C terminal binding proteins) αντίστοιχα. Το μέγεθος των επεκτάσεων των πολυαλανινικών αλληλουχιών φαίνεται να καθορίζει την δραστηριότητα καταστολής τους με αυξημένη κατασταλτική δράση να παρατηρείται σε πρωτεΐνες που φέρουν μεγάλες επεκτάσεις. Η ομοιοτική περιοχή συνδέεται με το DNA και δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής ή καταστολέας και τέλος η περιοχή *Aristaless* αναγνωρίζει γονίδια στόχους παρέχοντας μεταγραφική ενεργοποιητική δράση [50].



Εικόνα 3: Δομή γονιδίου *ARX*. Αναπροσαρμογή από: Friocourt G., Parnavelas J. (2010) "Mutations in *ARX* Result in Several Defects Involving GABAergic Neurons." *Front Cell Neurosci*, Mar 11;4:4. doi: 10.3389/fncel.2010.00004.

Η πρώτη επιβεβαίωση του γενετικού τόπου Χρ21.3-Χρ22.1 ως εμπλεκόμενου στην εμφάνιση σπασμών πραγματοποιήθηκε το 1999 [54] ενώ ακολούθησαν αναφορές για σημειακές παραλλαγές του γονιδίου σε ασθενείς με νοητική υστέρηση, δυστονία, μυοκλονική επιληψία, βρεφικούς σπασμούς, υψαρρυθμία, σπαστικότητα και δυστονία [55-58]. Με τα νεότερα βιβλιογραφικά η ΑΕΕ που σχετίζεται με μοριακή βλάβη του γονιδίου *ARX* κληρονομείται με φυλοσύνδετο υπολειπόμενο τρόπο και φαινοτυπικά συνδέεται με εμφάνιση επιληψίας με πρώιμη έναρξη, τετραπληγία, μετρίου έως σοβαρού βαθμού νοητικής υστέρησης, δυστονίας και διαταραχών στο φάσμα του αυτισμού. Οι δομικές παραλλαγές που συναντώνται σε αυτήν την ομάδα

ασθενών είναι εγκεφαλική ατροφία, μικρά βασικά γάγγλια, διεύρυνση της τρίτης κοιλίας του εγκεφάλου και του κροταφικού λοβού, δυσπλασία ιπποκάμπου καθώς και υποπλασία μεσολοβίου [52]. Ο μηχανισμός που οδηγεί στην επιληπτογένεση αφορά διαταραχές στη νευρωνική διαφοροποίηση και συγκεκριμένα η απουσία ανασταλτικών διάμεσων νευρώνων [38, 50]. Ιστολογικά σε ασθενείς ανευρέθηκαν μόνο πυραμιδικοί νευρώνες, ετερότοποι, χωρίς σαφή οργάνωση στη λευκή ουσία του εγκεφάλου [52].

Παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου *ARX* ευθύνονται για ευρύ φαινοτυπικό φάσμα που περιέχει: φυλοσύνδετη λειεγκεφαλία με αμφίβολα γεννητικά όργανα (XLAG), μη συνδρομική φυλοσύνδετη νοητική υστέρηση (MRX), φυλοσύνδετους νεογνικούς σπασμούς, σύνδρομο Partington (ήπια έως μέτρια νοητική υστέρηση συνοδευόμενη από δυστονικές κινήσεις χεριών) και σύνδρομο Proud (φυλοσύνδετη νοητική υστέρηση με αγενεσία μεσολοβίου και ανωμαλίες γεννητικών οργάνων) [50-52]. Στα θήλεα υποχρεωτικούς φορείς παθογόνων ή πιθανώς παθογόνων παραλλαγών του γονιδίου *ARX* έχει παρατηρηθεί αγενεσία μεσολοβίου και κλινική εικόνα που ποικίλλει από ασυμπτωματική έως σοβαρή νόσηση με νοητική υστέρηση και επιληψία [52]. Η φαινοτυπική ετερογένεια σε θήλεα ασθενείς πιθανώς σχετίζεται με το πρότυπο απενεργοποίησης του χρωμοσώματος X.

Παραλλαγές εκτός της ομοιοτικής περιοχής ή εντός των δύο πολυαλανινικών αλληλουχιών συνδέονται με την εμφάνιση νεογνικών σπασμών, MRX, συνδρόμου Partington ενώ παραλλαγές σε συντηρημένα αμινοξέα της ομοιοτικής περιοχής ή παραλλαγές που οδηγούν σε παραγωγή μικρότερης πολυπεπτιδικής αλυσίδας συνδέονται με την εμφάνιση XLAG και συνδρόμου Proud [50].

Γονίδιο *STXBP1*

Η απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του εγκεφάλου. Η διαδικασία αυτή, απαιτεί γρήγορη και ελεγχόμενη σύντηξη των συναπτικών κυστιδίων στην πλασματική μεμβράνη. Στην συναπτική σύντηξη βασικό ρόλο έχουν οι πρωτεϊνικές οικογένειες SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Receptor/ διαλυτό σύμπλοκο του παράγοντα πρόσδεσης πρωτεΐνης υποδοχέα N-αιθυλμαλεϊμίδης) και SM (Sec1/Muc18). Η πρωτεΐνη *STXBP1*

ανήκει στην οικογένεια SM, εκφράζεται στον εγκέφαλο και είναι υπεύθυνη για την μεταφορά της, βασικής για την σύντηξη των κυστιδίων, πρωτεΐνης συνταξίνης-1 στην πλασματική μεμβράνη. Η συνταξίνη-1 απαντάται σε δύο διαμορφώσεις την ανοιχτή και την κλειστή. Η STXBP1 προσδένει συνταξίνη-1 σε κλειστή διαμόρφωση για να την μεταφέρει. Οι δομικές περιοχές 1 και 3α του γονιδίου *STXBP1* σχηματίζουν μία κοιλότητα στην οποία προσδένονται οι δομικές περιοχές SNARE και H_{abc} της συνταξίνης-1, σε μία διεργασία που παίζει σημαντικό ρόλο και η δομική περιοχή 2. Επιπρόσθετα η περιοχή 1 προσδένει επίσης και την περιοχή N-peptide της συνταξίνης-1. Οι περιοχές H_{abc} και N-peptide είναι απαραίτητες για την αυτοκατασταλτική δράση της συνταξίνης-1 [59].



Εικόνα 4: Δομή γονιδίου *STXBP1*. Αναπροσαρμογή από: Stamberger H., et al. (2016) "STXBP1 encephalopathy: A neurodevelopmental disorder including epilepsy.", *Neurology*, Mar 8;86(10):954-62. doi: 10.1212/WNL.0000000000002457.

Το γονίδιο *STXBP1* (syntaxin-binding protein 1) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 9q34.1 και αποτελείται από 20 εξόνια. Η πρώτη περιγραφή ασθενών με μοριακή βλάβη του γονιδίου *STXBP1* και κλινική εικόνα πρώιμης βρεφικής επιληπτικής εγκεφαλοπάθειας έγινε το 2008 [60]. Το φαινοτυπικό φάσμα των ασθενών με παθολόγους ή πιθανώς παθολόγους παραλλαγές αυτού του γονιδίου ποικίλλει από μη συνδρομική νοητική υστέρηση έως πρώιμη βρεφική επιληπτική εγκεφαλοπάθεια. Παραλλαγές που οδηγούν σε απλοανεπάρκεια θεωρείται ότι σχετίζονται με την εμφάνιση συνδρόμου Ohtahara [51].

Κατά την έναρξη της νόσου οι σπασμοί είναι φαρμακοανθεκτικοί και συχνά δίδεται πολλαπλή αντιεπιληπτική αγωγή η οποία μπορεί να εμπεριέχει βαλπροϊκό οξύ, λεβετιρασετάμη και βιγκαμπατρίνη, ωστόσο μετέπειτα οι ασθενείς μπορούν να είναι ελεύθεροι σπασμών για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρείται εκτεταμένος κυτταρικός θάνατος στο εγκεφαλικό στέλεχος γεγονός που συνηγορεί με την εμφάνιση τονικών σπασμών με έναρξη από τη συγκεκριμένη δομή του εγκεφάλου [38]. Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά ευρήματα περιλαμβάνουν εστιακή ή

πολυεστιακή επιληπτική δραστηριότητα, burst suppression και υψαρρυθμία ενώ η μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου μπορεί να είναι φυσιολογική ή να καταδεικνύει ατροφία, λεπτό μεσολόβιο, υπομυελίνωση ή καθυστέρηση μυελίνωσης [61]. Ως συννοσηρότητες έχουν περιγραφεί νοητική υστέρηση, διαταραχές στο φάσμα του αυτισμού, νευροαναπτυξιακή καθυστέρηση ακόμα και πριν την έναρξη των σπασμών, υποτονία, αταξία ή αταξικό βάδισμα, τρόμος, δυστονία, δυσκινησία και στερεοτυπίες [61].

Οι φαινοτυπικές διαφορές των ασθενών με EME και EIEE σύμφωνα με τα διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα [39, 49, 51] συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 2). Η συνολική συχνότητα αυτών των συνδρόμων ανέρχεται σε 10/100.000 γεννήσεις [26].

Πίνακας 2: Φαινοτυπική σύγκριση Πρώιμης Μυοκλονικής Εγκεφαλοπάθειας και Πρώιμης Βρεφικής Επιληπτικής Εγκεφαλοπάθειας.

EME	EIEE
Μαγνητική εγκεφάλου: μπορεί αρχικά να είναι φυσιολογική και μετέπειτα να καταδεικνύει δομικές παραλλαγές	Μαγνητική εγκεφάλου: εξ αρχής διακριτές δομικές παραλλαγές
HEG: burst suppression* κυρίως κατά τη διάρκεια του ύπνου	HEG: burst suppression** που μετατρέπεται σε υψαρρυθμία κατά την μετάβαση σε σύνδρομο Lennox-Gastaut ή West
*οι φάσεις επιπέδωσης του σήματος είναι <i>μεγαλύτερες</i> σε σχέση με τις περιόδους όπου παρατηρούνται βραδέα κύματα	**οι φάσεις επιπέδωσης του σήματος είναι <i>μικρότερες</i> σε σχέση με τις περιόδους όπου παρατηρούνται βραδέα κύματα
Κυρίως μυοκλονίες άκρων	Κυρίως τονικοί σπασμοί

1.2.2 Επιληψία της βρεφικής ηλικίας με μεταναστεύοντες εστιακούς σπασμούς (Epilepsy of Infancy with Migrating Focal Seizures, EIMFS)

Η κατηγορία αυτή ήταν παλαιότερα γνωστή ως «κακοήθεις μεταναστεύοντες εστιακοί σπασμοί της βρεφικής ηλικίας». Η επιληψία εμφανίζεται τους πρώτους μήνες ζωής με εστιακούς τονικούς ή κλονικούς σπασμούς πολλαπλών προελεύσεων οι οποίοι μεταναστεύουν στο ίδιο ή και στα δύο εγκεφαλικά ημισφαίρια. Οι σπασμοί

είναι μεγάλης διάρκειας, φαρμακοανθεκτικοί και συχνά χαρακτηρίζονται ως επιληπτική κατάσταση. Το ΗΕΓ συνήθως είναι παθολογικό και δείχνει επιβράδυνση, φτωχή οργάνωση και πολυεστιακές επιληπτικές εκφορτίσεις. Η μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου μπορεί να είναι φυσιολογική ή να καταδεικνύει μη ειδικά παθολογικά ευρήματα όπως παρεγκεφαλιδική ατροφία, καθυστέρηση μυελίνωσης με αυξημένο σήμα στη λευκή ουσία ή διεύρυνση των περικολιακών χώρων. Οι ασθενείς εμφανίζουν σοβαρού βαθμού ψυχοκινητική καθυστέρηση μετά την έναρξη των σπασμών καθώς και μεταγεννητική μικροκεφαλία. Η πρόγνωση είναι φτωχή και παρουσιάζουν μεγάλα ποσοστά πρώιμου θανάτου. Η κετογονός δίαιτα έχει περιορισμένα αποτελέσματα. Παράλληλα έχει εφαρμοσθεί χειρουργικά σε μικρό αριθμό ασθενών και η διέγερση του πνευμονογαστρικού νεύρου. Γονίδια παραλλαγές των οποίων σχετίζονται με αυτήν την κλινική οντότητα είναι τα: *KCNT1* (είναι το συχνότερο), *CHD2*, *SCN1A*, *SCN2A*, *SLC12A5*, *SLC25A22*, *PLCB1* και *TBC1D24* [40, 62].

1.2.3 Σύνδρομο βρεφικών σπασμών (Infantile Spasms Syndrome, ISS)

Σε αυτήν την κατηγορία ανήκει και το σύνδρομο West το οποίο περιγράφηκε από τον ομώνυμο γιατρό το 1841 με βάση τη συμπτωματολογία που παρουσίαζε ο γιος του. Η συχνότητα του συνδρόμου είναι 30,7 στις 100.000 γεννήσεις [26] και η έναρξή του παρατηρείται σε ηλικίες 3-12 μηνών. Οι ασθενείς εμφανίζουν σοβαρή ψυχοκινητική καθυστέρηση και ανθεκτική επιληψία με πολύ φτωχή πρόγνωση [51].

Η αιτιολογία μπορεί να είναι γενετική ή επίκτητη, μεταβολική, δομική, ανοσολογική και λοιμώδης. Συχνότερα ανευρίσκεται στους ασθενείς υποξαιμική-ισχαιμική εγκεφαλοπάθεια ενώ σπανιότερα αποκαλύπτονται χρωμοσωμικές ανωμαλίες, νευροαναπτυξιακά σύνδρομα και σύνδρομα δυσμορφολογίας, περιγεννητικά εγκεφαλικά επεισόδια, οζώδης σκλήρυνση ή περικολιακή λευκομαλακία ή αιμορραγία. Ωστόσο ακόμα και αν το αίτιο δεν είναι ξεκάθαρα γενετικό (πχ ανοσολογικό ή λοιμώδες) μπορεί να επηρεάζεται από γενετικές συνιστώσες [63].

Παρατηρείται μεγάλη φαινοτυπική ετερογένεια όσον αφορά το είδος των σπασμών [63] ωστόσο τείνουν να εμφανίζονται σε κλάστερ και συνήθως σχετίζονται με την αφύπνιση ή με την έναρξη του ύπνου [51]. Συχνά περιγράφονται ως κάμψη του

λαιμού και ταυτόχρονη έκταση και ανύψωση και των δύο άνω άκρων ή ως έκταση προσώπου και λαιμού ή ως συνδυασμός κινήσεων έκτασης και κάμψης. Τα επεισόδια αυτά διαρκούν δευτερόλεπτα και επαναλαμβάνονται σε κλάστερ ανά κάποια λεπτά [40]. Παράλληλα κατά την διάρκεια των κρίσεων μπορεί να παρατηρηθεί προσήλωση βλέμματος καθώς και συμμετοχή από το αναπνευστικό ή καρδιαγγειακό σύστημα. Μετεκκριτικά οι ασθενείς παρουσιάζουν ευερεθιστότητα ή υπνηλία [63].

Το ΗΕΓ συχνά καταδεικνύει υφαρρυθμία δηλαδή κύματα χαοτικά πολύ υψηλής έντασης, επιβράδυνση και πολυεστιακές επιληπτόμορφες εκφορτίσεις [40]. Ωστόσο μπορεί να παρατηρηθούν και άλλα μοτίβα όπως η τροποποιημένη υφαρρυθμία που αποτελείται από ασύμμετρα χαρακτηριστικά, εστιακές εκφορτίσεις και ημι-περιοδικά πρότυπα *burst-suppression* [63]. Η μαγνητική εγκεφάλου μπορεί να καταδεικνύει λισσεγκεφαλία, εστιακή φλοιώδη δυσπλασία, πολυμικρογυρία, υδρανεγκεφαλία και ημιμεγαλεγκεφαλία [63].

Ως φαρμακευτική αγωγή χρησιμοποιούνται κορτικοστεροειδή, αδρενοκορτικοτρόπος ορμόνη ACTH και η βιγκαμπατρίνη (μη αναστρέψιμος αναστολέας GABA) [40] ενώ συνεργιστικά δρα και η κετογόνος δίαιτα η οποία είναι υψηλή σε λιπαρά και φτωχή σε υδατάνθρακες [63].

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία τα ηλεκτροεγκεφαλογραφικά ευρήματα σε ασθενείς με εστιακές βλάβες θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως αντικρουόμενα σε σχέση με τα απεικονιστικά καθότι οι ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες δείχνουν γενικευμένες εκφορτίσεις και οι ασθενείς εμφανίζουν γενικευμένους σπασμούς. Μια πιθανή εξήγηση σε αυτό το φαινόμενο είναι ότι οι εστιακές αλλοιώσεις του εγκεφαλικού φλοιού μπορούν να εξαπλωθούν μέσω των βασικών γαγγλίων και στα δύο ημισφαίρια [63].

Γονίδια των οποίων παραλλαγές σχετίζονται με την εμφάνιση συνδρόμου βρεφικών σπασμών αρχικά διαπιστώθηκαν ότι ήταν τα *ARX* και *CDKL5* λόγω του ρόλου τους στην ανάπτυξη του εγκεφάλου και του γεγονότος ότι εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στον εμβρυϊκό εγκέφαλο. Μετέπειτα ανευρέθησαν παραλλαγές και στα γονίδια: *ALG13*, *COL4A1*, *DCX*, *DNM1*, *FOXG1*, *GABA*, *GABRB3*, *GRIN2A*, *TUBA1A*,

KCNT1, KCNQ2, MAGI2, PAFAH1B1, PCDH19, PURA, SCN1A, SCN2A, SCN8A, STXBP1 [51, 64].

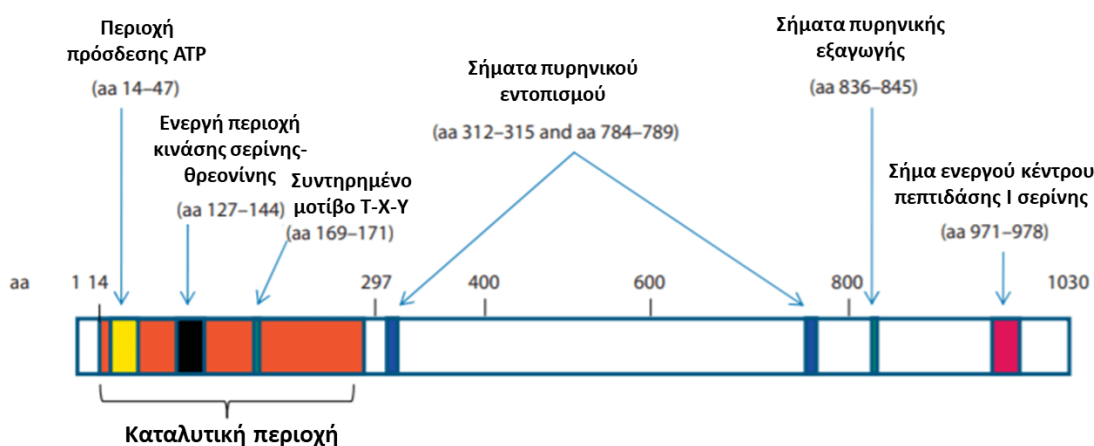
Σε επίπεδο CNVs (Copy Number Variations) έχουν ταυτοποιηθεί μικροελλείμματα στις χρωμοσωμικές περιοχές 2q24.3, 5q14.3, 9p34 και μικροδιπλασιασμοί στις 2q24.3, Xp28.11 [63]. Η διαγνωστική απόδοση του μοριακού καρυοτύπου για τη διάγνωση συνδρόμου βρεφικών σπασμών ή συνδρόμου Lennox Gastaut ανέρχεται στο 8% ενώ ορισμένα CNVs όπως τα μικροελλείμματα 5q13.3 και 16p11.2 μπορεί να επανεμφανίζονται [65].

Γνωστά σύνδρομα χρωμοσωμικών ανωμαλιών που σχετίζονται με εμφάνιση συνδρόμου βρεφικών σπασμών είναι το σύνδρομο Down ενώ από τα μεταβολικά νοσήματα είναι η φαινυλκετονουρία και συγκεκριμένα ο υπότυπος που αφορά την έλλειψη τετραϋδροπτερίνης που όταν δεν λαμβάνεται θεραπεία οδηγεί στην εμφάνιση συνδρόμου West. Από τα γνωστά νευροδερματικά νοσήματα 1.5% των ασθενών με διάγνωση οζώδους σκλήρυνσης και νευροϊνωμάτωσης τύπου 1, παρουσιάζει συμπτωματολογία συμβατή με σύνδρομο West και έχουν καλή πρόγνωση ιδιαίτερα όταν τεθεί υπό έλεγχο η επιληπτική δραστηριότητα [66]. Τέλος βρεφικοί σπασμοί ανοσολογικής αιτιολογίας έχουν συσχετιστεί με παραλλαγές του γονιδίου *GRIN2B* [63].

1.2.3.1 Γονίδιο *CDKL5*

Το γονίδιο *CDKL5* (cyclin-dependent kinase-like 5) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση Xp22.13, αποτελείται από 21 εξόνια και κωδικοποιεί για την κινάση σερίνης θρεονίνης 9. Ο ρόλος των κινασών είναι ο έλεγχος διάφορων κυτταρικών διεργασιών καθώς και η ρύθμιση της μεταγωγής σημάτων. Στον εγκέφαλο οι κινάσες ρυθμίζουν την επιβίωση των νευρώνων, την ανάπτυξή τους και την συναπτική λειτουργία. Η πρωτεΐνη *CDKL5* είναι μόριο με ρυθμιστικό ρόλο και εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη νευραξόνων και δενδριτών, τον σχηματισμό των συνάψεων και την επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης [67].

Οι δομικές περιοχές που απαντώνται στο γονίδιο (Εικόνα 5) είναι: η περιοχή πρόσδεσης ATP, η περιοχή κινάσης σερίνης-θρεονίνης, το συντηρημένο μοτίβο T-X-Y (Thr-X_{aa}-Tyr) το οποίο απαντάται σε MAP κινάσες καθώς και τα σήματα πυρηνικού εντοπισμού, πυρηνικής εξαγωγής και ενεργού κέντρου πεπτιδάσης I σερίνης. Η πρωτεΐνη εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο, στους όρχεις και στο θύμο αδένα και μετακινείται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος κατά τα διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης. Ο κυτταρικός εντοπισμός της εξαρτάται από τα σήματα εντοπισμού και εξαγωγής. Ο ρόλος της είναι η ωρίμανση των νευρώνων σε ιππόκαμπο και εγκεφαλικό φλοιό ενώ τα μέγιστα επίπεδα έκφρασής της παρατηρούνται νωρίς κατά την μεταγεννητική περίοδο δικαιολογώντας κατά αυτόν τον τρόπο την πρώιμη ΑΕΕ που παρατηρείται στους ασθενείς [68].



Εικόνα 5: Δομικές περιοχές γονιδίου *CDKL5*. Αναπροσαρμογή από Bahi-Buisson N., Bienvenue T. (2012) "CDKL5 -Related Disorders: From Clinical Description to Molecular Genetics", *Mol Syndromol*, Apr;2(3-5):137-152. doi: 10.1159/000331333.

Η πρώτη συσχέτιση του γονιδίου με σύνδρομο βρεφικών σπασμών, το 2003, αφορούσε θήλα με βρεφικούς φαρμακοανθεκτικούς σπασμούς, ΗΕΓ με υφαρρυθμία, ψυχοκινητική καθυστέρηση, υποτονία, δυσμορφίες προσώπου και χορειοαθετωσικές κινήσεις λόγω *de novo* χρωμοσωμικών μεταθέσεων που «διέκοπταν» το γονίδιο *CDKL5* [69]. Ακολούθησαν αναφορές για σημειακές παραλλαγές του γονιδίου που οδηγούσαν στην εμφάνιση βρεφικών σπασμών, σοβαρής νευροαναπτυξιακής καθυστέρησης, δυσχέρεια σίτισης (ανάγκη για γαστροστομία ή ρινογαστρικό σωλήνα), διαταραχές οράσεως από τον οπτικό φλοιό

καθώς και άλλων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών που είχαν συνδεθεί μέχρι στιγμής με το σύνδρομο Rett όπως στερεοτυπίες χειρών και κράτημα αναπνοής ή αναπνευστική δυσχέρεια [70, 71]. Η εκτιμώμενη συχνότητα του συνδρόμου ανέρχεται σε 1 στις 40.000 με 60.000 γεννήσεις με αντιστοιχία 4 προς 1 ανάμεσα σε θήλεα και άρρενα [72].

Οι σπασμοί στους ασθενείς έχουν καθημερινή συχνότητα και εξελίσσονται από βρεφικοί σε γενικευμένους ή εστιακούς και γενικευμένους. Επιπρόσθετα μπορεί να παρατηρηθεί και η αλληλουχία υπερκινητικών-τονικών σπασμών (εμπεριέχει γενικευμένους τονικοκλονικούς σπασμούς για 2-4 λεπτά με τη μορφή τονικής μυϊκής σύσπασης ακολουθούμενοι από κλονική φάση και έπειτα από σειρά σπασμών που καταλήγει σε επαναλαμβανόμενες μυοκλονικές συσπάσεις) [73]. Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά η υψαρρυθμία μπορεί να εξελιχθεί σε εστιακή ή γενικευμένη επιβράδυνση ή σε εστιακή επιληπτική δραστηριότητα ή σε ψευδοπεριοδικές επιληπτικές εκφορτίσεις. Επίσης μπορεί να καταδεικνύει εστιακή επιβράδυνση δ κυμάτων στο οπίσθιο τμήμα του εγκεφάλου [72]. Από τις θεραπευτικές προσεγγίσεις μεγαλύτερη απόδοση φαίνεται να έχει η διέγερση του πνευμονογαστρικού νεύρου που οδήγησε σε μείωση των επεισοδίων των σπασμών στο 69% των ασθενών στους οποίους εφαρμόστηκε. Μετριοπαθή αποτελέσματα επέφερε η κετογόνος δίαιτα και άλλες φαρμακευτικές ενώσεις (βιγκαμπατρίνη, κλοβαζάμη, βαλπροϊκό οξύ, λαμοτριγίνη, ζονισαμίδη) [72].

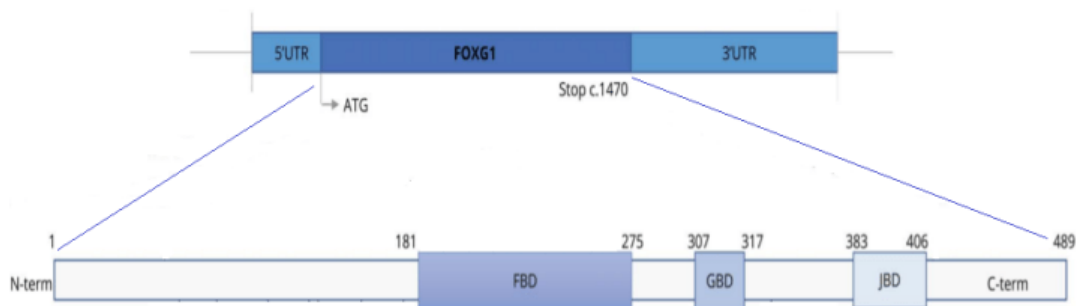
Παρά τις φαινοτυπικές ομοιότητες που εμφανίζει η φυλοσύνδετη ΑΕΕ σχετιζόμενη με παραλλαγές του γονιδίου *CDKL5* με το σύνδρομο Rett μόνο 24% των ασθενών πληρούν τα κριτήρια διάγνωσης του Rett. Παράλληλα αξίζει να σημειωθεί ότι ασθενείς με διπλασιασμούς του γονιδίου *CDKL5* εμφανίζουν ηπιότερη κλινική εικόνα με μακροκεφαλία, μαθησιακές δυσκολίες και απουσία σπασμών ενώ έχει διαπιστωθεί και ατελής διεισδυτικότητα [72].

1.2.3.2 Γονίδιο *FOXP1*

Το γονίδιο *FOXP1* (forkhead box G1) εδράζεται στη χρωμοσωμική θέση 14q12 και ανήκει στην οικογένεια γονιδίων FOX τα μέλη της οποίας δρουν ως μεταγραφικοί ρυθμιστές [74]. Ο ρόλος του είναι η επαγωγή και διαφοροποίηση του πρόσθιου

εγκεφάλου, η ελασματοποίηση (lamination), η οργάνωση και συνδέσεις του νεοφλοιού, η ισορροπία κατά τη διαφοροποίηση των νευρώνων σε ανασταλτικούς και διεγερτικούς, η ανάπτυξη νευριτών και η νευρωνική πλαστικότητα [75].

Δομικά αποτελείται από τις περιοχές: FBD (forkhead DNA binding domain) η οποία είναι συντηρημένη και η λειτουργία της έγκειται στην μεταγραφική καταστολή διαφόρων γονιδίων κατά την ανάπτυξη καθώς και στον σχηματισμό του μετωπιαίου εγκεφάλου, GBD (Groucho binding domain) που προσδένει μέλη της πρωτεϊνικής οικογένειας μεταγραφικών καταστολέων Groucho και JBD (JARID1B binding domain) με ρόλο την πρόσδεση της πρωτεΐνης JARID1B η οποία απομεθυλιώνει ιστόνες [73]. Παράλληλα περιέχει και καρβοξυτελικό και αμινοτελικό άκρο (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Δομή γονιδίου *FOXP1*. Αναπροσαρμογή από: Vegas N. et al. (2018) "Delineating FOXP1 syndrome From congenital microcephaly to hyperkinetic encephalopathy.", *Neurol Genet*, Nov 7; 4(6): e281, doi:10.1212/NXG.000000000000281.

Το 2005 περιγράφηκε για πρώτη φορά βλάβη που περιλάμβανε το γονίδιο *FOXP1* (*de novo* ισοζυγισμένη μετάθεση t(2;14)(p22;q12)) σε θήλυ με σπασμούς, δυσμορφίες προσώπου, τετραπληγία, μικροκεφαλία, αγενεσία μεσολοβίου και ψυχοκινητική καθυστέρηση [76]. Παρότι αρχικά χαρακτηρίστηκε ως συγγενής μορφή συνδρόμου Rett πλέον αποτελεί μεμονωμένη κλινική οντότητα με ονομασία «**FOXP1 σχετιζόμενη εγκεφαλοπάθεια**» κυρίως λόγω της απουσίας παλινδρόμησης και της επιβαρυσμένης εικόνας σε ότι αφορά την κίνηση, την αναπνοή, τις διαταραχές του ύπνου και τις κοινωνικές αλληλεπιδράσεις [75]. Η κληρονομηση των παραλλαγών του γονιδίου είναι αυτοσωμική επικρατητική και οι ασθενείς μπορεί να εμφανίζουν

σημειακές παραλλαγές ή ελλείμματα ή διπλασιασμούς που να αφορούν όλο ή τμήμα του γονιδίου. Οι φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ ασθενών με διαφορετικού είδους μοριακές βλάβες του γονιδίου *FOXG1* συνοψίζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ ασθενών με διαφορετικών ειδών μοριακές βλάβες του γονιδίου *FOXG1*.

Ελλείμματα ή σημειακές παραλλαγές <i>FOXG1</i>	Διπλασιασμοί <i>FOXG1</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Δομικές παραλλαγές εγκεφάλου • Μεταγεννητική μικροκεφαλία • Στερεοτυπίες • Φαρμακοανθεκτικοί σπασμοί βρεφικοί, εστιακοί, γενικευμένοι τονικοκλονικοί, μυοκλονικοί που ξεκινούν σε παιδική ηλικία <2 ετών • Μετάβαση σε σύνδρομο Lennox-Gastaut • ΗΕΓ: εστιακές ή πολυεστιακές επιληπτικές εκφορτίσεις • Απουσία βάρδισης • Απουσία ή ελάχιστος λόγος • Σοβαρή ψυχοκινητική καθυστέρηση • Πρώιμης έναρξης δυσκινησία, χοραιοαθέτωση, δυστονία ή μυοκλονικές κινήσεις • MRI: μετωπιαία παχυγυρία, ατελής ελίκωση, υποπλασία ή αγενεσία μεσολοβίου, καθυστέρηση μυελίνωσης, μείωση λευκής ουσίας • Γαστρεντερικές διαταραχές: δυσκοιλιότητα, γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, σίτιση με ρινογαστρικό σωλήνα 	<ul style="list-style-type: none"> • Χωρίς δομικές παραλλαγές εγκεφάλου • Φυσιολογική περίμετρος κεφαλής • Οι στερεοτυπίες μπορεί να μην υφίστανται • Βρεφικοί σπασμοί με έναρξη σε ηλικία 3-7 μηνών που ανταποκρίνονται σε ACTH • ΗΕΓ: υπαρρυθμικό το οποίο μετέπειτα γίνεται φυσιολογικό ή καταδεικνύει εστιακές ή πολυεστιακές επιληπτικές εκφορτίσεις • Διαταραχές βάρδισης • Καθυστέρηση λόγου • Ποικίλλου βαθμού ψυχοκινητική καθυστέρηση • Οι κινητικές διαταραχές μπορεί να μην υφίστανται • MRI: κατά φύση

1.2.3.3 Γονίδιο *PCDH19*

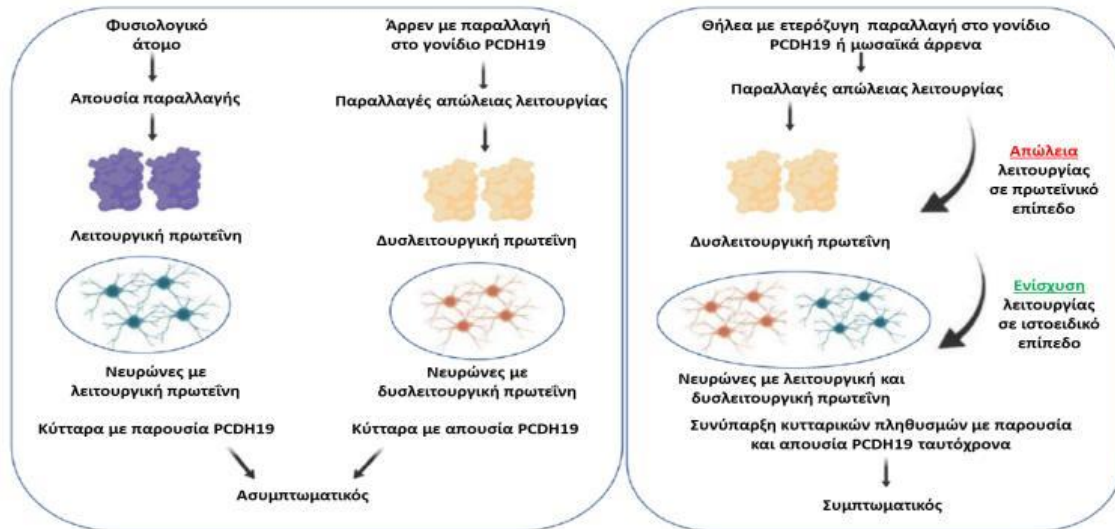
Το γονίδιο *PCDH19* (protocadherin 19) εδράζεται στη χρωμοσωμική θέση Χq22.1, αποτελείται από 6 εξόνια και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη πρωτοκαδερίνη 19 που είναι υπεύθυνη για τις εξαρτώμενες από ασβέστιο κυτταρικές αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και το διμερισμό. Τα μέγιστα επίπεδα έκφρασής του είναι στο ΚΝΣ. Η πρωτεΐνη *PCDH19* είναι μεμβρανική και αποτελείται από την περιοχή σήματος πεπτιδάσης (SP) η οποία στοχεύει άλλες πρωτεΐνες για μετατόπιση κατά μήκος της μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου [77], έξι εξωκυττάρια επαναλήψεις καδερίνης (EC 1-6), μία διαμεμβρανική περιοχή (TM) και ένα καρβοξυτελικό ενδοκυτταρικό άκρο το οποίο έχει δύο συντηρημένες κυτταροπλασματικές περιοχές τις CM1 και CM2 (Εικόνα 7) [78]. Όλες οι επαναλήψεις καδερίνης βρίσκονται εντός του πρώτου εξωνίου και είναι απαραίτητες για τις εξαρτώμενες από ασβέστιο αλληλεπιδράσεις [79].



Εικόνα 7: Δομή γονιδίου *PCDH19*. Αναπροσαρμογή από: Yang L., et al., (2019) "Novel and de novo mutation of *PCDH19* in Girls Clustering Epilepsy." *Brain Behav*, Dec;9(12):e01455. doi: 10.1002/brb3.1455.

Παθολόνες παραλλαγές του γονιδίου *PCDH19* σχετίζονται με την Αναπτυξιακή και Επιληπτική Εγκεφαλοπάθεια τύπου 9 [51]. Ο τρόπος κληρονόμησης είναι φυλοσύνδετος και φυλοπεριοριζόμενος λόγω του φαινομένου της **κυτταρικής παρεμβολής** (cellular interference) (Εικόνα 8) κατά το οποίο η συνύπαρξη δύο κυτταρικών πληθυσμών που εκφράζουν την φυσιολογική ή την παραλλαγμένη πρωτεΐνη αντίστοιχα, οδηγεί σε διαταραχές των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων και των συνάψεων, δυσλειτουργία του νευρωνικού δικτύου και τελικά στην εμφάνιση επιληπτικών φαινομένων [79]. Η παρουσία δύο χρωμοσωμάτων Χ, σε συνδυασμό και με την τυχαία απενεργοποίηση του Χ χρωμοσώματος στα θήλεα άτομα ευνοεί την

συνύπαρξη αυτή και έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση συμπτωμάτων. Παραδοσιακά η εμφάνιση του νοσήματος σε άρρενα άτομα προϋπέθετε την παρουσία περισσότερων του ενός πληθυσμών κυττάρων, λόγω μωσαϊκισμού. Ωστόσο, πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι ακόμα και χωρίς φαινόμενα μωσαϊκισμού, άρρενα άτομα μπορεί να παρουσιάζουν νευροψυχιατρικές διαταραχές, νοητική υστέρηση και διαταραχές στο φάσμα του αυτισμού [80].



Εικόνα 8: Μηχανισμός κυτταρικής παρεμβολής σε άτομα με μοριακή βλάβη του γονιδίου *PCDH19*. Αναπροσαρμογή από: Niazi R. et al.,(2019) "A mutation update for the *PCDH19* gene causing early-onset epilepsy in females with an unusual expression pattern." *Hum Mutat*, Mar;40(3):243-257. doi: 10.1002/humu.23701.

Παραλλαγές του γονιδίου είτε εμφανίζονται *de novo* στους ασθενείς, είτε κληρονομούνται από ετερόζυγη μητέρα (συμπτωματική ή ασυμπτωματική ανάλογα με το πρότυπο απενεργοποίησης του X χρωμοσώματος) ή από ημίζυγο ασυμπτωματικό πατέρα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η πλειοψηφία των παθογόνων ή πιθανώς παθογόνων παραλλαγών παρατηρείται στο εξόνιο 1 και αφορά παρανοηματικές αλλαγές [79].

Οι σπασμοί των ασθενών εμφανίζονται κατά μέσο όρο στην ηλικία των 11 μηνών, τείνουν να συμβαίνουν σε κλάστερ, μπορεί να πυρετικοί, εστιακοί ή γενικευμένοι και να συνοδεύονται από κραυγές. Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά μπορεί να καταγράφονται επιβράδυνση του ρυθμού με εστιακές αιχμές και βραδέα κύματα ή

φωτοπαροξυσμική απάντηση ή γενικευμένες εκφορτίσεις αιχμής-κύματος [81, 82]. Στις συννοσηρότητες περιλαμβάνονται ποικίλλου βαθμού νοητική υστέρηση, διαταραχές στο φάσμα του αυτισμού και συμπεριφορικές διαταραχές όπως επιθετικότητα, κατάθλιψη και ψυχιατρικές εκδηλώσεις. Ως φαρμακευτική αγωγή δίνονται κλοναζεπάμη και κορτικοστεροειδή και σε ασθενείς με εστιακή επιληψία και δομικές βλάβες εγκεφάλου επιτυχής ήταν η χειρουργική παρέμβαση [79].

1.2.3.4 Γονίδιο *SLC2A1*

Το γονίδιο *SLC2A1* (solute carrier family 2, facilitated glucose transporter, member 1) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 1p34.2 και κωδικοποιεί για μια μεμβρανική πρωτεΐνη υπεύθυνη για την μεταφορά γλυκόζης. Η γλυκόζη είναι απαραίτητη για την ορθή μεταβολική λειτουργία του εγκεφάλου και μεταφέρεται από τον μεταφορέα της γλυκόζης τύπου 1 μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και της πλασματικής μεμβράνης των αστροκυττάρων [83]. Μοριακές βλάβες του γονιδίου *SLC2A1* σχετίζεται με σύνδρομο ανεπάρκειας του μεταφορέα τύπου 1 της γλυκόζης (Glucose Transporter 1 Deficiency Syndrome-Glut1DS) το οποίο είναι ένα σπάνιο νευρομεταβολικό σύνδρομο κληρονομούμενο με αυτοσωμικό επικρατητικό τρόπο [84].

Το φαινοτυπικό φάσμα των ασθενών περιλαμβάνει επιληψία βρεφικής έναρξης, ψυχοκινητική καθυστέρηση, μεταγεννητική μικροκεφαλία, ημικρανίες καθώς και επεισοδιακή χορειοαθέτωση και σπαστικότητα ή παροξυσμικές δυσκινητικές διαταραχές [84]. Οι σπασμοί που εμφανίζονται είναι γενικευμένης έναρξης μυοκλονικοί, μυοκλονικοί-ατονικοί, τονικοκλονικοί ή άτυπες αφαιρέσεις και μπορεί να εμφανίζονται σε περιόδους νηστείας ή νωρίς το πρωί. Παράλληλα είναι φαρμακοανθεκτικοί και ανταποκρίνονται μόνο στην κετογόνο δίαιτα. Χαρακτηριστικές κινήσεις των οφθαλμών και της κεφαλής μπορούν να αποτελέσουν διαφοροδιαγνωστικό κριτήριο [85]. Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά ανευρίσκονται επιβράδυνση του ρυθμού ή εστιακές επιληπτικές εκφορτίσεις ή γενικευμένα συμπλέγματα αιχμής-κύματος στα 2.5-4 Hz [83]. Απεικονιστικά έχουν καταγραφεί καθυστέρηση μυελίνωσης, υποπλασία μεσολοβίου και λευκοεγκεφαλοπάθεια [86].

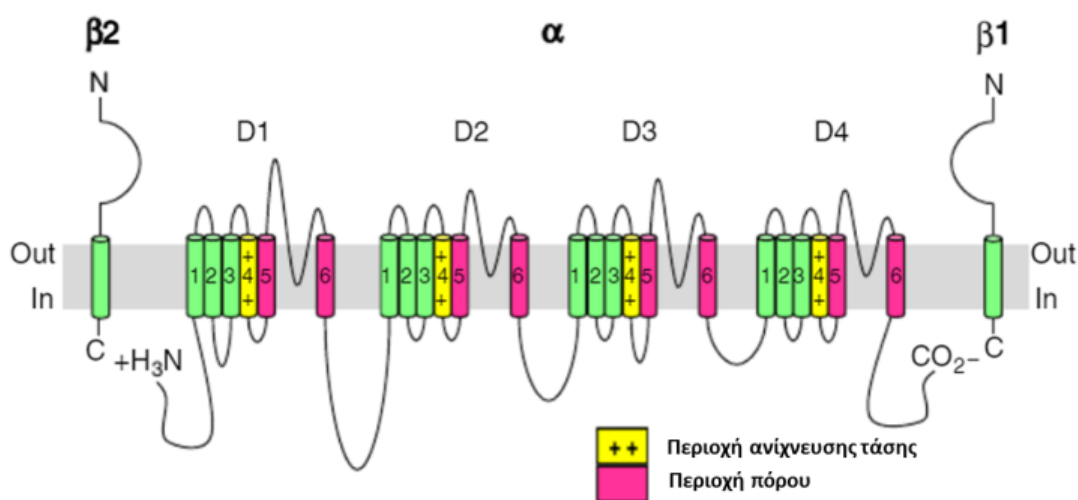
Βιοχημικά μέτρηση της γλυκόζης στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) επιτρέπει την εργαστηριακή επιβεβαίωση της νόσου μετά από ανίχνευση χαμηλών επιπέδων στο ENY και φυσιολογικών στο αίμα [87].

1.2.4 Διαυλοπάθειες νατρίου

Οι διαυλοπάθειες είναι η συχνότερη αιτία σε όλες τις μορφές επιληψίας [88, 89] με συχνότητα εκτιμώμενη ως 25% [90]. Από τις διαυλοπάθειες ξεχωρίζει η διαυλοπάθεια νατρίου η οποία είναι η πλέον συχνή σε ασθενείς με επιληψία [15, 91-93].

Οι τασεο-ελεγχόμενοι διάυλοι νατρίου ελέγχουν την ανταλλαγή νατρίου μεταξύ των ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων χώρων και είναι απαραίτητοι για την έναρξη και την πυροδότηση των δυναμικών δράσης. Οι διάυλοι του νατρίου είναι διαμεμβρανικά σύμπλοκα τα οποία αποτελούνται από μια α υπομονάδα και μία ή περισσότερες β υπομονάδες [91]. Η α υπομονάδα αποτελείται από 4 ομόλογες περιοχές, τις D1 έως D4, με την καθμία να απαρτίζεται από 6 διαμεμβρανικές α -έλικες, τις S1 έως S6 οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με μικρούς ενδοκυττάρους ή εξωκυττάρους βρόχους (loops) σε αντίθεση με τις τέσσερις ομόλογες περιοχές οι οποίες συνδέονται με μεγάλους ενδοκυττάρους βρόχους [51] (Εικόνα 9). Οι περιοχές S1 έως S4 δημιουργούν την περιοχή ανίχνευσης τάσης, η περιοχή S4 συγκεκριμένα λειτουργεί ως ανιχνευτής τάσης και έχει ένα θετικά φορτισμένο αμινοξύ σε κάθε τρίτη θέση της ώστε να ξεκινά την ενεργοποίηση του διαύλου όταν η μεμβράνη έχει αποπολωθεί. Ο πόρος του διαύλου αποτελείται από το φίλτρο εκλεκτικότητας το οποίο σχηματίζεται από το βρόχο που συνδέει τις S5 και S6 και το εσωτερικό του απαρτίζεται τέσσερις διαμεμβρανικές α -έλικες S6. Η πύλη απενεργοποίησης του διαύλου διαμορφώνεται από το βρόχο που συνδέει τις περιοχές D3-D4 και είναι συντηρημένος. Κάθε α υπομονάδα του τασεοελεγχόμενου διαύλου νατρίου συνδέεται με μία έως τέσσερις βοηθητικές υπομονάδες β , τις β 1-4, οι οποίες έχουν εξέχοντα ρόλο στην κινητική και την εξάρτηση της λειτουργίας του διαύλου υπό τάση. Από τον πόρο εισέρχονται ταχύως ιόντα νατρίου, σύμφωνα με τη βαθμίδωση της συγκέντρωσής τους, όταν η κυτταρική μεμβράνη αποπολώνεται και έπειτα ο διάυλος απενεργοποιείται εντός millisecond λόγω της διαφοράς της τάσης που

πραγματοποιείται. Η βαθμίδωση της συγκέντρωσης των ιόντων νατρίου καθώς και καλίου πραγματοποιείται μέσω της ΑΤΡάσης νατρίου-καλίου.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της δομής διαύλων νατρίου. Αναπροσαρμογή από: Brunclaus A., Lal D. (2020) "Sodium channel epilepsies and neurodevelopmental disorders: from disease mechanisms to clinical application." *Dev Med Child Neurol*, Jul;62(7):784-792. doi: 10.1111/dmcp.14519.

Οι α υπομονάδες τασεοελεγχόμενων διαύλων νατρίου που εκφράζονται στον εγκέφαλο κωδικοποιούνται από τα γονίδια *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN3A* και *SCN8A*. Μέσω μελετών των επιπέδων RNA σε αναπτυσσόμενους εγκέφαλους παρατηρήθηκε ότι το *SCN3A* εκφράζεται κυρίως προγεννητικά ενώ μετέπειτα μειώνονται τα επίπεδα έκφρασης του όσο προχωρά ηλικιακά το άτομο, ενώ το αντίστροφο παρατηρήθηκε για τα *SCN1A* και *SCN8A*. Το γονίδιο *SCN2A* φαίνεται να έχει υψηλά ποσοστά έκφρασης σε όλες τις ηλικίες ωστόσο καθότι αντικαθίσταται από το *SCN8A* στους κόμβους του Ranvier και στο αρχικό τμήμα των νευραξόνων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης συνήθως παραλλαγές του, οδηγούν σε ηπιότερους φαινοτύπους όπως αυτός των αυτοπεριοριζόμενων (οικογενών) νεογνικών-βρεφικών σπασμών. Η αντιστάθμιση της λειτουργίας που παρατηρείται μεταξύ των πρωτεϊνών *SCN8A* και *SCN2A* μπορεί να μην είναι απόλυτη και να οδηγήσει τελικά στην εμφάνιση άλλων νευροαναπτυξιακών διαταραχών όπως ο αυτισμός [91].

Η διαταραχή της λειτουργίας του διαύλου, ανάλογα με το είδος της παραλλαγής, μπορεί να ταξινομηθεί σε έξι διακριτές κατηγορίες: απώλεια της

λειτουργίας (**LOF**, loss of function), μερική απώλεια της λειτουργίας (**pLOF**, partial loss of function), μειωμένη διεγερσιμότητα (**DE**, decreased excitability), ενίσχυση της λειτουργίας (**GOF**, gain of function), αυξημένη διεγερσιμότητα (**IE**, increased excitability) και ταυτόχρονη ενίσχυση και απώλεια της λειτουργίας (**G-LOF**). Αυτή η ταξινόμηση καθορίζεται από τις αλλαγές που παρατηρούνται στην ροή ιόντων νατρίου καθώς και στην κινητική του διαύλου, δηλαδή στην ενεργοποίηση και απενεργοποίησή του. Οι παραλλαγές LOF οδηγούν σε πλήρη απώλεια της ροής ιόντων νατρίου ενώ οι pLOF σε μειωμένη ροή και μειωμένη διεγερσιμότητα η οποία επηρεάζει την κινητική του διαύλου. Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται και στις παραλλαγές DE με τη διαφορά ότι οι τελευταίες μπορούν μετά την ενεργοποίηση του διαύλου να οδηγήσουν σε φυσιολογική ροή ιόντων νατρίου. Εν αντιθέσει οι παραλλαγές GOF οδηγούν σε δημιουργία συνεχούς ροής η οποία όμως δεν επαρκεί για την ενεργοποίηση του διαύλου και τελικά παρατηρείται υπερδιεγερσιμότητα. Η διαφορά μεταξύ GOF και IE είναι ότι στην πρώτη κατηγορία παρατηρείται συνεχής ροή ιόντων ενώ στη δεύτερη όχι και επιπρόσθετα, όπως και στις παραλλαγές DE, μετά την ενεργοποίηση του διαύλου μπορεί να οδηγήσουν σε φυσιολογική ροή ιόντων νατρίου. Για τον λόγο αυτό η δυσλειτουργία του διαύλου είναι μικρότερου βαθμού όταν οφείλεται σε παραλλαγές DE και IE. Τέλος οι παραλλαγές G-LOF μπορούν να οδηγήσουν σε συνεχή ροή ιόντων και μειωμένη διεγερσιμότητα ή σε μείωση της ροής και υπερδιεγερσιμότητα [93].

Παραλλαγές LOF ανιχνεύονται συχνά σε ασθενείς με σοβαρή μυοκλονική επιληψία της βρεφικής ηλικίας (Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy, SMEI) και αφορούν την περιοχή του πόρου του διαύλου. Οι ασθενείς με εστιακούς πυρετικούς σπασμούς εμφανίζουν παραλλαγές pLOF, G-LOF και σπανιότερα LOF στην περιοχή του πόρου ή στην περιοχή ανίχνευσης τάσης ενώ οι ασθενείς με GEFS+ έχουν ηπιότερες μοριακές βλάβες οι οποίες οδηγούν σε IE, DE, pLOF ή GOF [93].

1.2.4.1. Γονίδιο *SCN1A*

Το γονίδιο *SCN1A* (sodium voltage-gated channel, alpha subunit 1) εδράζεται στην θέση 2q24.3 και κωδικοποιεί για την α υπομονάδα του νευρωνικού τασεο-ελεγχόμενου διαύλου νατρίου 1. Ο ρόλος του είναι η έναρξη της πυροδότησης

δυναμικών δράσης και εκφράζεται κυρίως στους ανασταλτικούς νευρώνες. Σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα μοριακές βλάβες του γονιδίου *SCN1A* οδηγούν σε υπερδιεγερσιμότητα των νευρικών κυττάρων μέσω δύο πιθανών μηχανισμών που περιλαμβάνουν είτε μεγάλη ροή ιόντων νατρίου, είτε απώλεια αναστολής των διεγερτικών νευρώνων [15, 91].

Η αυξημένη μεταγεννητική έκφραση του *SCN1A* συμβαδίζει με την εμφάνιση των συμπτωμάτων σε ασθενείς ηλικίας 6 μηνών και άνω. Το φαινοτυπικό φάσμα της διαυλοπάθειας νατρίου περιλαμβάνει σύνδρομο Dravet, μυοκλονική-ατονική επιληψία, EIMFS, EIDEE, GEFS+, εστιακή επιληψία με πυρετικούς σπασμούς (PEFS+) καθώς και μη επιληπτικά σύνδρομα όπως η ημιπληγική ημικρανία (ημικρανία συνοδευόμενη από αύρα) και ο αυτισμός [34].

1.2.4.2 Γονίδιο *SCN2A*

Το γονίδιο *SCN2A* (voltage-gated, type II sodium channel, alpha subunit) εδράζεται στην θέση 2q24.3 και κωδικοποιεί την α υπομονάδα του νευρωνικού τασηο-ελεγχόμενου διαύλου νατρίου 2. Εκφράζεται κυρίως από το δεύτερο τρίμηνο της κύησης έως τα 2 πρώτα έτη ζωής στους κόμβους του Ranvier και στο αρχικό τμήμα των νευραξόνων συμμετέχοντας κατ' αυτόν τον τρόπο στην νευρωνική διεγερσιμότητα και στην έναρξη και πυροδότηση δυναμικών δράσης [28]. Παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου *SCN2A* απαντώνται στο 1% των ατόμων με ΑΕΕ και παρόλο που αρχικά οι παραλλαγές του γονιδίου είχαν συσχετισθεί με εμφάνιση αυτοπεριοριζόμενων (οικογενών) νεογνικών-βρεφικών σπασμών μετέπειτα το φαινοτυπικό φάσμα διευρύνθηκε καθώς συσχετίστηκε με εμφάνιση πρώιμης βρεφικής αναπτυξιακής επιληπτικής εγκεφαλοπάθειας, επιληψίας της βρεφικής ηλικίας με μεταναστεύοντες εστιακούς σπασμούς, βρεφικών σπασμών, συνδρόμου Dravet καθώς και με άλλες διαταραχές όπως νοητική υστέρηση, διαταραχές στο αυτιστικό φάσμα, επεισοδιακή αταξία και σχιζοφρένεια [28]. Συνήθως *de novo* παρερμηνεύσιμες παραλλαγές GOF συνδέονται με την εμφάνιση ΑΕΕ σε ηλικία <3 μηνών, ενώ *de novo* παραλλαγές LOF ή G-LOF παρερμηνεύσιμες, ματίσματος ή που οδηγούν σε δημιουργία μικρότερης πολυπεπτιδικής αλυσίδας συνδέονται με την εμφάνιση ΑΕΕ σε ηλικία >3 μηνών. Παράλληλα παραλλαγές LOF

σχετίζονται επίσης και με εμφάνιση διαταραχών αυτιστικού φάσματος, νοητικής υστέρησης και σχιζοφρένειας [28].

1.2.4.3 Σύνδρομο Dravet

Περιγράφηκε αρχικά το 1978 από την Γαλλίδα νευρολόγο Charlotte Dravet ως σοβαρή μυοκλονική επιληψία της βρεφικής ηλικίας και το 1989 μετονομάστηκε σε σύνδρομο Dravet [94]. Από το 1980 και μετά παρατηρήθηκε κλινική ετερογένεια όπου κοινά χαρακτηριστικά αποτελούν η απουσία μυοκλονικής επιληψίας, η ομοιότητα των ηλεκτροεγκεφαλογραφικών ευρημάτων και η παραμονή των κρίσεων και στην ενήλικη ζωή [94]. Η συχνότητά του κυμαίνεται σε διάφορες πληθυσμιακές αλλά ο μέσος όρος εμφάνισης θεωρείται 1/15.000 [91]. Από το 2001 το σύνδρομο Dravet θεωρείται διαυλοπάθεια νατρίου [95] λόγω της συσχέτισης του με παθογόνες παραλλαγές γονιδίων που κωδικοποιούν για υπομονάδες διαύλων νατρίου και ειδικότερα με το γονίδιο *SCN1A*. Οι συχνότερες παραλλαγές που καταγράφονται οδηγούν σε απώλεια της λειτουργίας του και είναι κυρίως παρανοηματικές ή που εισάγουν πρώιμο κωδικόνιο λήξης στο 80% των ασθενών, ελλείμματα του γονιδίου *SCN1A* μόνο ή και των γειτονικών γονιδίων *SCN2A*, *SCN3A* και *SCN9A* στο 2-3% καθώς και παραλλαγές του γονιδίου *SCN9A*. Πλαισιοτροπικές παραλλαγές ή παραλλαγές που οδηγούν σε πρώιμο κωδικόνιο λήξης στο τελευταίο εξόνιο του γονιδίου *SCN1A* οδηγούν σε μειωμένη αγωγιμότητα νατρίου και όχι σε απλοανεπάρκεια όπως παρατηρείται με τις περισσότερες παθογόνες παραλλαγές γιατί αυτό το εξόνιο διαφεύγει του μηχανισμού αποδόμησης του RNA λόγω παρουσίας παρανοηματικών παραλλαγών (nonsense mediated mRNA decay) [92].

Οι παραλλαγές του γονιδίου *SCN1A* ακολουθούν αυτοσωμικό επικρατητικό πρότυπο κληρονομησης και εμφανίζονται κυρίως εκ νέου στους ασθενείς. Ωστόσο σε ένα ποσοστό έως 10%, ασυμπτωματικοί γονείς μπορεί να εμφανίζουν μωσαϊκισμό που διαφύγει της συμβατικής διαγνωστικής προσέγγισης [96]. Η ατελής διεισδυτικότητα που παρατηρείται αφορά κυρίως παρανοηματικές παραλλαγές ή παραλλαγές ματίσματος [93].

Η ΑΕΕ που σχετίζεται με μοριακή βλάβη του γονιδίου *SCN1A* εκδηλώνεται στους πρώτους έξι μήνες ζωής, με πυρετικούς σπασμούς οι οποίοι μπορεί να είναι κλονικοί και να αφορούν μόνο την μία πλευρά του σώματος ή γενικευμένοι

τονικοκλονικοί και να εξελίσσονται σε επιληπτική κατάσταση [3]. Παράλληλα στο 1/3 των ατόμων καταγράφεται έναρξη σπασμών μετά από εμβολιασμό [19]. Σε δεύτερη φάση οι ασθενείς ηλικίας 1-5 ετών εμφανίζουν και άλλα είδη σπασμών όπως μυοκλονίες και επεισόδια απώλειας συνειδήσεως [34]. Επιπρόσθετα στην ηλικία του 1 έτους μπορεί να παρατηρηθεί και υποτονία [97]. Αρχικά η ανάπτυξη των ασθενών είναι φυσιολογική αλλά με το πέρασμα του χρόνου παρατηρείται ποικίλλου βαθμού νοητική υστέρηση, συμπεριφορικές διαταραχές όπως επιθετικότητα, ελλειμματική προσοχή, διεγερσιμότητα και αυτιστικά στοιχεία [98]. Παράλληλα παρατηρείται και καθυστέρηση στα κινητικά ορόσημα με μέση ηλικία έναρξης βάρδισης τους 16-18 μήνες η οποία εξελίσσεται σε αταξία και σπαστικότητα στην εφηβεία [34, 99].

Τα ηλεκτροεγκεφαλογραφικά ευρήματα στα πρώτα στάδια του συνδρόμου είναι φυσιολογικά ενώ μετά την ηλικία των δύο ετών παρατηρούνται: επιβράδυνση του ρυθμού, πολυεστιακές εκφορτίσεις και γενικευμένες εκφορτίσεις αιχμής-κύματος [34] ενώ παράλληλα σε έως 15% των ασθενών μπορεί να παρουσιάζεται φωτοπαροξυσμική απόκριση στο ΗΕΓ [100]. Η μαγνητική τομογραφία του εγκεφάλου κατά την έναρξη των σπασμών είναι φυσιολογική ενώ με την πάροδο του χρόνου μπορεί να παρουσιαστούν: εστιακή ατροφία, δυσπλασία του εγκεφαλικού φλοιού καθώς και σκλήρυνση του ιπποκάμπου [51].

Χαρακτηριστικό του συνδρόμου είναι η φαρμακοανθεκτικότητα στην αντιεπιληπτική αγωγή. Η χρήση αποκλειστών (blockers) διαύλων νατρίου όπως φαινοτοΐνη, καρβαμαζεπίνη, οξυκαρβαζεπίνη και λαμοτριγίνη αντενδείκνυται σε ασθενείς με απλοανεπάρκεια του διαύλου (οφειλόμενη σε παραλλαγές απώλειας λειτουργίας) καθώς φαίνεται να οδηγούν σε αύξηση της συχνότητας των επιληπτικών κρίσεων και κατ' επέκταση σε νευροαναπτυξιακή επιβράδυνση του ατόμου [14]. Σε αυτές τις περιπτώσεις συστήνεται ως θεραπευτική αγωγή η χρήση τοπιραμάτης ή βαλπροϊκού οξέος [101], ή η ενίσχυση της δράσης των GABA-νεργικών υποδοχέων μέσω βενζοδιαζεπινών ή στιριπεντόλης. Επικουρική δράση εμφανίζει η χρήση της κετογόνου διαίτας καθότι ο συνδυασμός τους φαίνεται να έχει καλύτερα αποτελέσματα στη διατήρηση του γνωσιακού επιπέδου των ασθενών [99].

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία το οικογενειακό ιστορικό των ασθενών είναι θετικό για σπασμούς σε ποσοστό που ποικίλλει από 25 έως 70% και το ποσοστό θνητότητας αγγίζει το 16%. Οι αιτίες θανάτου που έχουν καταγραφεί είναι SUDEP και αιφνίδιος καρδιακός θάνατος [51].

Με τα νεότερα γενετικά δεδομένα ο κλινικός φαινότυπος του συνδρόμου Dravet έχει συσχετισθεί και με άλλα γονίδια πέραν των *SCN1A* και *SCN9A* καθότι έχουν ανευρεθεί παθογόνες παραλλαγές σε μικρότερο ποσοστό ασθενών και στα γονίδια *GABRA1*, *STXBP1*, *PCDH19*, *GABRA2* γνωστά και ως μιμητές του συνδρόμου Dravet [96].

1.2.5 Διαυλοπάθειες καλίου

Ο ρόλος των διαύλων καλίου είναι ο έλεγχος των δυναμικών δράσης και της διεγερσιμότητας των νευρώνων. Οι δίαυλοι του καλίου είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες σχηματίζονται από α υπομονάδες και διαχωρίζονται σε τέσσερις οικογένειες: K_v , K_{Ca} , K_{ir} , K_{2P} . Η οικογένεια K_v , είναι η μεγαλύτερη, περιλαμβάνει τους τασηο-εξαρτώμενους διαύλους καλίου και συνδέεται με την εμφάνιση επιληψίας. Δομικά οι τασηο-εξαρτώμενοι δίαυλοι καλίου αποτελούνται από έξι διαμεμβρανικά τμήματα τα S1 έως S6 τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με 5 βρόχους. Η περιοχή ανίχνευσης τάσης σχηματίζεται από τα τμήματα S1 - S4 με το S4 να περιέχει θετικά φορτισμένα αμινοξέα και συγκεκριμένα αργινίνες ώστε να μπορούν οι δίαυλοι να ανοίγουν ως απόκριση στην αλλαγή δυναμικού της μεμβράνης (νευρωνική αποπόλωση) ρυθμίζοντας τη συχνότητα και τη διάρκεια του δυναμικού δράσης [19]. Ο πόρος σχηματίζεται από τα τμήματα S5,S6 και τον εξαιρετικά συντηρημένο βρόχο που τα ενώνει [90].

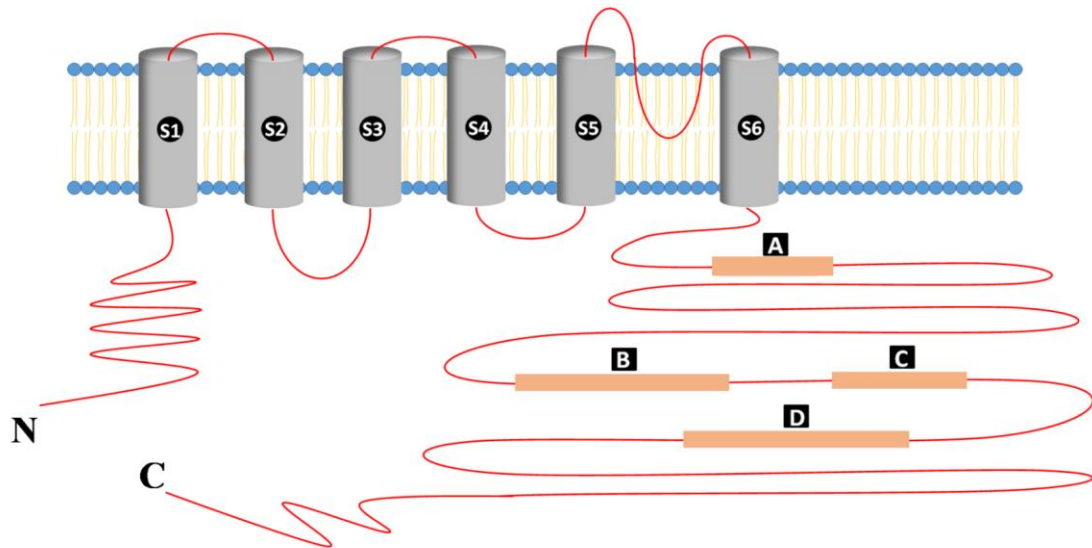
Στα νευρωνικά δίκτυα συμμετέχουν συχνότερα μέλη της οικογένειας K_v7 , που αποτελείται από τις πρωτεΐνες των γονιδίων *KCNQ1-5*. Οι νευρωνικοί δίαυλοι K_v7 διαμορφώνονται κυρίως από ετεροτετραμερή των $K_v7.2$ (*KCNQ2*) και $K_v7.3$ (*KCNQ3*) και εντοπίζονται στον ιππόκαμπο και στον εγκεφαλικό φλοιό. Ο ρόλος τους είναι η παραγωγή τάσης, μέσω της διακίνησης ιόντων καλίου, η οποία συμβάλει στη διατήρηση του δυναμικού ηρεμίας της μεμβράνης, η πρόληψη της επαναλαμβανόμενης έναρξης δυναμικών δράσης και η ρύθμιση του ουδού των

δυναμικών δράσης. Η παρουσία φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης 4,5-διφωσφορικού (PIP2) είναι απαραίτητη για το άνοιγμα των διαύλων της οικογένειας K_v7 . Στα ενδοκυτταρικά καρβοξυτελικά άκρα των $K_v7.2$ και $K_v7.3$ υπάρχουν θέσεις πρόσδεσης PIP2 και αγκυρίνης και τέσσερις έλικες οι A-D οι οποίες συμμετέχουν στη διαμόρφωση του διαύλου (έλικα C) και στην αλληλεπίδραση με μόρια καλμοδουλίνης (έλικες A και B) [102].

1.2.5.1 Γονίδιο *KCNQ2*

Το γονίδιο *KCNQ2* (voltage-gated potassium channel, KQT-like subfamily, member 2) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 20q13.33 και αποτελείται από 17 εξόνια. Παρανοσηματικές παραλλαγές του γονιδίου σχετίζονται με την εμφάνιση συνδρόμου Ohtahara, ενώ πλαισιοτροπικές ή αντινοσηματικές παραλλαγές σχετίζονται με εμφάνιση αυτοπεριοριζόμενων (οικογενών) νεογνικών σπασμών [51]. Στους ασθενείς με AEE παρατηρούνται εστιακοί τονικοί και κλονικοί σπασμοί στις 3 πρώτες μέρες ζωής πιθανώς συνοδευόμενοι από επεισόδια άπνοιας και υποτονία. Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά ανευρίσκεται πρότυπο burst suppression ή πολυεστιακές αιχμές ή αιχιμόμορφα κύματα [103] και η μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου μπορεί να αποκαλύπτει ατροφία ή βλάβη στα βασικά γάγγλια ή στον θάλαμο. Η πρόγνωση είναι φτωχή και χαρακτηριστικό των ασθενών είναι η φαρμακοανθεκτική επιληψία για την οποία σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία χρησιμοποιούνται φαινοβαρβιτάλη, αποκλειστές του διαύλου νατρίου όπως η φαινυτοΐνη, καρβαμαζεπίνη και κετογόνος διαίτα [104].

Οι παραλλαγές συνήθως απαντώνται εκ νέου στους ασθενείς με AEE και τείνουν να εμφανίζονται σε συγκεκριμένες περιοχές του διαύλου: στο τμήμα S4, στον πόρο, στην έλικα B και στο τμήμα που ενώνει τις έλικες B-C (Εικόνα 10) [90, 102]. Η ανταπόκριση των ασθενών σε αγωγή με αποκλειστές διαύλων νατρίου πιθανώς αποδίδεται στην άμεση αλληλεπίδραση που παρατηρείται ανάμεσα στα δύο είδη διαύλων λόγω της σύνδεσής τους και των θέσεων τους στην μεμβράνη των νευρωνικών κυττάρων [103].



Εικόνα 10: Δομή γονιδίου *KCNQ2*. Αναπροσαρμογή από: Le Nguyen T. H. et al.(2021) "A novel *KCNQ2* gene mutation in a patient with self-limited non-familial neonatal epilepsy: a case report", *Science & Technology Development Journal-Health Sciences*, 2(1), 94-101, doi:10.32508/stdjhs.v2i1.445.

Οι φαινοτυπικές διαφορές στους ασθενείς με παραλλαγές του γονιδίου *KCNQ2* μπορούν να αποδοθούν στις διαφορετικές επιδράσεις που επιφέρουν οι μοριακές βλάβες στη λειτουργία του διαύλου. Ειδικότερα σε ασθενείς με αυτοπεριοριζόμενους (οικογενείς) νεογνικούς σπασμούς απαντώνται αποκλειστικά παραλλαγές που οδηγούν σε απλοανεπάρκεια ή LOF. Η πιθανότερη θεωρία για την εμφάνιση αυτής της ήπιας κλινικής εικόνας υποστηρίζει ότι η απλοανεπάρκεια μέσω διαφόρων μηχανισμών του οργανισμού να μπορεί να αντισταθμιστεί. Αντίθετα σε άτομα με ΑΕΕ οι δίαυλοι που σχηματίζονται είναι είτε δυσλειτουργικοί λόγω διαταραχών στην ανίχνευση της τάσης, είτε σε διαρκή ενεργοποίηση λόγω παραλλαγών GOF. Οπότε μελλοντικά ίσως θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σκευάσματα τα οποία να εμποδίζουν την μεταγραφή των αλληλίων με παραλλαγές GOF στο γονίδιο *KCNQ2* οδηγώντας έτσι σε LOF και τελικά στην εμφάνιση αυτοπεριοριζόμενων (οικογενών) νεογνικών σπασμών και όχι ΑΕΕ [66, 103].

1.2.5.2 Γονίδιο *KCNT1*

Από την οικογένεια K_{Ca} , όπου οι δίαυλοι καλίου είναι ευαίσθητοι στην εξωκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου, εξέχοντα ρόλο στην εμφάνιση επιληψιών έχει

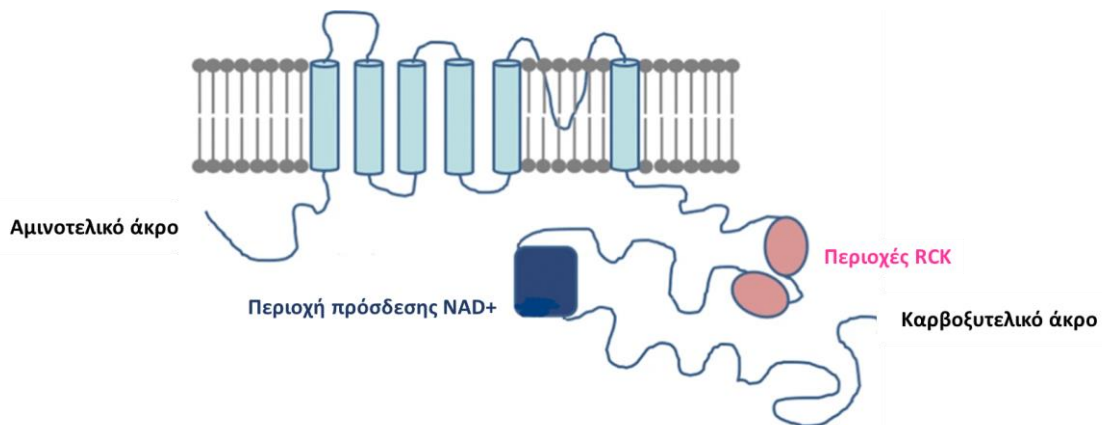
ο δίαυλος $K_{Ca}4.1$ που κωδικοποιείται από το γονίδιο *KCNT1* και ενεργοποιείται από νάτριο. Το γονίδιο *KCNT1* (potassium channel, subfamily T, member 1) εδράζεται στη χρωμοσωμική θέση 9q34.3 και εκφράζεται στο νευρικό σύστημα (στέλεχος, υπόκαμπος, παρεγκεφαλίδα) [105], στα νεφρά και στην καρδιά [106]. Μαζί με την πρωτεΐνη του γονιδίου *KCNT2* δημιουργούν ένα τετραμερές το οποίο είναι υπεύθυνο για την επαναφορά της πόλωσης μετά από επαναλαμβανόμενη πυροδότηση.

Ο δίαυλος που κωδικοποιείται από το γονίδιο *KCNT1* ακολουθεί τη γενική δομή των διαύλων K_v (όπως αυτή περιγράφεται στην ενότητα 1.2.5) ενώ πρόσθετα φέρει και μια μεγάλη ενδοκυτταρική καρβοξυτελική περιοχή η οποία περιέχει δυο επαναλαμβανόμενες RCK περιοχές και μία περιοχή πρόσδεσης NAD^+ (Εικόνα 11) [62]. Οι περιοχές RCK ρυθμίζουν την αγωγιμότητα των ιόντων K^+ σχηματίζοντας ένα δακτύλιο ο οποίος παρουσία νατρίου οδηγεί σε αλλαγή της διαμόρφωσης του διαύλου ώστε να είναι προσβάσιμος ο πόρος του καναλιού. Η περιοχή πρόσδεσης NAD^+ όταν υπάρχει αυξημένη συγκέντρωση NAD^+ μειώνει τις απαιτήσεις του διαύλου για νάτριο [107].

Το 2012 παραλλαγές του γονιδίου *KCNT1* είχαν συσχετισθεί αρχικά με την εμφάνιση φαρμακοανθεκτικής επιληψίας της βρεφικής ηλικίας με μεταναστεύοντες εστιακούς σπασμούς [108] καθώς και με αυτοσωμική επικρατητική νυχτερινή επιληψία του μετωπιαίου λοβού. Έκτοτε παραλλαγές του γονιδίου έχουν βρεθεί και σε ασθενείς με ΑΕΕ, εστιακή επιληψία, υπερκινητική επιληψία σχετιζόμενη με τον ύπνο (SHE-Sleep related Hypermotor Epilepsy) [105], γενικευμένους τονικοκλονικούς σπασμούς [106] και καρδιακές αρρυθμίες [62]. Στα συνυπάρχοντα κλινικά ευρήματα περιλαμβάνονται: λευκοδυστροφία ή λευκοεγκεφαλοπάθεια, υποτονία, προοδευτική μικροκεφαλία, στραβισμός, ψυχοκινητική καθυστέρηση, δυστονία, χοραιοαθέτωση και πνευμονική αιμορραγία. Η μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου αρχικά μπορεί να είναι φυσιολογική ενώ μετέπειτα να καταδεικνύει καθυστέρηση μυελίνωσης, απώλεια του όγκου του υποκάμπου ή εγκεφαλική ατροφία [107]. Οι παραλλαγές του γονιδίου συνδέονται με κλινική ετερογένεια και συνήθως εμφανίζονται *de novo* στους ασθενείς, ενώ δεν αποκλείονται φαινόμενα όπως η ατελής διεισδυτικότητα και ο γονεϊκός σωματικός μωσαϊκισμός που έχει παρατηρηθεί σε ορισμένες οικογένειες

[62, 107]. Επιπρόσθετα αναφέρονται σπάνιες περιπτώσεις ασυμπτωματικών φορέων γνωστών παθογόνων παραλλαγών του γονιδίου [106].

Οι συχνότερες μοριακές βλάβες είναι παρανοσηματικές αλλαγές κυρίως στις δομικές περιοχές S5, S6, στο βρόχο που ενώνει τις S5 - S6, στις RCK περιοχές και στην περιοχή πρόσδεσης NAD⁺ [109] με αποτέλεσμα να διαταράσσουν τον μηχανισμό ανοίγματός του. Είναι επίσης πιθανό να σχετίζονται με αυξημένη αγωγιμότητα σε ιόντα καλίου στους ανασταλτικούς διάμεσους νευρώνες που οδηγεί σε παράταση της υπερπόλωσης και τελικά στην εμφάνιση σπασμών. Παράλληλα η σύνδεση του καρβοξυτελικού άκρου της KCNT1 με την FMRP, πρωτεΐνη που σχετίζεται με το σύνδρομο του Ευθραύστου Χ, είναι δυνατόν να εξηγεί την εκδήλωση νοητικής υστέρησης σε κάποιους ασθενείς [62].



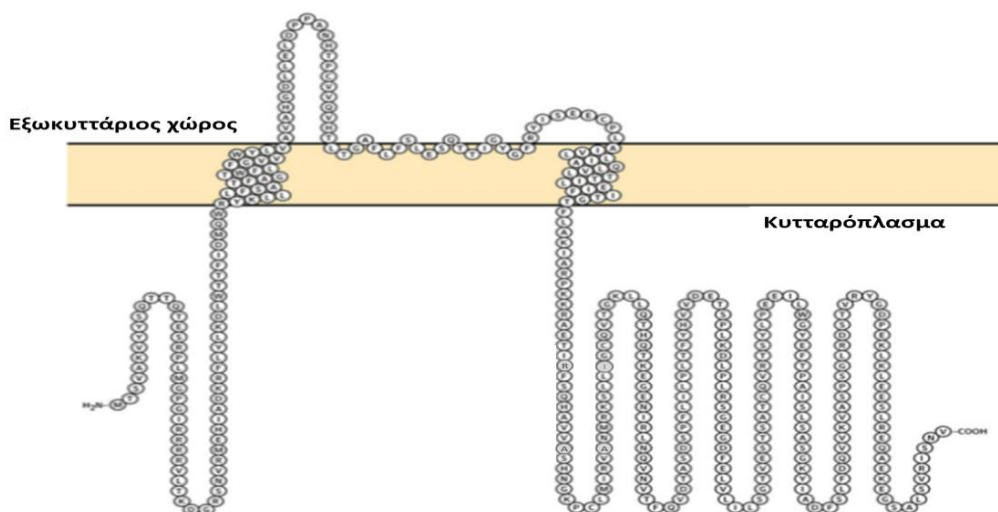
Εικόνα 11: Δομή γονιδίου *KCNT1*. Αναπροσαρμογή από: Heron S. et al.(2012) "Missense mutations in the sodium-gated potassium channel gene *KCNT1* cause severe autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy." *Nat Genet*, Nov;44(11):1188-90, doi: 10.1038/ng.2440.

Ως φαρμακευτική αγωγή προτείνεται η χορήγηση σιριπεντόλης μαζί με βενζοδιαζεπίνες, λεβετιρασετάμη και κετογόνο δίαιτα τα οποία όμως έχουν μέτρια αποτελεσματικότητα στους φαρμακοανθεκτικούς σπασμούς των ασθενών [107]. Η κινιδίνη, η οποία χρησιμοποιείται ως φαρμακευτική αγωγή για αρρυθμίες και μαλάρια, έχει δοκιμαστεί και σε ασθενείς με παραλλαγές του γονιδίου *KCNT1* εξαιτίας της ιδιότητάς της ως αναστολέας διαφόρων τύπων διαύλων καλίου. Τα αποτελέσματα της χορήγησης αρχικά ήταν ενθαρρυντικά με μείωση της επιληπτικής δραστηριότητας

σε μερικούς ασθενείς ωστόσο επιπρόσθετες μελέτες μεγαλύτερου αριθμού ασθενών αποκαλύπτουν μετριοπαθή ανταπόκριση σε αυτήν την αγωγή [106, 107]. Επιπρόσθετα καθώς η κινιδίνη είναι αναστολέας και άλλων διαύλων καλίου και μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη απειλητικών για τη ζωή αρρυθμιών είναι επιτακτική η ανάγκη για την ανάπτυξη μιας φαρμακευτικής ουσίας που να στοχεύει μόνο την πρωτεΐνη KCNT1 [62].

1.2.5.3 Γονίδιο *KCNJ10*

Το γονίδιο *KCNJ10* (potassium channel, inwardly rectifying, subfamily J, member 10) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 1q23.2, κωδικοποιεί τον δίαυλο $K_{ir}4.1$ και εμφανίζει μέγιστα επίπεδα έκφρασης σε εγκέφαλο, οφθαλμούς, έσω ούς (αίθουσα, κοχλίας, ημικύκλιοι σωλήνες) και νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα [110]. Ο δίαυλος αποτελείται από δύο διαμεμβρανικές έλικες, ένα αμινοτελικό, ένα καρβοξυτελικό κυτταροπλασματικό άκρο και έναν εξωκυττάριο βρόχο ο οποίος αναδιπλώνεται ώστε να σχηματίσει τον πόρο - φίλτρο εκλεκτικότητας (Εικόνα 12) [111]. Στον εγκέφαλο και στο έσω ούς λειτουργεί ως ομοτετραμερές ενώ στα νεφρά ως ετεροτετραμερές μαζί με τον $K_{ir}5.1$ που κωδικοποιείται από το γονίδιο *KCNJ16* [111]. Οι δίαυλοι K_{ir} είναι ενεργοποιημένοι όταν το κύτταρο βρίσκεται σε ηρεμία και ο ρόλος τους είναι η διαρροή ιόντων καλίου με σκοπό τον καθορισμό του δυναμικού ηρεμίας του κυττάρου σε συνέργεια με αντλίες νατρίου/καλίου.



Εικόνα 12: Δομή πρωτεΐνης KCNJ10. Αναπροσαρμογή από: Zhang H. et al. (2019) "Novel KCNJ10 Compound Heterozygous Mutations Causing EAST/SeSAME-Like Syndrome

Compromise Potassium Channel Function." *Front Genet*, Nov 8;10:912, doi: 10.3389/fgene.2019.00912.

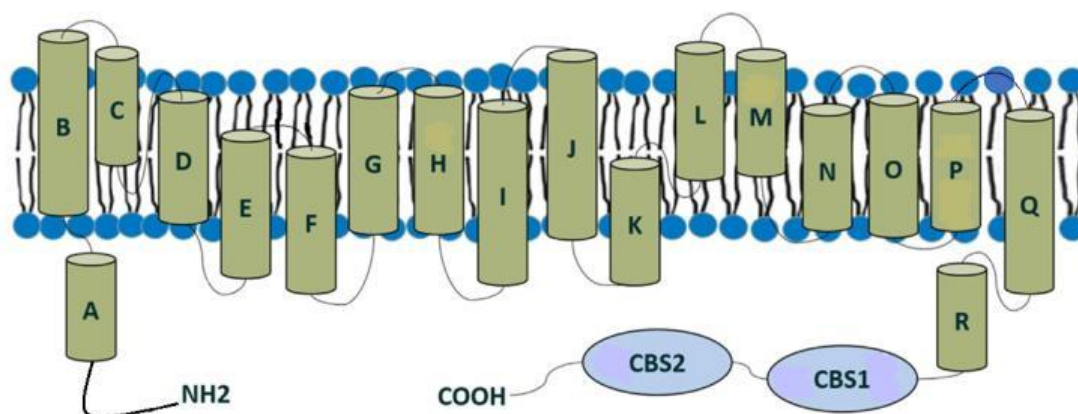
Παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου *KCNJ10* σχετίζονται με την εμφάνιση του αυτοσωμικού υπολειπόμενου συνδρόμου EAST/SeSaME το φαινοτυπικό φάσμα του οποίου περιέχει επιληψία, αταξία, νευροαισθητήρια βαρηκοΐα, διαταραχές ηλεκτρολυτών (μεταβολική αλκάλωση, υπομαγνησαιμία, υπασβεστιουρία και αυξημένη ρενίνη πλάσματος), νοητική υστέρηση και σωληναριοπάθεια [110]. Στην πλειοψηφία των ασθενών το πρώτο σύμπτωμα είναι βρεφικοί σπασμοί οι οποίοι εμφανίζονται λόγω συσσώρευσης ιόντων καλίου στην συναπτική σχισμή που οδηγεί σε διαταραχές της φυσιολογικής διεγερσιμότητας των νευρικών κυττάρων [110]. Οι μαγνητικές εγκεφάλου των ασθενών μπορεί να είναι φυσιολογικές ή να καταδεικνύουν μείωση του όγκου της παρεγκεφαλίδας ή υποπλασία αυτής, ενώ τα ηλεκτροεγκεφαλογραφικά ευρήματα περιέχουν επιβράδυνση του ρυθμού ή συμπλέγματα αιχμής-αιχμηρών κυμάτων [111]. Επιπρόσθετα εκτός από την αταξία μπορούν να παρατηρηθούν και άλλες διαταραχές με παρεγκεφαλιδική συμμετοχή όπως τρόμος και διαταραχές λόγου.

1.2.6 Διαυλοπάθεια χλωρίου

Τα ιόντα χλωρίου είναι τα πλέον άφθονα στον οργανισμό. Στα θηλαστικά έχουν ταυτοποιηθεί 9 γονίδια (*CLC*) που κωδικοποιούν για 5 αντλίες $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ (*CIC 3-7*) στα λυσοσώματα και 4 διαύλους Cl^- (*CIC -1, -2, -Ka, -Kb*) στην κυτταρική μεμβράνη.

Παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές στο γονίδιο *CLCN4* (chloride channel 4) που εδράζεται στη χρωμοσωμική θέση Χρ22.2 και κωδικοποιεί για την αντλία $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ (*CIC 4*) έχουν συσχετισθεί με την εμφάνιση συνδρόμου Raynaud-Claes που περιλαμβάνει φυλοσύνδετη νοητική υστέρηση, σπασμούς και συμπεριφορικές διαταραχές σε άρρενα και θήλεα άτομα [112]. Το γονίδιο *CLCN4* εμφανίζει τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασής του στο νευρικό σύστημα [113] και κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη *CIC-4* που αποτελείται από 18 διαμεμβρανικές α-έλικες και δύο περιοχές CBS (cystathione-β-synthase) (Εικόνα 13) [114]. Η παραγόμενη αντλία είναι ένα ομοδιμερές που απαντάται στα ενδοκυτταρικά κυστίδια και παραμένει στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ωστόσο όταν εκφράζεται ετερόλογα μια μικρή ποσότητά της

φτάνει στην μεμβράνη. Ο ρόλος της είναι η διατήρηση της ιοντικής ομοιόστασης των ενδοσωμάτων καθότι η εισροή ιόντων ασβεστίου και η εκροή πρωτονίων συμβάλουν στην αντιστάθμιση της ηλεκτρικής βαθμίδωσης, που πραγματοποιείται λόγω της δράσης της ATPάσης ασβεστίου του σαρκοενδοπλασματικού δικτύου, και στην πρόσληψη ασβεστίου στο σαρκοενδοπλασματικό δίκτυο [112, 113].



Εικόνα 13: Δομή πρωτεΐνης CLC-4. Αναπροσαρμογή από He H. et al.,(2021) "The molecular and phenotypic spectrum of CLCN4-related epilepsy.", *Epilepsia*, Jun;62(6):1401-1415, doi: 10.1111/epi.16906.

Οι σπασμοί που έχουν καταγραφεί σε ασθενείς με μοριακή βλάβη του γονιδίου *CLCN4* είναι: βρεφικοί, μυοκλονικοί, εστιακοί, γενικευμένοι τονικοκλονικοί ή επεισόδια αφαιρέσεων με ποικίλη ανταπόκριση στην φαρμακευτική αγωγή. Το ΗΕΓ καταδεικνύει εστιακές ή πολυεστιακές αιχμές ή γενικευμένη επιβράδυνση. Η μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου μπορεί να αναδεικνύει περικολιακή λευκομαλακία, διάταση των κοιλιών, καθυστέρηση της μυελίνωσης ή υποπλασία μεσολοβίου. Επιπλέον παρατηρούνται στους ασθενείς βρεφική υποτονία, διαταραχές στη βάρδια, προοδευτική αταξία ή σπαστικότητα, χορείαθétωση, διπολική διαταραχή, κατάθλιψη και αγχώδης διαταραχή [112].

Σε πρόσφατη μελέτη του 2018 με 52 ασθενείς διαπιστώθηκε ότι τα θήλεα με *de novo* παραλλαγές του γονιδίου καθώς και άρρενα άτομα παρουσιάζουν όλα τα ανωτέρω κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου, ενώ θήλεα με κληρονομούμενες παραλλαγές μπορεί να είναι ασυμπτωματικά ή να εμφανίζουν ηπιότερο φαινότυπο. Παρά την μελέτη του προτύπου απενεργοποίησης του χρωμοσώματος X δεν διαπιστώθηκαν διαφορές ανάλογα με την εμφάνιση ή απουσία συμπτωμάτων με

πιθανή αιτία την μελέτη περιφερικού αίματος και όχι πλήττοντα ιστού (εγκέφαλο) [112].

1.3 Νευροαναπτυξιακές και επιληπτικές εγκεφαλοπάθειες της παιδικής ηλικίας

1.3.1 Σύνδρομο Lennox Gastaut (Lennox Gastaut Syndrome, LGS)

Είναι η πιο συχνή μορφή ΑΕΕ και απαντάται σε ηλικίες 1-6 ετών. Χαρακτηρίζεται από πολλαπλά είδη σπασμών με το συχνότερο να είναι τονικοί σπασμοί που μπορεί να συνυπάρχουν με άτυπες αφαιρέσεις, ατονικούς, μυοκλονικούς, γενικευμένους τονικοκλονικούς ή με επιληπτική κατάσταση χωρίς κινητική συμμετοχή. Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά καταγράφονται βραδέα διάχυτα κύματα θήτα και δέλτα με γενικευμένες εκφορτίσεις αιχμής-κύματος ή παροξυσμική δραστηριότητα. Τα διαγνωστικά κριτήρια του συνδρόμου συνοψίζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Σύνοψη διαγνωστικών κριτηρίων συνδρόμου Lennox Gastaut.

Διαγνωστικά κριτήρια συνδρόμου Lennox Gastaut
1. Πολλαπλά είδη φαρμακοανθεκτικών σπασμών με το ένα είδος να είναι τονικοί
2. Γνωσιακές και συμπεριφορικές διαταραχές
3. ΗΕΓ με διάχυτα βραδέα στοιχεία αιχμής-κύματος και γενικευμένη παροξυσμική δραστηριότητα

Συχνά σε αυτήν την κλινική οντότητα μεταπίπτουν ασθενείς με σύνδρομο βρεφικών σπασμών που έχουν επιβιώσει έως την παιδική ηλικία, ωστόσο μπορεί και να περιλαμβάνει και πρότερα υγιή παιδιά. Ως φαρμακευτική αγωγή δίδονται τοπιραμάτη, βαλπροϊκό οξύ, λαμοτριγίνη, βενζοδιαζεπίνες και ρουφιναμίδη. Συμπληρωματικά προτείνεται κετογόνος διαίτα και χειρουργικά έχει δοκιμαστεί η διέγερση του πνευμονογαστρικού νεύρου και άλλες χειρουργικές προσεγγίσεις για το μεσολόβιο. Τέλος σε κλινικές δοκιμές βρίσκεται και η χρήση της κανναβιδιόλης [40]. Η γενετική βάση του LGS εμφανίζει ομοιότητες με αυτήν των βρεφικών σπασμών.

1.3.2 Αναπτυξιακή και/ή Επιληπτική Εγκεφαλοπάθεια με συνεχείς εκφορτίσεις αιχμής-κύματος στη διάρκεια του ύπνου (Developmental and/or Epileptic Encephalopathy with Spike-Wave Activation in Sleep, D/EE-SWAS)

Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι παλαιότερα γνωστές κλινικές οντότητες «Επιληψία με συνεχείς εκφορτίσεις αιχμής-κύματος στη διάρκεια του βραδέως ύπνου» καθώς και το «σύνδρομο Landau Kleffner». Η συνένωση των υποκατηγοριών προτείνεται από τον ILAE σύμφωνα με την νεότερη ταξινόμηση του 2021 γιατί οι ασθενείς εμφανίζουν κοινά φαινοτυπικά και ηλεκτροεγκεφαλογραφικά χαρακτηριστικά.

Η ηλικία έναρξης του συνδρόμου είναι 2 έως 12 ετών με ή χωρίς ιστορικό επιληψίας και νευροαναπτυξιακής καθυστέρησης. Το πιο συχνό είδος σπασμών που καταγράφονται είναι εστιακοί με κινητική συμμετοχή με ή χωρίς διατήρηση του επιπέδου συνειδήσεως καθώς και εστιακής έναρξης με εξέλιξη σε αμφοτερόπλευρους τονικοκλονικούς και τείνουν να παρουσιάζουν ύφεση στην εφηβεία. Τα ηλεκτροεγκεφαλογραφικά ευρήματα κατά την εγρήγορση, εάν υπάρχουν, καταδεικνύουν μη ειδικά ευρήματα όπως εστιακή ή διάχυτη επιβράδυνση του ρυθμού και εστιακές ή πολυεστιακές εκφορτίσεις, ενώ κατά την διάρκεια του ύπνου καταγράφονται «**continuous spike-wave in slow sleep**» δηλαδή διαρκείς επιληπτικές εκφορτίσεις οι οποίες αφορούν >85% του ΗΕΓ κατά τη διάρκεια του βραδέως ύπνου.

Στα συνοδά συμπτώματα περιλαμβάνονται γνωσιακή, συμπεριφορική και κινητική παλινδρόμηση (δυσπραξία, δυστονία) ενώ ακόμα και με πλήρη έλεγχο των σπασμών η γνωσιακή έκπτωση διατηρείται. Επιπρόσθετα οι ασθενείς μπορεί να παρουσιάζουν ακουστική αγνωσία (δεν αναγνωρίζουν κοινότυπους ήχους όπως χτύπημα τηλεφώνου) ή επίκτητη αφασία. Σε γενετικό επίπεδο παθογόνες παραλλαγές ανευρίσκονται στα γονίδια *GRIN2A* και *CNKSR2* [40].

1.3.3 Μυοκλονική-Ατονική επιληψία (Myoclonic-Atonic Epilepsy, MAE)

Σε αυτήν την κατηγορία ανήκει και το παλαιότερα γνωστό σύνδρομο Doose. Αφορά παιδιά ηλικίας 2-6 ετών με αιφνίδια έναρξη φαρμακοανθεκτικών σπασμών που απαρτίζονται από σύντομης διάρκειας μυοκλονίες, φωνητική συμμετοχή και

ατονικά στοιχεία όπως κίνηση κεφαλής ή πτώση. Άλλα είδη που μπορεί να συνυπάρχουν είναι γενικευμένοι τονικοκλονικοί, μυοκλονίες και μη κινητικά επεισόδια επιληπτικής κατάστασης. Με την έναρξη των σπασμών παρατηρείται παράλληλα διακοπή ή παλινδρόμηση της νευροαναπτυξιακής πορείας. Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά μπορεί να καταγραφούν θήτα κύματα ή αιχμές – βραδέα κύματα ή πολυαιχμές – βραδέα κύματα. Παρόλο ότι οι σπασμοί είναι φαρμακοανθεκτικοί συνήθως παρουσιάζουν ύφεση μέσα σε τρία χρόνια από την έναρξη της νόσου αλλά οι ασθενείς εμφανίζουν ποικίλου βαθμού νοητική υστέρηση ακόμα και μετά το πέρας των κρίσεων. Το 1/3 των ασθενών έχει θετικό οικογενειακό ιστορικό για επιληψία ή πυρετικούς σπασμούς [115, 116]. Γονίδια παραλλαγές των οποίων σχετίζονται με την εμφάνιση MAE είναι τα: *SCN1A*, *SCN1B*, *SCN2A*, *STX1B*, *SLC6A1*, *CHD2*, *SYNGAP1*, *NEXMIF*, *KIAA2022* και *SLC2A1*.

1.4 Επιληπτικά σύνδρομα με ποικίλη ηλικία έναρξης

1.4.1 Γενετική Γενικευμένη Επιληψία (Genetic Generalized Epilepsy, GGE)

Σε αυτήν την κατηγορία ανήκει η παλαιότερα γνωστή ως «γενικευμένη ιδιοπαθής επιληψία» και αφορά το 15-20% όλων των επιληψιών [117]. Η ηλικία εμφάνισης συμπτωμάτων είναι 3-25 ετών και οι ασθενείς παρουσιάζουν επεισόδια αφαιρέσεων, μυοκλονίες και γενικευμένους τονικοκλονικούς σπασμούς. Συνήθως παρουσιάζουν καλή ανταπόκριση στην φαρμακευτική αγωγή με το βαλπροϊκό οξύ να είναι αποτελεσματικό σε ασθενείς με γενικευμένους τονικοκλονικούς σπασμούς. Συστήνεται η αποφυγή αποκλειστών διαύλου νατρίου καθώς και άλλων GABAνεργικών παραγόντων καθώς μπορούν να επιδεινώσουν τους σπασμούς ή να οδηγήσουν στην εμφάνιση αφαιρετικών ή μυοκλονικών επεισοδίων επιληπτικής κατάστασης [118-122].

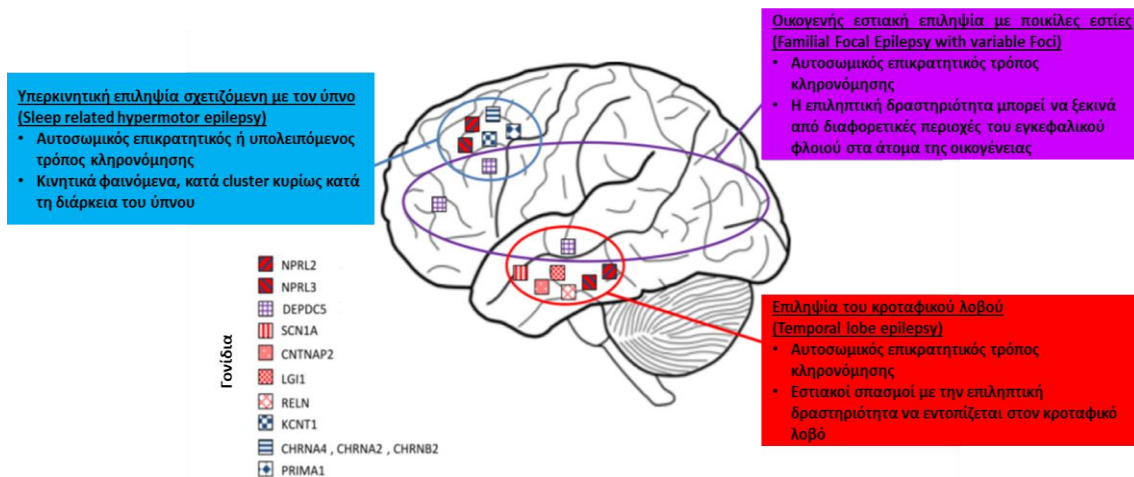
Συχνά καταγράφονται συμπεριφορικές διαταραχές, μαθησιακές δυσκολίες, αγχώδης διαταραχή καθώς και διαταραχή ελλειμματικής προσοχής με συνοδή υπερκινητικότητα. Η μαγνητική εγκεφάλου των ασθενών είναι φυσιολογική ενώ ηλεκτροεγκεφαλογραφικά ανευρίσκονται γενικευμένες εκφορτίσεις αιχμής - κύματος στα 2,5-5,5 Hz. Υποκατηγορίες της γενετικής γενικευμένης επιληψίας είναι οι ακόλουθες διακριτές κλινικές οντότητες:

- αφαιρέσεις της παιδικής ηλικίας (Childhood Absence Epilepsy - CAE),
- αφαιρέσεις της εφηβικής ηλικίας (Juvenile Absence Epilepsy - JAE),
- μυοκλονική επιληψία της εφηβικής ηλικίας (Juvenile Myoclonic Epilepsy - JME),
- γενικευμένοι τονικοκλονικοί σπασμοί χωρίς συνοδά ευρήματα (Generalized Tonic-Clonic Seizures Alone – GTCA).

Γονίδια παραλλαγές των οποίων έχουν συσχετισθεί με την εμφάνιση GGE, είναι τα *GABRG2* (στις αφαιρέσεις της παιδικής ηλικίας), *GABRA1* και *ICK* (στην μυοκλονική επιληψία της εφηβικής ηλικίας) και *SLC2A1* (στις αφαιρέσεις με πρώιμη ηλικία έναρξης κάτω των 4 ετών). Επιπρόσθετα σε ποσοστό 3% των ασθενών ανευρίσκονται μικροελλείψεις στις περιοχές 15q11.2, 15q13.3 και 16p13.11 [3, 123]. Σε ασθενείς με ήπια νοητική υστέρηση και γενετική γενικευμένη επιληψία η ανεύρεση αιτιοπαθολογικού CNV ανέρχεται σε 10% [124].

1.4.2 Σύνδρομα Εστιακής Επιληψίας (Focal Epilepsy Syndromes)

Σε ποσοστό έως 60% των ασθενών με σπασμούς η επιληψία χαρακτηρίζεται ως εστιακή, ενώ οι μισοί περίπου ασθενείς έχουν διάγνωση για το αίτιό της [4]. Κλινικές οντότητες που σχετίζονται με την εμφάνιση εστιακών σπασμών είναι η σχετιζόμενη με τον ύπνο υπερκινητική επιληψία (παλαιότερα γνωστή ως «νυχτερινή επιληψία του μετωπιαίου λοβού»), η επιληψία του κροταφικού λοβού, η επιληψία με ακουστικές διαταραχές και η οικογενής εστιακή επιληψία με πολλαπλές εστίες (Εικόνα 14) [3]. Η μετονομασία της νυχτερινής επιληψίας του μετωπιαίου λοβού σε σχετιζόμενη με τον ύπνο υπερκινητική επιληψία προτείνεται στις νεότερες κατευθυντήριες οδηγίες του ILAE το 2021 με σκοπό την αναγνώριση κινητικών επεισοδίων σπασμών που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια του ύπνου αλλά μπορεί να έχουν έναρξη και σε άλλα σημεία πέραν του μετωπιαίου λοβού.



Εικόνα 14: Τα τρία κυριότερα είδη επιληπτικών εστιακών συνδρόμων με συνοδά στοιχεία για την γενετική αιτιολογία και την τοπολογία της επιληπτικής δραστηριότητας που παρατηρείται στον εγκέφαλο. Αναπροσαρμογή από: Baldassari S. et al.(2016) "GATOR1 complex: the common genetic actor in focal epilepsies." J Med Genet, Aug;53(8):503-10. doi: 10.1136/jmedgenet-2016-103883.

1.4.2.1 Υπερκινητική επιληψία σχετιζόμενη με τον ύπνο (Sleep-related Hypermotor Epilepsy, SHE)

Οι ασθενείς με SHE εμφανίζουν κλάστερ σπασμών κατά τον ύπνο με αιφνίδια έναρξη, σύντομη διάρκεια (<2 λεπτών), διατήρηση του επιπέδου συνειδήσεως και συνοδεία στερεοτυπικού μοτίβου υπερκινητικών ή ασύμμετρων δυστονικών/τονικών κινήσεων. Παράλληλα παρατηρείται συμμετοχή του αυτόνομου νευρικού συστήματος με ταχυκαρδία, ταχύπνοια ή διαταραχές του αναπνευστικού ρυθμού και πιθανή βολβοστροφή και στροφή κεφαλής. Η συχνότητα ανέρχεται σε 1.8 με 1.9 ανά 100.000 άτομα [125] και η ηλικία έναρξης είναι στα πρώτα 20 έτη ζωής με συχνότερη την εμφάνιση σε εφήβους. Οι περισσότεροι ασθενείς δεν εμφανίζουν νοητική υστέρηση και ανταποκρίνονται στην φαρμακευτική αγωγή. Ωστόσο υπάρχουν και ασθενείς με συμπεριφορικές, γνωσιακές ή νευροψυχιατρικές διαταραχές [126, 127]. Η μαγνητική εγκεφάλου συνήθως είναι φυσιολογική, ενώ στο 50% των ασθενών καταγράφεται στο ΗΕΓ κατά τη διάρκεια του ύπνου, επιληπτική δραστηριότητα με εκφορτίσεις αιχμής-κύματος, ρυθμική βραδεία δραστηριότητα ή διάχυτη επιπέδωση στις μετωπιαίες περιοχές [128]. Γονίδια που σχετίζονται με SHE είναι τα *CHRNA4*, *CHRN2*, *CHRNA2*, *KCNT1*, *DEPDC5*, *NPRL2*.

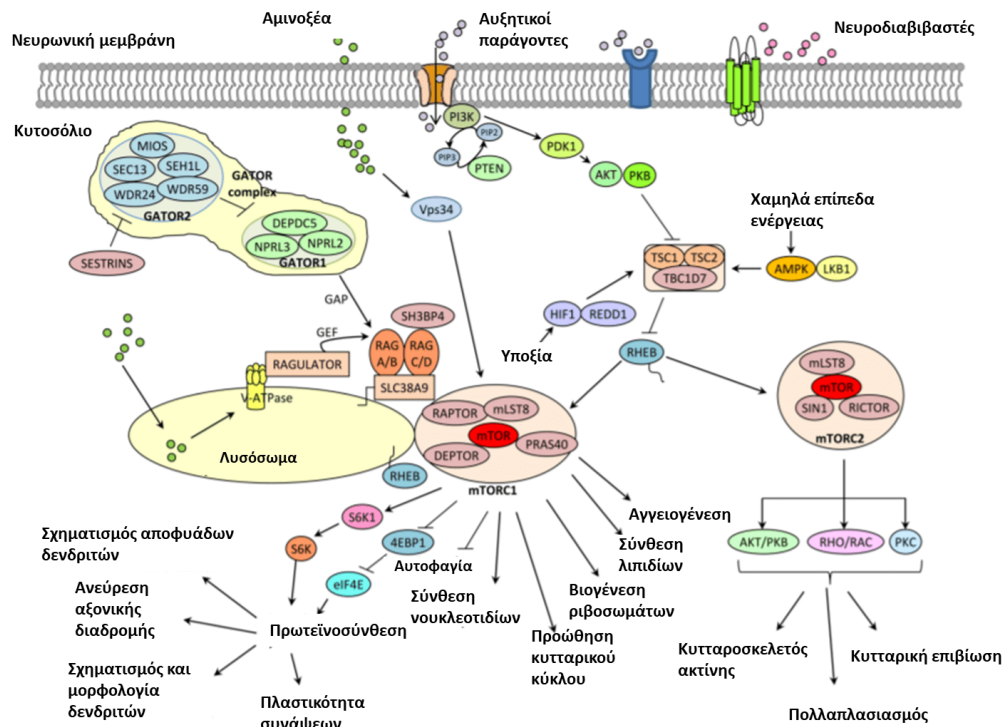
1.4.2.2 Οικογενής εστιακή επιληψία με ποικίλες εστίες (Familial Focal Epilepsy with Variable Foci, FFEVF)

Στην οικογενή εστιακή επιληψία με ποικίλες εστίες καταγράφονται εστιακοί σπασμοί που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές του εγκεφαλικού φλοιού συνήθως μετωπιαίες ή κροταφικές. Η μέση ηλικία εμφάνισης είναι η εφηβική με σπασμούς που μπορεί να είναι κινητικοί, να επηρεάζουν το επίπεδο συνειδήσεως ή να έχουν συμμετοχή του αυτόνομου νευρικού συστήματος [129, 130]. Οι σπασμοί εμφανίζονται τόσο κατά τον ύπνο όσο και σε εγρήγορη ενώ μπορεί να εξελιχθούν από εστιακούς σε αμφοτερόπλευρους τονικοκλονικούς. Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά ανευρίσκονται εστιακές επιληπτικές εκφορτίσεις οι οποίες εντείνονται είτε στη διάρκεια του ύπνου ή είτε ελλείπει του. Η μαγνητική εγκεφάλου μπορεί να είναι φυσιολογική ή να καταδεικνύει εστιακή φλοιϊκή δυσπλασία [131]. Η ανταπόκριση στην φαρμακευτική αγωγή είναι καλή ωστόσο 30% των ασθενών εμφανίζει φαρμακοανθεκτικότητα [132]. Σπάνια καταγράφονται ήπια νοητική υστέρηση και νευροψυχιατρικές διαταραχές [133, 134].

Συνήθως η ύπαρξη εστιακής φλοιϊκής δυσπλασίας συνάδει με την εμφάνιση εστιακών σπασμών και με την ύπαρξη μοριακής βλάβης σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στο μονοπάτι mTOR [4]. Η mTOR (mammalian or mechanistic target of rapamycin) είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης η οποία έχει εξέχοντα ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη, στον πολλαπλασιασμό, στον μεταβολισμό, στον κυτταρικό θάνατο, στην πρωτεϊνσύνθεση και στην μεταγραφή. Στον εγκέφαλο ρυθμίζει την πλαστικότητα των συνάψεων, τη νευρογένεση και την μορφολογία των δενδριτών και των συνάψεων. Αποτελείται από δύο σύμπλοκα, τα mTORC1 και mTORC2.

Το mTORC1 ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη και η δραστηριότητά του επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως η ινσουλίνη, οι αυξητικοί παράγοντες και το οξειδωτικό στρες. Το mTORC1 ρυθμίζεται από το σύμπλοκο GATOR (gap activity toward rags) που αποτελείται από τα GATOR1 και GATOR2. Το σύμπλοκο GATOR1 αποτελείται από τις πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *DEPDC5*, *NPRL2*, *NPRL3* και το GATOR2 από τα *MIOS*, *SEC13*, *SEH1L*, *WDR24*, *WDR59* (Εικόνα 15).

Παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές των γονιδίων του συμπλόκου GATOR1 έχουν συσχετισθεί με διάφορες μορφές εστιακής επιληψίας και με τα μέχρι στιγμής διαθέσιμα δεδομένα αποτελούν τη συχνότερη μοριακή βλάβη με συχνότητα εμφάνισης 9%. Αξιοσημείωτη είναι η μεγάλη φαινοτυπική ετερογένεια ακόμα και στα μέλη της ίδιας οικογένειας [135].



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση μονοπατιού mTOR. Αναπροσαρμογή από: Baldassari S. et al.(2016) "GATOR1 complex: the common genetic actor in focal epilepsies." J Med Genet, Aug;53(8):503-10, doi: 10.1136/jmedgenet-2016-103883.

Μία από τις αποτελεσματικότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις είναι η χειρουργική αντιμετώπιση της επιληψίας η οποία προϋποθέτει την ανεύρεση της δομικής βλάβης στον εγκεφαλικό φλοιό (αφορά το 85% των ασθενών). Σημειώνεται ότι υπάρχει και η υπόθεση των «δυσ χτυπημάτων» (two hit hypothesis) όπου εκτός της ύπαρξης μοριακής βλάβης στο περιφερικό αίμα του ασθενούς πιθανώς να απαιτείται και ύπαρξη δεύτερης βλάβης στο ίδιο ή σε διαφορετικό γονίδιο στον ιστό που πλήττεται για την ανάπτυξη φλοιϊκής δυσπλασίας [135, 136]. Αυτός ο σωματικός και ιστοειδικός μωσαϊκισμός δεν μπορεί να ανιχνευθεί παρά μόνο αν ο γενετικός έλεγχος πραγματοποιηθεί στον πληγέντα ιστό [135].

Γονίδιο *DEPDC5*

Από το σύμπλοκο GATOR1 το γονίδιο *DEPDC5* ήταν το πρώτο του οποίου μοριακές βλάβες συσχετίστηκαν με εμφάνιση εστιακής επιληψίας. Συγκεκριμένα η κλινική εικόνα μπορεί να περιλαμβάνει: νυχτερινή επιληψία του μετωπιαίου λοβού, οικογενή επιληψία του μέσου κροταφικού λοβού, οικογενή εστιακή επιληψία με πολλαπλές εστίες, ρολάνδιο επιληψία καθώς και επιληψία με συνεχείς εκφορτίσεις αιχμής κύματος στη διάρκεια του βραδέως ύπνου [8, 137]. Η ηλικία έναρξης των σπασμών ποικίλει από τη βρεφική ηλικία έως την ενήλικη ζωή ενώ σπανιότερα παρατηρούνται και νευροψυχιατρικές εκδηλώσεις όπως διαταραχές στο αυτιστικό φάσμα, σχιζοφρένεια και νοητική υστέρηση [138].

Το γονίδιο *DEPDC5* (DEP domain-containing protein 5) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 22q12 και εκφράζεται τόσο στον αναπτυσσόμενο όσο και στον ενήλικη εγκέφαλο. Η παραγόμενη πρωτεΐνη αποτελείται από πέντε δομικές περιοχές την αμινοτελική (NTD), την SABA η οποία βοηθά την πρόσδεση με τις πρωτεΐνες των γονιδίων *NPRL2* και *NPRL3*, την SHEN που ενισχύει τη δράση της νουκλεοσιδάσης, την DEP που ρυθμίζει την σύνδεση G-πρωτεϊνών με τους υποδοχείς τους, και την καρβοξυτελική (CTD) (Εικόνα 16) [137].



Εικόνα 16: Δομή πρωτεΐνης DEPDC5. Αναπροσαρμογή από: Wei Z. et al. (2020) "The clinical phenotypes and genetic characteristics of seven epilepsy patients related to heterozygous DEPDC5 variants in China." *Acta Epileptologica* 2, doi:10.1186/s42494-020-0011-9.

Ως επί το πλείστον παραλλαγές εντός της δομικής περιοχής SABA οδηγούν σε φλοιϊκές δυσπλασίες, ενώ εντός της περιοχής SHEN σχετίζονται κυρίως με εμφάνιση εστιακών πυρετικών σπασμών [137]. Το είδος των παραλλαγών που παρατηρείται συχνότερα είναι LOF που αναμένεται να οδηγούν σε αδυναμία καταστολής του συμπλόκου mTORC1 και άρα σε υπερενεργοποίησή του [136]. Ως αποτέλεσμα τα νευρωνικά δίκτυα είτε παρεκκλίνουν κατά τον σχηματισμό τους, είτε τροποποιούνται

εάν έχουν ήδη σχηματιστεί. Οι παραλλαγές του γονιδίου *DEPDC5* ακολουθούν το αυτοσωμικό επικρατητικό πρότυπο κληρονομησης και μπορεί να ανευρίσκονται *de novo* ή να κληρονομούνται. Μεταξύ των μελών μιας οικογένειας μπορεί να παρατηρηθεί φαινοτυπική ετερογένεια [8] και μειωμένη διεισδυτικότητα η οποία υπολογίζεται σε ~66% [136]. Φαρμακευτικά διάφοροι στόχοι αποκλειστές του μονοπατιού του mTOR, όπως η ραπαμικύνη και η εβερολίμη, έχουν χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση της οζώδους σκλήρυνσης και άλλων mTORοπαθειών με ενθαρρυντικά αποτελέσματα [135].

1.4.2.3 Επιληψία με ακουστικά στοιχεία (Epilepsy with Auditory Features, EAF)

Ανήκει στα σύνδρομα εστιακής επιληψίας και αφορά κυρίως ασθενείς εφηβικής ηλικίας με εστιακούς σπασμούς με διατήρηση επιπέδου συνειδήσεως οι οποίοι εμπεριέχουν ακουστικά στοιχεία ή/ και γνωσιακή αφασία. Κατά τη διάρκεια της αφασίας οι ασθενείς δεν μπορούν να κατανοήσουν τον προφορικό λόγο ενώ δεν έχουν χάσει τις αισθήσεις τους. Συνοδευτικά παρατηρούνται ίλιγγος ή διαταραχές του οπτικού πεδίου. Οι σπασμοί μπορεί να ανταποκρίνονται στην φαρμακευτική ενώ δυσμενείς προγνωστικούς δείκτες φαίνονται να αποτελούν η έναρξη σε ηλικία <10 ετών, η παραμονή εστιακών επιληπτικών εκφορτίσεων σε ΗΕΓ καθώς και η ανάπτυξη σύμπλοκων ακουστικών ψευδαισθήσεων [139]. Γονίδια, παραλλαγές των οποίων σχετίζονται με αυτήν την κλινική οντότητα είναι τα *RELN* και *LG11*, και σπανιότερα τα *MICAL1*, *SCN1A*, *DEPDC5*, *CNTNAP2* [140].

1.4.3 Αναπτυξιακές και επιληπτικές εγκεφαλοπάθειες με ποικίλη ηλικία έναρξης

Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι προοδευτικές μυοκλονικές επιληψίες (Progressive Myoclonus Epilepsies – PME). Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του ILAE η διάγνωση προοδευτικής μυοκλονικής επιληψίας τίθεται σε ασθενείς με μυοκλονικούς σπασμούς με ή χωρίς γενικευμένους τονικοκλονικούς σπασμούς και ταυτόχρονη προοδευτική νοητική έκπτωση, προοδευτική επιδείνωση στην κίνηση λόγω των μυοκλονιών, παρεγκεφαλιδική συμμετοχή, επιβράδυνση στο ΗΕΓ (background slowing) και φαρμακοανθεκτικότητα. Η αιτιολογία του νοσήματος μπορεί να είναι νευροεκφυλιστική, μεταβολική ή ανοσολογική. Παρατηρείται συχνότερα σε πληθυσμούς απομονωμένους ή αιμομικτικούς και σχετίζεται με παραλλαγές γονιδίων

που ακολουθούν αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο κληρονόμησης. Τα κυριότερα νοσήματα που σχετίζονται με εμφάνιση PME συνοψίζονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Συχνότερες PMEs και υπεύθυνα γονίδια.

Συχνότερες PMEs	Γονίδια
Νόσος Unverricht-Lundborg	<i>CSTB</i>
Νόσος Lafora	<i>NHLRC1, EPM2A</i>
Νευρωνική κηροειδής λιποφουσκίνωση	<i>TPP1, PPT1, MFSD8, KCTD7, CTSD, CTSE, CLN3, CLN5, CLN6, CLN8, CLN9, GRN, DNAJC5</i>
Σιαλίδωση	<i>NEU1</i>
Μιτοχονδριακά νοσήματα όπως MERRF, MELAS	Ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο του μιτοχονδριακού νοσήματος, όσον αφορά το πυρηνικό DNA κύριο ρόλο έχει το γονίδιο <i>POLG</i>

1.4.3.1 Νόσος Lafora

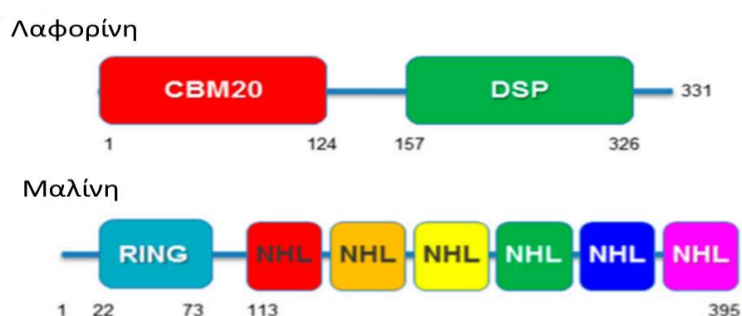
Η νόσος Lafora περιγράφηκε πρώτη φορά το 1911 από τον Ισπανό νευρολόγο Gonzalo Rodriguez Lafora σε ασθενείς με προοδευτική μυοκλονική επιληψία και αμυλοειδή σωματία (σωματία Lafora), που αποτελούνται από μόρια πολυγλυκανών, και αναπτύσσονται στους νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού, του θαλάμου, της ωχρής σφαίρας και της μέλανας ουσίας [141].

Η νόσος Lafora, γνωστή και ως προοδευτική μυοκλονική επιληψία τύπου 2, είναι ένα προοδευτικό νευροεκφυλιστικό αυτοσωμικό υπολειπόμενο νόσημα με έναρξη στην εφηβεία. Παθογόνες παραλλαγές στα γονίδια *EPM2A* και *NHLRC1*, σχετίζονται με την εμφάνιση προοδευτικής μυοκλονικής επιληψίας τύπου 2A και 2B αντίστοιχα.

Το γονίδιο *EPM2A* (laforin) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 6q24.3, αποτελείται από 4 εξόνια και κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη λαφορίνη που είναι φασματάση του κυτταροπλάσματος. Η λαφορίνη αποτελείται από δύο δομικές περιοχές την αμινοτελική CBM20 (Carbohydrate Binding Module family 20) με την οποία προσδένει γλυκογόνο και υδατάνθρακες και την καρβοξυτελική DSP (Dual Specificity Phosphatase) η οποία αποφωσφορυλιώνει φωσφορυλιωμένους

υδατάνθρακες (Εικόνα 17) [142]. Για την σύνδεσή της με τα μόρια γλυκογόνου είναι μονομερής ενώ διμερίζεται για τη δράση της ως φωσφατάση.

Το γονίδιο *NHLRC1* (malin) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 6p22.3 αποτελείται από ένα εξόνιο και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη μαλίνη η οποία είναι μια λιγάση E3 ουβικουϊτίνης που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα. Δομικά αποτελείται από την περιοχή RING (ring type zinc finger) καθώς και έξι περιοχές NHL (Εικόνα 17). Οι περιοχές NHL είναι απαραίτητες για τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (όπως η σύνδεση μαλίνης-λαφορίνης) [143]. Η μαλίνη δρα κυρίως ως μονομερές, φωσφορυλιώνεται από την λαφορίνη, ενώ διμερή μαλίνης-μαλίνης επάγουν την αυτοουβικουϊτίνωσή της. Τόσο η λαφορίνη όσο και η μαλίνη συμμετέχουν στον μεταβολισμό του γλυκογόνου, στην απάντηση των κυττάρων στο οξειδωτικό στρες, στις μεταφραστικές ρυθμίσεις, στον μεταβολισμό μορίων RNA, στην ομοιόσταση των μιτοχονδρίων και στον κυτταρικό θάνατο μέσω του μονοπατιού ουβικουϊτίνης-πρωτεασώματος [144].



Εικόνα 17: Δομικές περιοχές γονιδίων *EPM2A* και *NHLRC1*. Αναπροσαρμογή από: García-Gimeno M.A., et al.(2018) "Lafora Disease: a Ubiquitination-Related Pathology." *Cells*, Jul 26;7(8):87. doi: 10.3390/cells7080087.

Η κλινική εικόνα, που έχει ηλικία έναρξης 6-19 ετών, περιλαμβάνει προοδευτική μυοκλονική επιληψία, τονικοκλονικούς σπασμούς, επεισόδια αφαιρέσεων, συμπεριφορικές διαταραχές, παρεγκεφαλιδική αταξία, αϋπνία, παρουσία σωματίων Lafora στον εγκέφαλο αλλά και σε άλλους ιστούς (όπως στα κύτταρα των δακρυϊκών πόρων) και έκπτωση του επιπέδου συνειδήσεως [145]. Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά καταγράφονται συμπλέγματα αιχμής-κύματος και πολυαιχμές οι οποίες παρουσιάζονται κατά τα φωτεινά ερεθίσματα στα αρχικά

στάδια της νόσου με επακόλουθη επιβράδυνση του ρυθμού και αύξηση των επιληπτικών εκφορτίσεων που συχνά εντοπίζονται στις οπίσθιες περιοχές του εγκεφάλου. Η μαγνητική τομογραφία των ασθενών είναι φυσιολογική ενώ η φασματοσκοπία καταδεικνύει μείωση του λόγου NAA (N-acetylaspartate):κρεατινίνης σε μετωπιαίο φλοιό, βασικά γάγγλια και παρεγκεφαλιδικά ημισφαίρια που φαίνεται να εμφανίζουν μεταβολικές διαταραχές [146].

Το μέσο προσδόκιμο ζωής των ασθενών είναι τα 25 έτη και το συχνότερο αίτιο θανάτου είναι η αναπνευστική ανεπάρκεια. Μετά τα δέκα χρόνια από τη διάγνωση οι μυοκλονίες είναι συνεχόμενες με αποτέλεσμα οι ασθενείς να περιέρχονται σε ανοϊκή ή και σε κωματώδη κατάσταση [144]. Το νόσημα φαίνεται να είναι συχνότερο σε χώρες της Μεσογείου, της Μέσης Ανατολής καθώς και σε πληθυσμιακές ομάδες όπου συχνά απαντάται συγγένεια μεταξύ των γονέων των ασθενών ωστόσο στο σύνολο του πληθυσμού είναι αρκετά σπάνιο με συχνότητα 4/1.000.000 άτομα [145, 147]. Επί του παρόντος η θεραπευτική προσέγγιση για το νόσημα παραμένει συμπτωματική και στοχεύει κυρίως στον έλεγχο των επιληπτικών κρίσεων με τη χρήση βαλπροϊκού οξέος και περαμπανέλης [144].

1.4.3.2 Νόσος Unverricht-Lundborg (Unverricht-Lundborg Disease, ULD)

Η νόσος Unverricht-Lundborg, γνωστή και ως προοδευτική μυοκλονική επιληψία τύπου 1, είναι η πιο συχνή αυτοσωμική υπολειπόμενη προοδευτική μυοκλονική επιληψία με έναρξη σε ηλικίες 7-13 ετών. Η συμπτωματολογία των ασθενών εμπεριέχει μυοκλονικούς σπασμούς, γενικευμένους τονικοκλονικούς ή επεισόδια απώλειας συνειδήσεως. Οι μυοκλονίες μπορεί να προκληθούν με την αφή ή με οπτικά ερεθίσματα και είναι περισσότερο εμφανείς κατά την αφύπνιση. Μετά τα έξι χρόνια από τη διάγνωση σημειώνονται επίσης αταξία και ήπια γνωσσιακή έκπτωση με συνοδό επιδείνωση των μυοκλονιών. Η νόσος σταθεροποιείται νωρίς κατά την ενηλικίωση ωστόσο οι ασθενείς εμφανίζουν τρόμο, δυσαρθρία και δυσφαγία. Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά παρατηρείται επιβράδυνση του ρυθμού και εκφορτίσεις αιχμής-κύματος, ενώ η μαγνητική εγκεφάλου μπορεί αρχικά να είναι φυσιολογική και έπειτα να καταδεικνύει ήπια ατροφία [148].

Το γονίδιο που έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση του νοσήματος είναι το *CSTB* και η μοριακή βλάβη που απαντάται στο 90% των ασθενών είναι η παθολογική επέκταση με 30 ή περισσότερες επαναλήψεις μίας αλληλουχίας δώδεκα νουκλεοτιδίων CCCC GCCCGCG στην 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου. Στο υπόλοιπο 10% ανευρίσκονται σημειακές παραλλαγές εντός του γονιδίου [149].

1.4.3.3 Νευρωνική κηροειδής λιποφουσκίνωση (Neuronal Ceroid Lipofuscinosis, NCL)

Η νευρωνική κηροειδής λιποφουσκίνωση είναι μία ομάδα τουλάχιστον 13 νευροεκφυλιστικών λυσοσωμιακών διαταραχών που χαρακτηρίζονται από συσσώρευση λιπιδίων σε διάφορα όργανα. Ανάλογα με την ηλικία εμφάνισης συμπτωμάτων διακρίνεται σε βρεφική, βρεφική με καθυστερημένη έναρξη, εφηβική και ενήλικη.

Ο συχνότερος τύπος είναι η βρεφική λιποφουσκίνωση με καθυστερημένη έναρξη (NCL τύπου 2) σε ασθενείς ηλικίας 2-4 ετών οι οποίοι εμφανίζουν πολλαπλά είδη σπασμών, πυρετικούς, τονικοκλονικούς, μυοκλονικούς, ατονικούς και εστιακούς. Πριν την έναρξη των σπασμών σημειώνεται καθυστέρηση λόγου, συχνά παρατηρείται απώλεια της όρασης, ενώ μέχρι την ηλικία των 8-12 ετών οι ασθενείς καταλήγουν. Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά υπάρχει φωτοπαροξυσμική απόκριση σε φωτεινά ερεθίσματα και η μαγνητική εγκεφάλου καταδεικνύει παρεγκεφαλιδική ατροφία ή διαταραχές του σήματος της λευκής ουσίας στις οπίσθιες περιοχές του εγκεφάλου [150-152]. Παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου *TPP1* που κληρονομούνται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο ανευρίσκονται στους ασθενείς.

Η λιποφουσκίνωση εφηβικής έναρξης (NCL τύπου 3) είναι συχνή σε ορισμένες γεωγραφικές περιοχές όπως οι Σκανδιναβικές χώρες όπου το 1% των κατοίκων είναι φορείς. Η κλινική πορεία των ασθενών είναι παρόμοια με αυτήν της NCL τύπου 2 ωστόσο η έναρξη παρατηρείται σε άτομα ηλικίας 4-10 ετών και το προσδόκιμο ζωής είναι 13-30 έτη. Οι ασθενείς εκτός από τους σπασμούς εμφανίζουν οπτική ατροφία, μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια και απώλεια οράσεως. Παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου *CLN3* που κληρονομούνται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο ανευρίσκονται στους ασθενείς με το 75% να έχει

έλλειμμα 1.020 βάσεων που περιλαμβάνει τα εξώνια 7 και 8 και το ενδιάμεσό τους ιντρόνιο [153].

1.5 Μιτοχονδριακές αναπτυξιακές και επιληπτικές εγκεφαλοπάθειες

Διαταραχές της λειτουργίας των μιτοχονδρίων σχετίζονται επίσης με την ανάπτυξη επιληψίας με τους σπασμούς επί εδάφους μιτοχονδριακού νοσήματος συνήθως να:

1. εμφανίζουν έναρξη από το οπίσθιο τεταρτημόριο του εγκεφάλου και τον ινιακό λοβό,
2. είναι πιθανότερο να παρουσιάζονται ως επεισόδια επιληπτικής κατάστασης χωρίς κινητική συμμετοχή,
3. χαρακτηρίζονται από φαρμακοανθεκτικότητα από την έναρξή τους,
4. έχουν μικρή συσχέτιση μεταξύ κλινικής εικόνας και ηλεκτροεγκεφαλογραφικών ευρημάτων [154].

Ο μηχανισμός που οδηγεί στην επιληπτογένεση στα μιτοχονδριακά νοσήματα θεωρείται ότι εμπεριέχει διαταραχές στην ομοιόσταση του ασβεστίου, οξειδωση ιοντικών διαύλων και μεταφορέων νευροδιαβιβαστών που επάγεται μέσω δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS- reactive oxygen species), υπερδιεγερσιμότητα λόγω μείωσης του δυναμικού της μεμβράνης και μειωμένη αναστολή λόγω δυσλειτουργίας των ανασταλτικών διάμεσων νευρώνων [154]. Η συνολική συχνότητα μιτοχονδριακών AEE εκτιμάται σε 5-15 ανά 10.000 παιδιά ενώ συχνά συνοδεύονται από νευροαναπτυξιακή καθυστέρηση, μυϊκή αδυναμία, διαταραχές ακοής και όρασης, υποτονία και αταξία που μπορεί να παρουσιάζονται πριν τους σπασμούς [154]. Το γενετικό υπόβαθρο είναι ετερογενές και μπορεί να περιλαμβάνει βλάβες τόσο στο μιτοχονδριακό όσο και στο πυρηνικό DNA.

1.5.1 Γονίδιο *POLG*

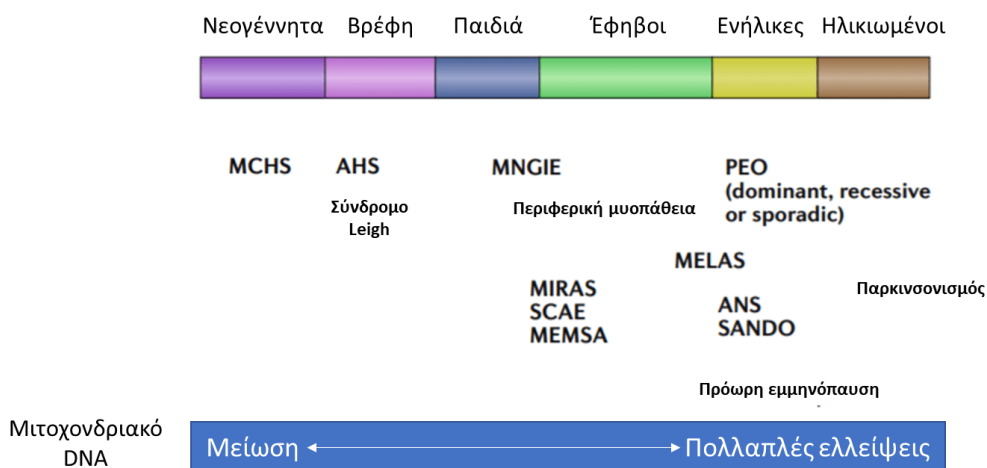
Από το πυρηνικό DNA σημαντικό ρόλο διαδραματίζει το γονίδιο *POLG* (nuclear-encoded mitochondrial DNA polymerase-gamma) που εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 15q26.1 και κωδικοποιεί για την καταλυτική υπομονάδα της μιτοχονδριακής DNA πολυμεράσης γ, η οποία είναι απαραίτητη για την πιστότητα της

αντιγραφής και την επιδιόρθωση του μιτοχονδριακού DNA [155]. Παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου *POLG* ανευρίσκονται σε ποσοστό έως και 10% των ενηλίκων ασθενών με μιτοχονδριακά νοσήματα ενώ η συχνότητα φορέων στον γενικό πληθυσμό εκτιμάται στο 2% [155]. Η πρωτεΐνη του γονιδίου *POLG* αποτελείται από μία αμινοτελική περιοχή με δραστηριότητα εξωνουκλεάσης η οποία μέσω μιας περιοχής σύνδεσης (linker) συνδέεται με την καρβοξυτελική περιοχή η οποία έχει δραστηριότητα πολυμεράσης (Εικόνα 18) [156].



Εικόνα 18: Δομικές περιοχές πρωτεΐνης *POLG*. Αναπροσαρμογή από: Li, L. et al. (2019) "Whole-exome sequencing as a powerful tool for identifying genetic causes in a patient with *POLG*-related disorders and phenylketonuria", *J Int Med Res*, Mar;47(3):1387-1394, doi: 10.1177/0300060518823096.

Οι διαταραχές του γονιδίου *POLG* σχετίζονται με πληθώρα νοσημάτων από τα οποία με επιληψία αναφέρονται τα σύνδρομα μείωσης μιτοχονδριακού DNA (mt depletion), η προοδευτική νευροεκφυλιστική εγκεφαλοπάθεια με φαρμακοανθεκτική επιληψία και ηπατική ανεπάρκεια (**AHS**-Alpers Huttenlocher syndrome), το σύνδρομο **MCHS** (myocerebrohepatorathy syndrome), η μυοκλονική επιληψία με συνοδή μυοπάθεια και αισθητική αταξία (**MEMSA**-myoclonic epilepsy myopathy sensory ataxia), η υπολειπόμενη μιτοχονδριακή αταξία (**MIRAS**- mitochondrial recessive ataxia syndrome) και η αισθητική αταξία, νευροπάθεια, δυσarthρία και οφθαλμοπληγία (**SANDO**-sensory ataxia neuropathy dysarthria and ophthalmoplegia). Άλλες κλινικές οντότητες που σχετίζονται με μοριακές βλάβες του γονιδίου και δεν εμπεριέχουν επιληψία στο φαινοτυπικό τους φάσμα είναι η προοδευτική οφθαλμοπληγία (**PEO**-progressive external ophthalmoplegia) η οποία κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατητικό ή υπολειπόμενο τρόπο, ο παρκινσονισμός και η πρώιμη εμμηνόπαυση [155, 156]. Στην Εικόνα 19 συνοψίζονται όλες οι διαταραχές που σχετίζονται με βλάβες του γονιδίου *POLG* βάσει της ηλικίας έναρξης των συμπτωμάτων.



Εικόνα 19: Διαταραχές συνδεόμενες με μοριακή βλάβη του γονιδίου *POLG* σύμφωνα με την ηλικία έναρξης συμπτωμάτων και τις βλάβες σε επίπεδο μιτοχονδριακού DNA. Αναπροσαρμογή από: Rahman S. & William C. Copeland W. C. (2019) "POLG-related disorders and their neurological manifestations", Nature Reviews Neurology volume 15, pages:40–52, doi:10.1038/s41582-018-0101-0.

Το αυτοσωμικό υπολειπόμενο σύνδρομο Alpers Huttenlocher είναι άμεσα συνδεδεμένο με εμφάνιση ΑΕΕ με την ολοκλήρωση του πρώτου έτους ζωής και η εκτιμώμενη συχνότητά του ορίζεται σε 1 στα 51.000 [154]. Οι ασθενείς συνήθως εμφανίζουν φαρμακοανθεκτικούς σπασμούς, οι οποίοι είναι εστιακοί ή εστιακής έναρξης γενικευμένοι τονικοκλονικοί ή μυοκλονικοί και μπορεί να εξελίσσονται σε επιληπτική κατάσταση. Συχνά απαντάται και η «epilepsia partialis continua» μια οντότητα κατά την οποία οι ασθενείς εμφανίζουν διαρκείς επαναλαμβανόμενες μυοκλονικές κινήσεις, που αφορούν μόνο την μία πλευρά του σώματος με ή χωρίς συνοδή απώλεια συνειδήσεως [154]. Σπάνια καταγράφεται υποτονία πριν την έναρξη της νόσου, ωστόσο με την έναρξη των επιληπτικών κρίσεων παρατηρείται νευροαναπτυξιακή παλινδρόμηση πιθανώς συνοδευόμενη από αταξία, μυοπάθεια, ημικρανίες, οφθαλμοπάρεση και οπτική ατροφία. Η μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου καταδεικνύει εγκεφαλική ατροφία ή αυξημένο T2 σήμα στο θάλαμο. Χαρακτηριστικό είναι το πρότυπο του HEF το οποίο είναι ενδεικτικό για ρυθμικά υψηλής έντασης δ κύματα που επικαλύπτονται από αιχμές ή πολυαιχμές (RHADS-Rhythmic high amplitude delta with superimposed (poly)spikes) σε ασθενείς προ-

εφηβικής ηλικίας [155]. Σε αυτήν την ομάδα ασθενών συστήνεται η αποφυγή του βαλπροϊκού οξέος ως αντιεπιληπτική αγωγή καθώς ενέχεται κίνδυνος ηπατικής ανεπάρκειας και θανάτου [89]. Αν και η ηπατική ανεπάρκεια εμφανίζεται στα τελευταία στάδια του συνδρόμου [154], καθότι το βαλπροϊκό οξύ είναι αναστολέας της β-οξειδωσης των λιπαρών οξέων, που πραγματοποιείται στο ήπαρ, δρα επιβαρυντικά ως προς τα μιτοχόνδρια [155]. Το προσδόκιμο ζωής των ασθενών με AHS είναι μειωμένο λόγω της αυξημένης πιθανότητας αιφνίδιου θανάτου κατά τη διάρκεια κάποιου επιληπτικού επεισοδίου [156].

1.5.2 Ανεπάρκεια της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού οξέος (PDHD)

Το σύμπλοκο της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού οξέος εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και αποτελεί το τελικό προϊόν της γλυκόλυσης όπου και μεταβολίζεται σε γαλακτικό ή ακέτυλοCoA. Η ανεπάρκεια του συμπλόκου οδηγεί σε νευρομυϊκό εκφυλισμό που χαρακτηρίζεται από δομικές παραλλαγές στην MRI εγκεφάλου όπως ατροφία εγκεφάλου, φαρμακοανθεκτικούς βρεφικούς κλονικούς ή εστιακούς σπασμούς, υποτονία, αταξία, μικροκεφαλία, νευροαναπτυξιακή καθυστέρηση και αυξημένο λόγο γαλακτικού προς πυροσταφυλικό. Η κετογόνος δίαιτα, που επάγει την ηπατική μετατροπή των λιπιδίων σε κετονικά σωμάτια που προσφέρονται ως εναλλακτική πηγή ενέργειας στον εγκέφαλο, φαίνεται να είναι αποτελεσματική στην μείωση των επιληπτικών επεισοδίων [154].

Σε μοριακό επίπεδο οι βλάβες που οδηγούν σε ανεπάρκεια της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού οξέος οφείλονται σε βλάβες γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση του λιποϊκού οξέως (γονίδια *LIAS, LIPT1*) και της υπομονάδας E3 (γονίδια *DLD, PDHX*) ή την δραστηριότητα πυροφωσφατάσης της θειαμίνης (γονίδια *PDHA1, SLC25A19, SLC19A3, TPK1*) [154, 157].

1.5.3 Σύνδρομο Leigh

Το σύνδρομο Leigh περιγράφηκε πρώτη φορά το 1952 από τον ομώνυμο νευροψυχίατρο ως υποξεία νεκρωτική εγκεφαλομυελοπάθεια σε βρέφος με αναπτυξιακή παλινδρόμηση, οπτική ατροφία, κώφωση, σπαστικότητα άκρων και

συμμετρικές νεκρωτικές εγκεφαλικές βλάβες ή μαλακύνσεις το οποίο κατέληξε [158]. Αποτελεί τη συχνότερη μιτοχονδριακή νευροεκφυλιστική διαταραχή σε παιδιά με συχνότητα 1 στις 36.000-40.000 γεννήσεις. Οι ασθενείς εμφανίζουν αναπτυξιακή παλινδρόμηση ή υστέρηση, δομικές παραλλαγές όπως αμφοτερόπλευρες συμμετρικές εστίες μειωμένου σήματος στα βασικά γάγγλια ή αυξημένου στο στέλεχος και τα βασικά γάγγλια, υποτονία, δυστονία, σπαστικότητα και φαρμακοανθεκτικούς σπασμούς γενικευμένους ή εστιακής έναρξης με κινητική συμμετοχή. Βιοχημικά παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στο αίμα καθώς και αυξημένα επίπεδα αλανίνης στο πλάσμα. Παράλληλα τα οργανικά οξέα ούρων είναι συμβατά με γαλακτική οξέωση. Οι μοριακές βλάβες αφορούν το σύμπλοκο I της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και μπορεί να εντοπίζονται τόσο στο πυρηνικό όσο και στο μιτοχονδριακό DNA [154, 159, 160].

1.6 ΑΕΕ ως σύμπτωμα γενετικών νοσημάτων

1.6.1 Σύνδρομο Angelman (Angelman Syndrome, AS)

Το σύνδρομο Angelman περιγράφηκε το 1965 από τον ομώνυμο Βρετανό παιδίατρο σε τρεις ασθενείς με σοβαρού βαθμού νοητική υστέρηση, προέχουσα γλώσσα, υποτονία, σπασμούς, αταξία, βραχυκεφαλία, οπτική ατροφία και απρόσφορες εκρήξεις γέλιου που χαρακτήρισε ως «ruppet children» [161].

Η συχνότητα του AS υπολογίζεται σε 1/10.000-1/20.000 άτομα και η μοριακή βλάβη εντοπίζεται στην χρωμοσωμική περιοχή 15q11-q13 που υπόκεινται σε αποτύπωση ώστε να εξασφαλίζεται η μονοαλληλική έκφραση γονιδίων ανάλογα με την γονεϊκή τους προέλευση. Το γονίδιο *UBE3A* (ubiquitin protein ligase E3A) εκφράζεται μόνο από το μητρικής προέλευσης αλληλίο και κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη UBE3A που συμμετέχει σε μηχανισμούς αποδόμησης πρωτεϊνών και όταν απουσιάζει φαίνεται να οδηγεί σε διαταραχές στην ουβικουϊτίνωση των κυττάρων Purkinje στην παρεγκεφαλίδα [162]. Στους ασθενείς με σύνδρομο Angelman μπορούν ταυτοποιηθούν τεσσάρων ειδών μοριακές βλάβες: έλλειμμα στο μητρικής προέλευσης αλληλίο (70%), σημειακή παραλλαγή στο μητρικής προέλευσης

αντίγραφο του γονιδίου *UBE3A* (10%), διαταραχές στο κέντρο αποτύπωσης (3-5%) και πατρική μονογονεϊκή δισωμία (2-7%).

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών περιλαμβάνουν φυσιολογική προ- και περιγεννητική περίοδο που ακολουθούνται από σοβαρή ψυχοκινητική καθυστέρηση, αταξική βάδιση, τρόμο άκρων, συμπεριφορικές διαταραχές με απρόσφορο γέλιο, χαρούμενη συμπεριφορά, υπερκινητικότητα, στερεοτυπικά χτυπήματα χειρών, μειωμένη προσοχή και ελάχιστη ή καθόλου χρήση λόγου [162]. Επιληψία εμφανίζεται σε ποσοστό >80% των ασθενών, ξεκινάει σε ηλικία 1-3 ετών με άτυπες αφαιρέσεις, ατονικές κρίσεις μυοκλονικούς σπασμούς ή μυοκλονικά επεισόδια επιληπτικής κατάστασης και σχετίζεται με χαρακτηριστικό πρότυπο ΗΕΓ με υψηλής τάσης 2-3Hz δραστηριότητα με αιχμές και βραδέα κύματα που παρατηρούνται με το κλείσιμο του οφθαλμού και την παρουσία δ κυμάτων σε ηλεκτροεγκεφαλογραφικές καταγραφές ύπνου [3, 163, 164]. Σπασμοί απαντώνται συχνότερα σε άτομα με ελλείψεις τα οποία παράλληλα εμφανίζουν και τον σοβαρότερο επιληπτικό φαινότυπο [162].

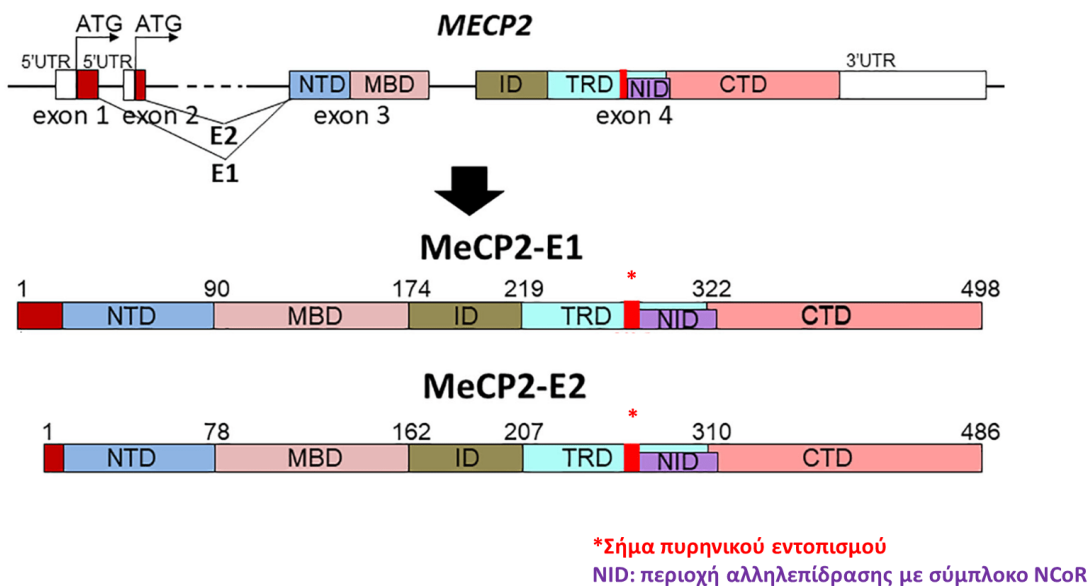
Στο πλαίσιο διαφοροδιάγνωσης άλλα νευροαναπτυξιακά σύνδρομα με παρόμοια κλινική εικόνα είναι τα Rett, Pitt-Hopkins, Christianson και Mowat-Wilson [162].

1.6.2 Σύνδρομο Rett (Rett Syndrome, RS)

Το σύνδρομο Rett αποτελεί σοβαρή νευροαναπτυξιακή διαταραχή, σχετιζόμενη με βλάβες στο γονίδιο *MeCP2* (methyl-CpG-binding protein 2) [165] που εδράζεται στην περιοχή Χq28 και κωδικοποιεί για την συνδεόμενη σε μεθυλιωμένες κυτοσίνες που ανευρίσκονται σε νησίδες CpG πρωτεΐνη 2. Η πρωτεΐνη MECP2 εκφράζεται στους νευρώνες και στα αστροκύτταρα και αποτελεί ρυθμιστή της μεταγραφικής ενεργότητας γονιδίων και της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης [73].

Η πρωτεΐνη MECP2 έχει δύο ισομορφές τις MeCP2-E1 και MeCP2-E2. Καθότι η MeCP2-E2 ανευρέθηκε πρώτη όλες οι παραλλαγές ονομάζονται βάσει αυτής. Η διαφορά στις ισομορφές είναι το κωδικόνιο έναρξης το οποίο στην MeCP2-E1 εντοπίζεται στο εξόνιο 1 ενώ στην MeCP2-E2 στο εξόνιο 2 (Εικόνα 20). Παραλλαγές του εξονίου 1 της MeCP2-E1 απαντώνται εξαιρετικά σπάνια σε ασθενείς ωστόσο σε

αυτήν την ομάδα έχει καταγραφεί μειωμένη παραγωγή της MeCP2-E2. Στον εγκέφαλο μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης έχει η MeCP2-E1 [166]. Δομικά αποτελούνται από τις περιοχές MBD (Methyl CpG Binding Domain) με την οποία συνδέονται με τις μεθυλιωμένες κυτοσίνες, ID (Intervening Domain) με ρόλο στην σταθεροποίηση της περιοχής MBD και στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, TRD (Transcriptional Repression Domain) για τη σύνδεση του σύμπλοκου NCoR/SMRT (Nuclear Receptor Co-Repressor) με το DNA, ώστε να κατασταλεί η μεταγραφή των υποκείμενων γονιδίων, καθώς και αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο.



Εικόνα 20: Δομή πρωτεϊνών MeCP2. Αναπροσαρμογή από: Good, K. et al. (2021) "MeCP2: The Genetic Driver of Rett Syndrome Epigenetics.", Front Genet, Jan 21;12:620859. doi: 10.3389/fgene.2021.620859.

Η συχνότητα του συνδρόμου ανέρχεται σε 1 στα 10.000 με 15.000 θήλεα [167], καθώς σημειακές βλάβες σε άρρεν δεν είναι συμβατές με τη ζωή, με το 95% να εμφανίζει *de novo* σημειακές παραλλαγές και το 5% ελλείμματα ή διπλασιασμούς τμήματος ή ολόκληρου του γονιδίου *MeCP2* [168]. Στο 96% των ασθενών οι σημειακές παραλλαγές αφορούν το πατρικής προέλευσης X χρωμόσωμα [169]. Επιληψία απαντάται στο 60-90% των ασθενών με το 32% να είναι φαρμακοανθεκτικοί. Συχνότερα απαντώνται γενικευμένοι τονικοκλονικοί ή εστιακής έναρξης σπασμοί ωστόσο έχουν παρατηρηθεί και επεισόδια απώλειας συνειδήσεως, μυοκλονίες, ατονικοί ή τονικοί σπασμοί με μέση ηλικία εμφάνισης τα 4 έτη ζωής [170, 171].

Στη διαφοροδιάγνωση του συνδρόμου Rett ανήκουν οι ΑΕΕ που οφείλονται σε παραλλαγές των γονιδίων *CDKL5* και *FOXG1* οι οποίες οδηγούν στην εμφάνιση πρώιμων βρεφικών σπασμών και λοιπών φαινοτυπικών χαρακτηριστικών που προσομοιάζουν την συμπτωματολογία του RS και για τον λόγο αυτό αρχικά είχαν περιγραφεί ως μη τυπική και συγγενής μορφή συνδρόμου Rett αντίστοιχα [168].

1.6.3 Σύνδρομο Ευθραύστου Χ (Fragile X Syndrome, FXS)

Το σύνδρομο Ευθραύστου Χ είναι η πιο συχνά κληρονομούμενη αιτία ΝΥ [172] με τους ασθενείς να εμφανίζουν παράλληλα διαταραχές του αυτιστικού φάσματος (50-70% των ασθενών) ή άλλες νευροψυχιατρικές διαταραχές (Fragile X-Associated Neuropsychiatric Disorders - FXAND, κυρίως σε φορείς προμεταλλάξεων). Από τους ασθενείς το 4-44% θα εμφανίσει επιληψία με πυρετικούς ή απύρετους σπασμούς οι οποίοι μπορεί να είναι σύνθετοι εστιακοί ή με δευτερεύουσα γενίκευση και ανταποκρίνονται επαρκώς στη φαρμακευτική αγωγή [173, 174]. Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά οι ασθενείς στην πλειοψηφία τους εμφανίζουν επιβράδυνση του ρυθμού ή πολυεστιακές επιληπτικές εκφορτίσεις [174].

Το γονίδιο που σχετίζεται με το σύνδρομο του Εύθραυστου Χ είναι το *FMR1* (fragile X messenger ribonucleoprotein) το οποίο εδράζεται στην χρωμοσωμική περιοχή Χq27.3 και κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη FMRP (fragile X mental retardation protein). Η FMRP εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα διαφόρων κυττάρων συμπεριλαμβανομένων και των νευρώνων και ο ρόλος της είναι βασικός για την ανάπτυξη του εγκεφάλου και τη διατήρηση της πλαστικότητας των νευρωνικών συνάψεων. Η δυσλειτουργία της FMRP οδηγεί σε αυξημένη μετάφραση προσυναπτικών και μετασυναπτικών πρωτεϊνών [20]. Στο 99% των ασθενών η μοριακή βλάβη αφορά την τρινουκλεοτιδική επέκταση CGG (>200 φορές) στην 5' αμετάφραστη περιοχή του εξονίου 1 και την επακόλουθη μεθυλίωση και μεταγραφική απενεργοποίηση του γονιδίου. Παθολόγες παραλλαγές ή ελλείμματα του γονιδίου *FMR1* ανιχνεύονται σπάνια και αφορούν το 1% των ασθενών.

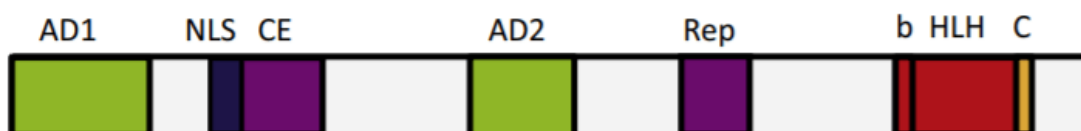
1.6.4 Σύνδρομο Pitt-Hopkins

Το σύνδρομο Pitt-Hopkins περιγράφηκε πρώτη φορά το 1978 σε ασθενείς με νευροαναπτυξιακή καθυστέρηση, μέτρια έως σοβαρού βαθμού νοητική υστέρηση, δυσμορφίες προσώπου και αναπνευστικά προβλήματα. Ειδικότερα παρατηρούνται δυσμορφικά στίγματα όπως ανωδική μεσοβλεφάριος σχισμή, προέχοντα ώτα και ευρύ στόμα. Καταγράφονται επίσης μικροκεφαλία, μεταγεννητική καθυστέρηση της ανάπτυξης, σκολίωση, ψυχοκινητική καθυστέρηση και ποικίλλου βαθμού νοητική υστέρηση που γίνεται εμφανής μετά το πρώτο έτος ζωής. Παράλληλα παρατηρούνται και διαταραχές που εμπίπτουν στο αυτιστικό φάσμα, στερεοτυπίες, και συναισθηματικές μεταπτώσεις από ευχάριστη διάθεση σε επιθετικότητα. Διαταραχές ύπνου όπως αϋπνία, υπνική άπνοια, υπεραερισμός, οφθαλμολογικά προβλήματα (μυωπία και στραβισμός), και συμμετοχή από το γαστρεντερικό σύστημα με χρόνια δυσκοιλιότητα, νόσο Hirschsprung και συστροφή εντέρου συμπληρώνουν την κλινική εικόνα των ασθενών [175, 176].

Επιληψία εμφανίζεται περίπου στο 50% των ασθενών με σύνδρομο Pitt-Hopkins με μέσο όρο έναρξης τα δύο έτη ζωής και συχνότητα από καθημερινή έως σποραδική. Πιο κοινοί είναι οι γενικευμένοι τονικοκλονικοί σπασμοί ή εστιακοί με κινητική συμμετοχή, ενώ σπανιότερα καταγράφονται επεισόδια απώλειας συνειδήσεως και εστιακοί σπασμοί χωρίς κινητική συμμετοχή. Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά παρατηρείται επιβράδυνση του ρυθμού, αποδιοργάνωση ή εστιακές επιληπτικές διαταραχές όπως εστιακά ή πολυεστιακά συμπλέγματα αιχμής-κύματος, αιχμιόμορφα κύματα ή μεμονωμένες εκφορτίσεις με αιχμές. Η μαγνητική εγκεφάλου στους περισσότερους ασθενείς είναι φυσιολογική ενώ στο 30% καταδεικνύει δομική βλάβη του μεσολοβίου, συγκεκριμένα υποπλασία ή αγενεσία με συνοδή διεύρυνση των κοιλιών του εγκεφάλου. Ως φαρμακευτική αγωγή για την επιληψία, σύμφωνα με τα διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα, συνήθως δίδεται συνδυασμός σκευασμάτων ο οποίος μπορεί να εμπεριέχει βαλπροϊκό οξύ, λεβετιρασετάμη, βενζοδιαζεπίνη και λαμοτριγίνη ενώ φαρμακοανθεκτικότητα παρά την αγωγή με πολλαπλά σκευάσματα εμφανίζει το 42% των ασθενών [176].

Το 2007 αποκαλύφθηκε ότι η εμφάνιση συνδρόμου Pitt-Hopkins οφείλεται απλοανεπάρκεια του γονιδίου *TCF4* (transcription factor-4) [177] που εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 18q21.2. Το γονίδιο *TCF4* κωδικοποιεί για τον μεταγραφικό παράγοντα 4 ο οποίος έχοντας ενεργοποιητική δράση συμμετέχει στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του εγκεφάλου και στη νευρωνική διαφοροποίηση [175]. Από την ομάδα μεταγραφικών παραγόντων που ενέχονται στην ανάπτυξη του εγκεφάλου βασικό ρόλο έχει η οικογένεια bHLH (basic helix-loop-helix) και ειδικότερα η υποοικογένεια E-box που εμπεριέχει τις πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *TCF12*, *TCF3* και *TCF4* οι οποίες μέσω ομοδιμερισμού ή ετεροδιμερισμού συνδέονται με το DNA και ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων [178].

Το γονίδιο *TCF4* περιλαμβάνει 7 διακριτές δομικές περιοχές, όπως αυτές αποδίδονται στην Εικόνα 21. [179].



Εικόνα 21: Δομικές περιοχές πρωτεΐνης TCF4.

AD1, AD2: περιοχές ενεργοποίησης, **NLS:** σήματα πυρηνικού εντοπισμού, **CE:** περιοχή καταστολής με ρόλο τη ρύθμιση της δραστηριότητας της AD1, **Rep:** περιοχή καταστολής των AD1 και AD2 και διατήρησης των ομοδιμερών πρωτεϊνών E σε ανενεργή κατάσταση σε ορισμένους ενισχυτές γονιδίων, **b:** βασική περιοχή-μεσολαβητής για τη σύνδεση DNA σε γενωμικές αλληλουχίες E-box, **HLH:** περιοχή απαραίτητη για τον όμο-/έτερο- διμερισμό και **C:** περιοχή απαραίτητη για τον in vivo ομοδιμερισμό. Αναπροσαρμογή από: "The emerging roles of TCF4 in disease and development", Forrest MP (2014), Trends Mol Med, Jun;20(6):322-31. doi: 10.1016/j.molmed.2014.01.010.

De novo παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου *TCF4* κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατητικό τρόπο, ενώ 30% των ασθενών έχουν ελλείμματα ή διπλασιασμούς στην χρωμοσωμική περιοχή που περιλαμβάνεται το γονίδιο *TCF4* [175, 180]. Υπολογίζεται ότι σε ~2% των ατόμων με κλινική διάγνωση συνδρόμου Angelman καθώς και σε 1 στα 81 παιδιά με κλινική διάγνωση συνδρόμου

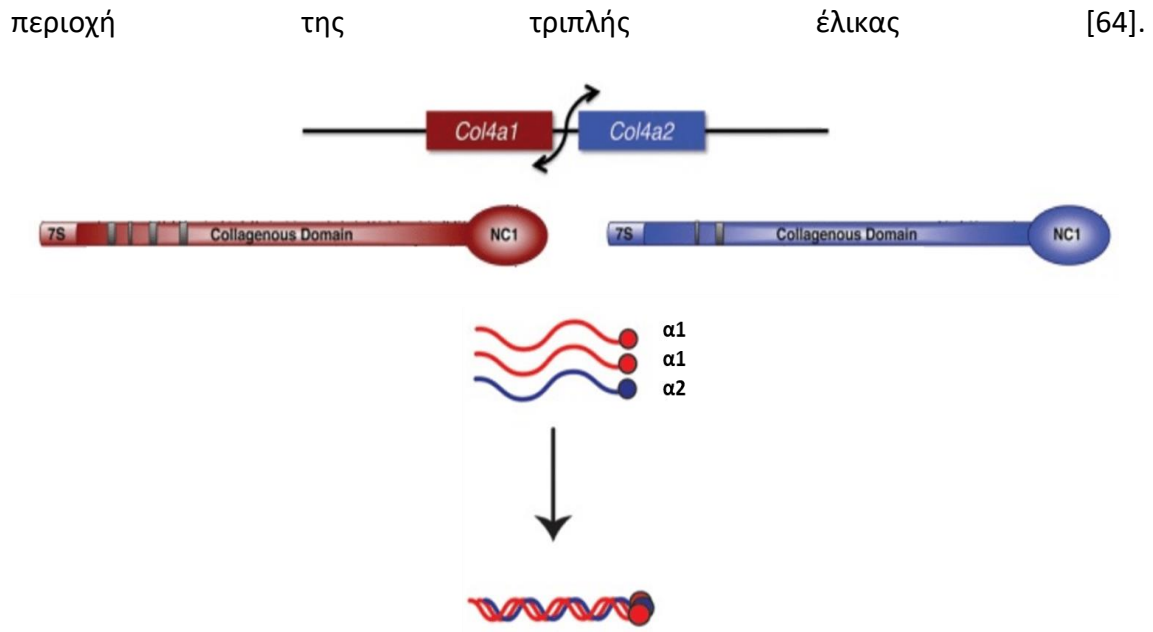
Rett ανιχνεύεται μοριακή βλάβη του γονιδίου *TCF4* [175, 177]. Παράλληλα παραλλαγές των γονιδίων *CNTNAP2* και *NRXN1* οδηγούν σε νοσήματα με κλινική εικόνα που προσομοιάζει το σύνδρομο Pitt-Hopkins (Pitt-Hopkins-like syndromes 1 & 2 αντίστοιχα) [175].

1.7 Άλλες χαρακτηρισμένες ΑΕΕ

1.7.1 Κολλαγονοπάθειες

Η πρωτεϊνική υπερικογένεια των κολλαγόνων απαρτίζεται από 29 μέλη και είναι βασική για τη δημιουργία των συνδετικών ιστών στο ανθρώπινο σώμα. Δομικά αποτελούνται από μια χαρακτηριστική περιοχή τριπλής έλικας που δημιουργείται από τρεις α έλικες και έχει ένα συγκεκριμένο μοτίβο αμινοξικών επαναλήψεων (Gly-X-Y) όπου υπάρχει σταθερά μια γλυκίνη ενώ οι θέσεις X,Y καταλαμβάνονται από άλλα αμινοξέα. Η γλυκίνη παραμένει σταθερά συντηρημένη λόγω της δομής και του μεγέθους της που την καθιστούν το μοναδικό αμινοξύ που μπορεί να χωρέσει στο κέντρο της έλικας. Μέχρι σήμερα πληθώρα παθογόνων ή πιθανώς παθογόνων παραλλαγών σε γονίδια που κωδικοποιούν αλυσίδες διαφορετικών τύπων κολλαγόνων στον άνθρωπο έχουν συσχετισθεί με διάφορες κλινικές εκδηλώσεις που αφορούν τα οστά και την ευθραυστότητα τους, το δέρμα, την ακοή, την όραση, τις αρθρώσεις και την ελαστικότητά τους, τα νεφρά, τους μύες και τον σχηματισμό των αγγείων του εγκεφάλου [181].

Τα γονίδια *COL4A1* (collagen type IV, alpha-1) και *COL4A2* (collagen type IV, alpha-2) εδράζονται στην χρωμοσωμική περιοχή 13q34, κωδικοποιούν για τις α1 και α2 αλυσίδες του κολλαγόνου τύπου IV και εκφράζονται κυρίως στο αγγειακό σύστημα. Δύο α1 και μία α2 αλυσίδα σχηματίζουν ένα ετεροτριμερές απαραίτητο για τη δημιουργία των βασικών μεμβρανών. Κάθε α αλυσίδα αποτελείται από τρεις δομικές περιοχές την αμινοτελική 7S, την καρβοξυτελική NC1 και την περιοχή της τριπλής έλικας THR (Εικόνα 22). Η πλειοψηφία των παραλλαγών που απαντώνται σε ασθενείς αφορά την αμινοξική αντικατάσταση γλυκίνης από άλλο αμινοξύ στη δομική



Εικόνα 22: Δομή πρωτεϊνών COL4A1 και COL4A2 καθώς και δομή του ετεροτριμερούς των βασικών μεμβρανών. Αναπροσαρμογή από: Kuo D. et al. (2012). "COL4A1 and COL4A2 mutations and disease: insights into pathogenic mechanisms and potential therapeutic targets." *Hum Mol Genet.* 2012 Oct 15; 21(R1): R97–R110, Aug 21, doi: 10.1093/hmg/dds346.

Παθολόνες παραλλαγές στα γονίδια *COL4A1* και *COL4A2* έχουν συσχετισθεί με ποικίλης βαρύτητας εγκεφαλοαγγειακή νόσο από θανατηφόρο ενδοπαρεγχυματική αιμορραγία, πορεγκεφαλία έως νόσο των μικρών αγγείων του εγκεφάλου. Χαρακτηριστική για την πλειοψηφία των ασθενών είναι η εμφάνιση επεισοδίων σπασμών που όμως διαφέρουν σε είδος και διάρκεια. Στους ασθενείς καταγράφονται επίσης νευροαναπτυξιακή καθυστέρηση, μικροκεφαλία, σπαστικότητα, δυστονία, υποτονία μετά τη γέννηση, συγγενής καταρράκτης, υδρονέφρωση, αιματοουρία, μυσφαιρινουρία, μυϊκοί σπασμοί και εγκεφαλική αιμορραγία [64, 182], ενώ απεικονιστικά παρατηρούνται περικολιακή λευκοεγκεφαλοπάθεια, απώλεια λευκής ουσίας ή λέπτυνση μεσολοβίου [183]

De novo ή κληρονομούμενες από συμπτωματικό ή ασυμπτωματικό γονέα γονέα παραλλαγές εμφανίζουν αυτοσωμικό επικρατητικό πρότυπο κληρονόμησης με ατελή διεισδυτικότητα και μεγάλη φαινοτυπική ετερογένεια ακόμα και στα μέλη της ίδιας οικογένειας [64]. Σε ασυμπτωματικά άτομα αναφέρεται αυξημένος κίνδυνος

εμφάνιση εγκεφαλικής αιμορραγίας ή αγγειακού ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου ιδιαίτερα αν λαμβάνουν αντιπηκτική αγωγή [183].

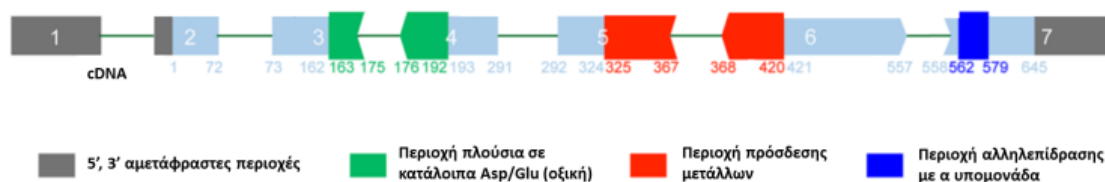
1.7.2 Σπάνια νευροαναπτυξιακά σύνδρομα που σχετίζονται με εμφάνιση ΑΕΕ

1.7.2.1 Σύνδρομο Poirier-Bienvenue - Γονίδιο *CSNK2B*

Το αυτοσωμικό επικρατητικό νευροαναπτυξιακό σύνδρομο Poirier – Bienvenue χαρακτηρίζεται από επιληψία με ή χωρίς νοητική υστέρηση [184]. Ηλεκτροεγκεφαλογραφικές και απεικονιστικές μελέτες με μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου δεν φαίνεται να αποκαλύπτουν χαρακτηριστικά για το σύνδρομο ευρήματα [185]. Κλινικά παρατηρούνται κυρίως γενικευμένοι τονικοκλονικοί σπασμοί σε κλάστερ, με έναρξη 2-12 πρώτων μηνών ζωής και με καλή ανταπόκριση στην φαρμακευτική αγωγή [185]. Ωστόσο έχει αναφερθεί ότι έως και 42% των ασθενών εμφανίζει φαρμακοανθεκτικούς σπασμούς οι οποίοι τείνουν να παρουσιάζουν ύφεση με την πάροδο του χρόνου [186]. Αντίστοιχη φαινοτυπική ετερογένεια μεταξύ των ασθενών καταγράφεται και από την περιγραφή δύο περιπτώσεων με βρεφικούς σπασμούς, ανθεκτικούς στην φαρμακευτική αγωγή και με μετάβαση σε σύνδρομο Lennox-Gastaut. Οι σπασμοί που καταγράφηκαν ήταν κλονικοί ή εστιακοί οι οποίοι μετέπειτα εξελίχθηκαν σε γενικευμένους τονικοκλονικούς και οι ασθενείς είχαν πολύ σοβαρή ψυχοκινητική καθυστέρηση, καθήλωση σε κλινήρη κατάσταση και απεικονιστικά ευρήματα συμβατά με παρεγκεφαλιδική ατροφία [187].

Το 2017 το σύνδρομο συσχετίσθηκε με *de novo* παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές στο γονίδιο *CSNK2B* (casein kinase II, beta) που εδράζεται στη χρωμοσωμική θέση 6p21.33 και κωδικοποιεί για την β υπομονάδα της κινάσης καζεΐνης τύπου 2 (CK2) (Εικόνα 23). Η CK2 είναι μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης η οποία ενέχεται σε πολλές βιολογικές διαδικασίες όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή και η μετάφραση καθώς και σε άλλα μεταβολικά μονοπάτια [185]. Αποσιώπηση του γονιδίου *CSNK2B* οδηγεί σε διαταραχές στην συναπτική μεταβίβαση και στον σχηματισμό δυσμορφικών νευρώνων [188]. Δομικά η CK2 είναι ένα ετεροτετραμερές ένζυμο με δύο α υπομονάδες με καταλυτική δραστηριότητα και δυο β με ρυθμιστικό κυρίως ρόλο. Οι α υπομονάδες είναι δύο ειδών, α και α', οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια *CSNK2A1* και *CSNK2A2* αντίστοιχα. Τα

επίπεδα έκφρασης της CK2 φαίνεται να είναι πολύ υψηλά στον εγκέφαλο όπου και θεωρείται ότι μπορεί να τροποποιήσει το σηματοδοτικό μονοπάτι ντοπαμίνης και να αλληλεπιδρά με τασεοελεγχόμενους διαύλους νατρίου [184].



Εικόνα 23: Δομικές περιοχές πρωτεΐνης CSNK2B. Αναπροσαρμογή από: Li J., et al. (2019) "Germline de novo variants in CSNK2B in Chinese patients with epilepsy." *Sci Rep*, Nov 29;9(1):17909, doi:10.1038/s41598-019-53484-9.

1.7.2.2 ΑΕΕ τύπου 66 - Γονίδιο *PACS2*

Η αναπτυξιακή και επιληπτική εγκεφαλοπάθεια τύπου 66 αποτελεί νευρολογικό νόσημα με έναρξη σπασμών στις πρώτες μέρες με εβδομάδες ζωής. Η επιληψία στην πλειοψηφία των ασθενών ξεκινά ως νεογνική εστιακή και εξελίσσεται σε τονική και γενικευμένη ενώ καταγράφονται και επεισόδια επιληπτικής κατάστασης. Τα ηλεκτροεγκεφαλογραφικά ευρήματα είναι αιχμιόμορφα κύματα αρχικά, ενώ σε μεγαλύτερη ηλικία παρατηρείται επιβράδυνση με ή χωρίς επιληπτόμορφη δραστηριότητα. Πρότυπα όπως υψαρρυθμία ή burst suppression, τα οποία είναι χαρακτηριστικά άλλων εγκεφαλοπαθειών, δεν ανευρίσκονται ενώ η μαγνητική εγκεφάλου συνήθως καταδεικνύει δομικές βλάβες στην παρεγκεφαλίδα [189]. Στο πρώτο έτος ζωής παρατηρείται ανθεκτικότητα στην αντιεπιληπτική αγωγή ενώ μετέπειτα η απόκριση βελτιώνεται [190]. Παράλληλα παρατηρούνται ποικίλλου βαθμού νοητική και ψυχοκινητική υστέρηση, υποτονία, συμπεριφορικές διαταραχές, διαταραχές στο φάσμα του αυτισμού, αναιμία, στερεοτυπίες χειρών, νυσταγμός, αυξημένα αντανακλαστικά, πυραμιδική συνδρομή, ανωμαλίες κάτω άκρων και βάδιση σε ευρεία βάση [189]. Δυσμορφικά στίγματα όπως συνόφρυο, υπερτελορισμός, ευρύ στόμα με γωνίες σε καθοδική πορεία και λεπτό άνω χείλος καταγράφονται επίσης στους ασθενείς [191].

De novo παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου *PACS2* (phosphofurin acidic cluster sorting protein 2) έχουν αναφερθεί σε 16, μέχρι στιγμής, ασθενείς και έχουν συσχετισθεί με την εμφάνιση ΑΕΕ τύπου 66 που κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατητικό τρόπο [190]. Το γονίδιο *PACS2* εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 14q32.33 και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη διαλογής με βασικό ρόλο στην έκφραση των πυρηνικών γονιδίων, στην διατήρηση της ομοιόστασης του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ), στην επικοινωνία μεταξύ ΕΔ και μιτοχονδρίων, στην αυτοφαγία και στην διακίνηση ενζύμων, υποδοχέων και ιοντικών διαύλων καθώς και στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου μέσω αλληλεπίδρασης με το μονοπάτι του p53 [189].

Δομικά αποτελείται από τρεις περιοχές: την περιοχή πρόσδεσης φουρίνης/φορτίου (FBR: Furin/cargo-binding), την ενδιάμεση περιοχή (MR: Middle Region) και την καρβοξυτελική περιοχή (CTR: C-Terminal Region) (Εικόνα 24) [191]. Στους περισσότερους ασθενείς ανιχνεύεται η «hot spot» επανεμφανιζόμενη παραλλαγή την *PACS2:p.Gln209Lys* που φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά την ικανότητα σύνδεσης της περιοχής FBR με άλλες πρωτεΐνες-φορτία. Ως αποτέλεσμα παρατηρούνται πολυεπίπεδες αλλαγές της λειτουργίας των νευρώνων στη διεγερσιμότητα, στην ενδοκυτταρική επικοινωνία, στη νευρογένεση, στη λειτουργία των διαύλων καθώς και στην μετανάστευση των νευρώνων [189].



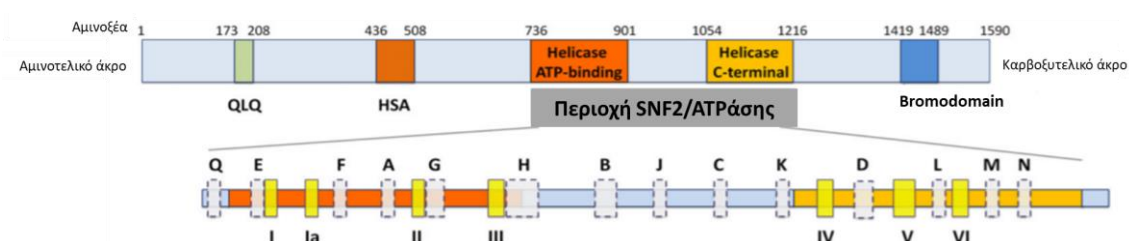
Εικόνα 24: Δομικές περιοχές πρωτεΐνης *PACS2* και τοπολογία της πιο συχνής παθογόνου παραλλαγής. Αναπροσαρμογή από: Olson H. E. et al. (2018) "A Recurrent *De Novo* *PACS2* Heterozygous Missense Variant Causes Neonatal-Onset Developmental Epileptic Encephalopathy, Facial Dysmorphism, and Cerebellar Dysgenesis" *Am J Hum Genet*, May 3;102(5):995-1007, doi: 10.1016/j.ajhg.2018.03.005.

1.7.2.3 Σύνδρομο Nicolaidis-Baraitser - Γονίδιο *SMARCA2*

Το σύνδρομο Nicolaidis-Baraitser περιγράφηκε πρώτη φορά το 1993 από τους ομώνυμους γιατρούς σε ασθενή με σοβαρού βαθμού νοητική υστέρηση, σπασμούς, κοντό ανάστημα, δυσμορφίες προσώπου, αραιό τριχωτό κεφαλής, βραχυδακτυλία και προέχουσες διαφαλαγγικές αρθρώσεις [192]. Το 2012 αποκαλύφθηκε ότι η μοριακή βλάβη στους ασθενείς με αυτήν την κλινική εικόνα ανευρίσκεται το γονίδιο *SMARCA2* (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2) το οποίο εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 9p24.3 και κωδικοποιεί για μία υπομονάδα του εξαρτώμενου από ATP συμπλόκου αναδιαμόρφωσης χρωματίνης (Brahma-associated factor/ BAF complex). Ο ρόλος της υπομονάδας αυτής είναι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω απομάκρυνσης ή μετακίνησης ιστονών όταν το DNA που είναι συσκευασμένο στα νουκλεοσώματα, βρίσκεται σε συμπυκνωμένη κατάσταση. Δυσλειτουργία του γονιδίου *SMARCA2* οδηγεί σε διαταραχές στην ανάπτυξη και στη διαφοροποίηση των κυττάρων, ενώ από μελέτες σε ζωικά μοντέλα έχει αποδειχθεί ότι η ορθή δράση των συμπλόκων BAF είναι καίριας σημασίας για την σωματική, νευρολογική και νοητική ανάπτυξη καθώς και την πλαστικότητα των συνάψεων [193].

Σπασμοί απαντώνται στην πλειοψηφία των ασθενών με σύνδρομο Nicolaidis-Baraitser μετά το πρώτο έτος ζωής και ο συχνότερος τύπος που παρατηρείται είναι οι γενικευμένοι τονικοκλονικοί σπασμοί. Επιπρόσθετα στο 39% των ασθενών το πρώτο επεισόδιο σπασμών φαίνεται να συσχετίζεται με εμπύρετη κατάσταση. Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά οι ασθενείς εμφανίζουν γενικευμένα συμπλέγματα αιχμής-κύματος, επιβράδυνση του ρυθμού ή συνδυασμό αυτών. Η μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου είναι φυσιολογική για την πλειοψηφία των ασθενών ενώ σπάνια καταγράφονται δομικές ανωμαλίες όπως ασυμμετρία των πλαγίων κοιλιών του εγκεφάλου με συνοδή σκλήρυνση υποκάμπου καθώς και μείωση της έντασης του σήματος στη λευκή ουσία. Ως φαρμακευτική αγωγή συνήθως δίδεται συνδυασμός σκευασμάτων ο οποίος μπορεί να εμπεριέχει βαλπροϊκό οξύ, λεβετιρασετάμη, φαινοβαρβιτάλη, τοπιραμάτη και καρβαμαζεπίνη [193] ενώ συχνά καταγράφεται και φαρμακοανθεκτικότητα [192].

Το γονίδιο *SMARCA2* αποτελείται από πέντε δομικές περιοχές που κωδικοποιούν για την αλληλουχία γλουταμίνης-λευκίνης-γλουταμίνης (QLQ), την αλληλουχία HAS (μικρής ελικάσης/που συνδέεται με SANT), την SNF2/ATPάσης που εμπεριέχει τις περιοχές ελικάσης που προσδένει ATP και της καρβοξυτελικής ελικάσης και τέλος την δομική περιοχή bromodomain (αναγνωρίζει ακετυλιωμένα κατάλοιπα λυσίνης τα οποία βρίσκονται στα αμινοτελικά άκρα των ιστονών). Η περιοχή ATPάσης αποτελείται από επτά μοτίβα ελικάσης (I, Ia-VI) και 14 συντηρημένες περιοχές, τις A-N (Εικόνα 25). Οι περισσότερες παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές που παρατηρούνται στους ασθενείς αφορούν την περιοχή αυτή και συγκεκριμένα το μοτίβο VI. Ο υποκείμενος παθογονικός μηχανισμός θεωρείται ότι αφορά ένα «dominant-negative» φαινόμενο ή ενίσχυση λειτουργίας (GOF) [192].



Εικόνα 25: Δομή πρωτεΐνης SMARCA2. Αναπροσαρμογή από: "Phenotype and genotype in Nicolaidis-Baraitser syndrome" Sousa SB et al., (2014) Am J Med Genet C Semin Med Genet, Sep;166C(3):302-14. doi: 10.1002/ajmg.c.31409.

1.7.2.4 ΑΕΕ σχετιζόμενη με το γονίδιο *ATP6V1B2*

Η σχετιζόμενη με παραλλαγές του γονιδίου *ATP6V1B2* (ATPase, H+ transporting, lysosomal, 56/58-kd, V1 subunit B, isoform-2) αναπτυξιακή και επιληπτική εγκεφαλοπάθεια περιγράφηκε για πρώτη φορά ως κλινική οντότητα το 2020 [194]. Περιελάμβανε περιγραφή περιστατικού με νευροαναπτυξιακή κυρίως συνδρομή σε αντίθεση με τα γνωστά και καλά χαρακτηρισμένα σύνδρομα DDOD (Dominant Deafness-Onychodystrophy syndrome) [195], DOORS (Deafness, Onychodystrophy, Osteodystrophy, Retardation and Seizures) και Zimmermann-Laband τύπου 2 (ZLS2) που σχετίζονται επίσης με βλάβες του γονιδίου *ATP6V1B2* [196, 197]. Το σύνδρομο DDOD χαρακτηρίζεται από σοβαρού βαθμού νευροαισθητήρια βαρηκοΐα, απουσία νυχιών και απλασία της μεσαίας φάλαγγας του

πέμπτου δακτύλου χωρίς σημεία νευροαναπτυξιακής καθυστέρησης [195]. Στη διαφοροδιάγνωση του συνδρόμου DDOD εμπίπτει το σύνδρομο DOORS το οποίο αν και οφείλεται κυρίως σε παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου *TBC1D24* και κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο, έχει συσχετισθεί και με το γονίδιο *ATP6V1B2*. Η συμπτωματολογία περιλαμβάνει κώφωση, ονυχοδυστροφία, οστεοδυστροφία, νοητική υστέρηση και σπασμούς [196, 197]. Τέλος το σύνδρομο ZLS2 χαρακτηρίζεται από νοητική υστέρηση, σκολίωση, υπερτρίχωση, βαρηκοΐα, διόγκωση ούλων και απλαστικά ή υποπλαστικά νύχια και τελικές φάλαγγες [198].

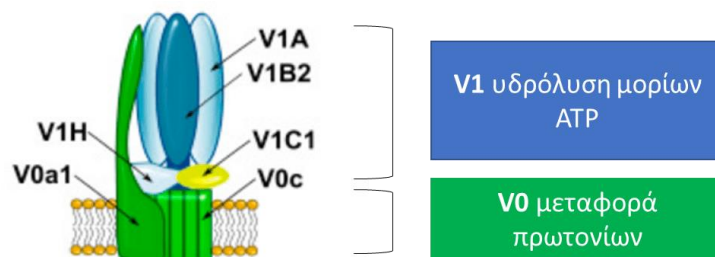
Η πρώτη περιγραφή ασθενούς με βλάβη του γονιδίου *ATP6V1B2* και επιληψία με συνοδή νοητική υστέρηση χωρίς τα υπόλοιπα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των συνδρόμων DDOD, DOORS και ZLS2 πραγματοποιήθηκε το 2017 [199], ενώ ακολούθησαν δύο ακόμα μελέτες, μια που αφορούσε μια μεγάλη οικογένεια με προέχοντα χαρακτηριστικά την επιληψία και τη νοητική υστέρηση και πολύ ήπια κλινική συμπτωματολογία από τα ούλα και τα νύχια [200] και μια για ένα άτομο με διάγνωση AEE και χαρακτηριστικά του συνδρόμου ZLS2 [194]. Από τους ασθενείς αυτούς οι σπασμοί που περιγράφονται είχαν έναρξη σε ηλικίες από 4 μηνών [194] έως 52 ετών [197] και περιλάμβαναν βρεφικούς σπασμούς, γενικευμένους τονικοκλονικούς, επεισόδια απώλειας συνειδήσεως με μυοκλονίες βλεφάρων, ατονικούς και τονικούς. Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά παρατηρήθηκαν γενικευμένες εκφορτίσεις αιχμής-κύματος, συμπλέγματα πολυαιχμής-κύματος, γενικευμένες επιληπτικές εκφορτίσεις [200] και αποδιοργανωμένο πρότυπο με αυξημένα δέλτα και θήτα κύματα κατά την αφύπνιση ή κατά τη διάρκεια του ύπνου [194].

Όσον αφορά τη φαρμακευτική αγωγή το βαλπροϊκό οξύ φαίνεται να ήταν αποτελεσματικό σε αρκετά μέλη της οικογένειας που περιγράφεται από τους Shaw et al.,[200]. Ένα μόνο μέλος, που εμφάνιζε επεισόδια απώλειας συνειδήσεως με μυοκλονίες βλεφάρων καθώς και επιληπτική κατάσταση κατά τη διάρκεια των επεισοδίων της απώλειας, δεν είχε ανταπόκριση σε βαλπροϊκό οξύ, τοπιραμάτη και λαμοτριγίνη ενώ φαίνεται να είχε μικρού βαθμού βελτίωση από τη χρήση αιθουσοξιμίδης. Αντίστοιχα ο ασθενής των Inuzuka et al.,[194] εμφάνιζε καθημερινά κατά την αφύπνιση 2-3 επεισόδια τονικών σπασμών φαρμακοανθεκτικά σε βιγκαμπατρίνη, λεβετιρασετάμη, οξυκαρβαζεπίνη, κλοναζεπάμη, τοπιραμάτη,

βαλπροϊκό οξύ και φαινοβαρβιτάλη. Στους δύο αυτούς ασθενείς αναφέρονται και ευρήματα από τις μαγνητικές τομογραφίες εγκεφάλου, με διόγκωση των υπαραχνοειδών χώρων στις μετωπιαίες περιοχές και μικρές κύστεις στην επίφυση [200] και μείωση του όγκου του εγκεφάλου [194] αντίστοιχα.

Το γονίδιο *ATP6V1B2* εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 8p21.3 και κωδικοποιεί για την υπομονάδα Β της λυσοσωμιακής V-ATPάσης η οποία είναι μία αντλία πρωτονίων που λειτουργεί με υδρόλυση μορίων ATP. Ο ρόλος της αφορά τη διατήρηση του όξινου pH των λυσοσωμάτων η οποία εξασφαλίζει την ενεργότητα των υδρολασών και είναι εξέχουσας σημασίας σε πολλαπλές κυτταρικές διεργασίες όπως η αποικοδόμηση των λυσοσωμάτων και η διακίνηση των συναπτικών κυστιδίων καθώς οι αντλίες πρωτονίων βρίσκονται στις μεμβράνες των ενδοκυτταρικών οργανιδίων [201].

Δομικά η αντλία αποτελείται από τα σύμπλοκα V1 και V0 με το πρώτο να είναι υπεύθυνο για την υδρόλυση μορίων ATP και το δεύτερο να μεταφέρει πρωτόνια. Το σύμπλοκο V1 αποτελείται από τις υπομονάδες A-H , με τρία ζεύγη A-B να σχηματίζουν την κεφαλή και να προσδέουν μόρια ATP, ADP και φωσφορικού, τις υπομονάδες D και F να φτιάχνουν τον περιστροφικό μίσχο και τις υπομονάδες C-E-G-H να φτιάχνουν τον περιστροφικό άξονα (Εικόνα 26). Το σύμπλοκο V0 αποτελείται από τις υπομονάδες a,d,e,c,c' και c'' με συνεπικουρικό ρόλο στη δράση των υπομονάδων του συμπλόκου V1 [201].



Εικόνα 26: Σχηματική απεικόνιση της V-ATPάσης και των συνοδών υπομονάδων της. Αναπροσαρμογή από: Bodzēta A. et al. (2017) "The Presynaptic v-ATPase Reversibly Disassembles and Thereby Modulates Exocytosis but Is Not Part of the Fusion Machinery." Cell Rep, Aug 8;20(6):1348-1359, doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.040.

1.7.2.5 Σύνδρομο PURA - Γονίδιο PURA

Το σύνδρομο PURA αποτελεί νευροαναπτυξιακό νόσημα που χαρακτηρίζεται από ποικίλλου βαθμού ψυχοκινητική καθυστέρηση, υποτονία, επιληψία, αναπνευστική δυσχέρεια, και δυσχέρεια σίτισης που μπορεί σε ορισμένους ασθενείς να χρήζει ρινογαστρικού σωλήνα [202].

Σε μεγάλη μελέτη με 32 ασθενείς με σύνδρομο PURA διαπιστώθηκε ότι όλοι οι ασθενείς είχαν υποτονία εμφανή αμέσως μετά τη γέννηση με συνοδή αναπνευστική δυσχέρεια, μέτρια ή σοβαρού βαθμού ψυχοκινητική καθυστέρηση και σπαστικότητα. Από το 42% των ασθενών που κατάφεραν να περπατήσουν διαπιστώθηκε ασταθής βάδιση σε ευρεία βάση ενώ καταγράφηκαν επίσης στραβισμός, σκολίωση, σιελόρροια, στερεοτυπικές κινήσεις χεριών, δυστονία και μυοπαθητικό προσώπειο. Φαρμακοανθεκτική επιληψία διαγνώσθηκε στο 50% των ατόμων με έναρξη από 6 μηνών έως 15 ετών. Τα είδη σπασμών που παρατηρήθηκαν περιλάμβαναν γενικευμένους τονικοκλονικούς, εστιακούς, τονικούς, αφαιρέσεις καθώς και μυοκλονικούς ατονικούς που με την πάροδο του χρόνου εξελίχθηκαν σε σύνδρομο Lennox-Gastaut. Από τις μαγνητικές εγκεφάλου των ασθενών η συχνότερη παραλλαγή που διαπιστώθηκε ήταν καθυστέρηση μυελίνωσης ενώ παρατηρήθηκαν επίσης διαταραχές της λευκής ουσίας και διεύρυνση των πλαγίων κοιλιών [203].

Στους ασθενείς ανιχνεύονται βλάβες του γονιδίου PURA (purine-rich element-binding protein A) που περιλαμβάνουν παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές του ίδιου του γονιδίου ή μικροελλείμματα της χρωμοσωμικής θέσης 5q31.3 στην οποία εντοπίζεται [202, 204]. Το γονίδιο κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη πρόσδεσης (σε DNA και RNA) A που είναι πλούσια σε πουρίνες και έχει καίριο ρόλο στην μεταγεννητική ανάπτυξη του εγκεφάλου, στην ανάπτυξη των νευρώνων και στη διαφοροποίησή τους, καθώς και στην αντιγραφή και μεταγραφή του DNA και στην μεταφορά μορίων mRNA [205]. Δομικά αποτελείται από το αμινοτελικό άκρο, το καρβοξυτελικό άκρο το οποίο είναι πλούσιο σε κατάλοιπα γλουταμίνης και γλουταμινικού οξέος και την περιοχή επαναλήψεων Pur (PUR I, PUR II, PUR III) οι οποίες είναι συντηρημένες (Εικόνα 27). Οι περιοχές Pur αποσταθεροποιούν την διπλή έλικα του DNA ώστε να προσδεθούν στην μονόκλωνη αλυσίδα-στόχο τους. Ο ρόλος

τους είναι κρίσιμης σημασίας για την μεταγραφή γονιδίων και μπορούν να έχουν ενεργοποιητική ή κατασταλτική δράση [202].



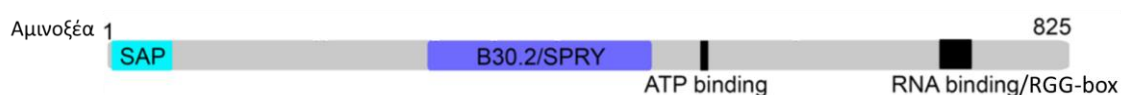
Εικόνα 27: Δομή πρωτεΐνης PURA. Αναπροσαρμογή από: Lalani S. R. et al. (2014). "Mutations in PURA cause profound neonatal hypotonia, seizures, and encephalopathy in 5q31.3 microdeletion syndrome." *Am J Hum Genet*, Nov 6;95(5):579-83. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.09.014.

1.7.2.6 ΑΕΕ τύπου 54 – Γονίδιο *HNRNPU*

Η αναπτυξιακή και επιληπτική εγκεφαλοπάθεια τύπου 54 χαρακτηρίζεται από πρώιμης έναρξης σπασμούς, ψυχοκινητική καθυστέρηση, νοητική υστέρηση, απουσία λόγου, υποτονία καθώς και καρδιολογικές και νεφρολογικές διαταραχές [206]. Οι σπασμοί είναι φαρμακοανθεκτικοί και διαφόρων ειδών όπως πυρετικοί, εστιακοί, μυοκλονικοί, γενικευμένοι τονικοκλονικοί, αφαιρέσεις καθώς και σύνδρομο Lennox-Gastaut. Από την μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου αποκαλύπτονται δομικές παραλλαγές που περιλαμβάνουν αγενεσία μεσολοβίου και διάταση πλαγίων κοιλιών. Στα συνοδά συμπτώματα καταγράφονται μικροκεφαλία, εισέχοντες οφθαλμοί, προέχων μέτωπο, αφεστώτα ώτα, υπερτελωρισμός και οδοντικές αλλοιώσεις [206-209]. Σύμφωνα με μελέτη 21 ασθενών παρατηρούνται ομοιότητες της κλινικής εικόνας με αυτής των συνδρόμων Rett, Pitt-Hopkins, Angelman ή Cornelia de Lange [208] ενώ από το 1994 είναι αναγνωρισμένη η συσχέτιση της νόσου με ελλείμματα ή διπλασιασμούς στην περιοχή του 1q [210] στην οποία το 2012 εντοπίστηκε το γονίδιο *HNRNPU* (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U) [211]. Ασθενείς με παραλλαγές που οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας του γονιδίου *HNRNPU* εμφανίζουν ΑΕΕ τύπου 54 [212].

Το γονίδιο *HNRNPU* εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 1q44 και κωδικοποιεί την ετερογενή πυρηνική ριβονουκλεοπρωτεΐνη U που εκφράζεται στον εγκέφαλο (από την εμβρυϊκή ηλικία), στο ήπαρ, στα νεφρά και στην καρδιά. Οι μικρές πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (small nuclear ribonucleoproteins, snRNPs) U1, U2, U4, U5 και

U6 και άλλες πρωτεΐνες όπως οι ετερογενείς πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, hnRNPs) διαμορφώνουν σύμπλοκο RNA-πρωτεϊνών με κεντρικό ρόλο στην διαδικασία του ματίσματος [206]. Σε κυτταρικό επίπεδο η πρωτεΐνη HNRNPU φαίνεται να συμμετέχει σε λειτουργίες όπως η απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X, η γενωμική σταθερότητα, η ρύθμιση του μήκους των τελομερών και η οργάνωση της μεταγραφής [208]. Δομικά αποτελείται από τις περιοχές πρόσδεσης DNA/RNA που ονομάζεται SAP, αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης που ονομάζεται B30.2/SPRY, πρόσδεσης ATP και πρόσδεσης RNA η οποία συμβολίζεται και ως «RGG-box» και είναι πλούσια σε κατάλοιπα γλυκίνης και αργινίνης (Εικόνα 28) [206, 208].



Εικόνα 28: Δομικές περιοχές πρωτεΐνης HNRNPU. Αναπροσαρμογή από: Bramswig N. C. et al. (2017) "Heterozygous HNRNPU variants cause early onset epilepsy and severe intellectual disability." *Hum Genet*, Jul;136(7):821-834, doi:10.1007/s00439-017-1795-6.

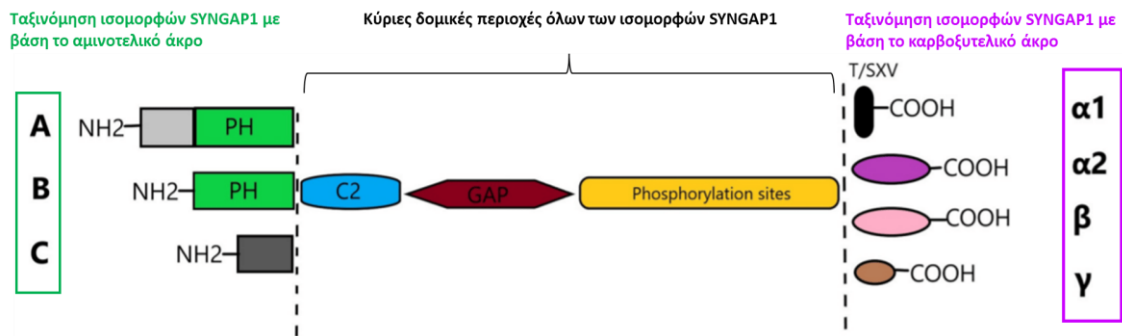
1.7.2.7 ΑΕΕ σχετιζόμενη με το γονίδιο *SYNGAP1*

Η ΑΕΕ- *SYNGAP1*, γνωστή ως «***SYNGAP1* εγκεφαλοπάθεια**» αποτελεί διακριτή αναπτυξιακή και επιληπτική εγκεφαλοπάθεια με χαρακτηριστική την παρουσία παραλλαγών στο γονίδιο *SYNGAP1* και την εμφάνιση ψυχοκινητικής καθυστέρησης πριν την έναρξη των σπασμών [213]. Ειδικότερα η κλινική εικόνα των ασθενών περιλαμβάνει ΝΥ μετρίου έως σοβαρού βαθμού, ψυχοκινητική καθυστέρηση εμφανή μέσα στα δύο πρώτα έτη ζωής, διαταραχές λόγου (με το 1/3 των ασθενών να έχει απουσία λόγου) και συμπεριφοράς, αυξημένη αντοχή στον πόνο, αυτιστικά στοιχεία, αυτοτραυματισμούς, υποτονία, αταξία, αστάθεια βάδισης καθώς και διαταραχές ύπνου.

Όσον αφορά την επιληψία απαντώνται πολλαπλά φαρμακοανθεκτικά είδη σπασμών με ηλικία έναρξης 3 μηνών έως 7 ετών με πιο κοινούς τους αφαιρετικούς τυπικούς ή άτυπους που συνοδεύονται από βλεφαροκλονίες καθώς και μυοκλονικές αφαιρέσεις. Η διάρκειά τους είναι μικρή ωστόσο μπορούν να συμβούν πολλαπλές

φορές μέσα στην ημέρα και φαίνεται να εμφανίζουν καλύτερη ανταπόκριση στο βαλπροϊκό οξύ, στην λαμοτριγίνη, στην τοπιραμάτη και στην κλοβαζάμη [22]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στο 36% των ασθενών καταγράφεται η επιληπτική ακολουθία που ξεκινά ως βλεφαροκλονία και εξελίσσεται σε μυοκλονία και πτώσεις ή σε ατονικούς σπασμούς, ακολουθία χαρακτηριστική και για άλλα γνωστά σύνδρομα τα Jeavons (βλεφαροκλονίες και αφαιρέσεις) και Doose. Το ΗΕΓ των ασθενών καταδεικνύει γενικευμένες εκφορτίσεις αιχμής-κύματος (>3Hz) κατά τη διάρκεια των βλεφαροκλονιών και αιχμή - βραδύ κύμα κατά την διάρκεια των μυοκλονιών και των ατονικών σπασμών αντίστοιχα [213]. Υπολογίζεται ότι 2-8% των ατόμων με σποραδική ΝΥ φέρουν παραλλαγή του γονιδίου *SYNGAP1* και η συχνότητα του νοσήματος είναι παρόμοια με αυτήν του Ευθραύστου Χ [22].

Το γονίδιο *SYNGAP1* (synaptic Ras GTPase activating protein 1) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 6p21.32 και κωδικοποιεί συναπτική πρωτεΐνη 1 που ανήκει στην υπεροικογένεια πρωτεϊνών RAS. Λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής μικρών G πρωτεϊνών όπως οι Ras και Rap και ρυθμίζει την συναπτική δραστηριότητα ελέγχοντας τον εντοπισμό των υποδοχέων AMPAR στην μετασυναπτική μεμβράνη [22]. Εκφράζεται κυρίως στις συνάψεις των διεγερτικών νευρώνων και έχει εξέχοντα ρόλο στην ανάπτυξη, δομή, λειτουργία και πλαστικότητά τους [213]. Στον εγκέφαλο έχουν αναγνωρισθεί διάφορες ισομορφές της πρωτεΐνης οι οποίες εντοπίζονται σε διαφορετικά τμήματά του. Με βάση το αμινοτελικό άκρο υπάρχουν τρεις ισομορφές ενώ με βάση το καρβοξυτελικό τέσσερις (Εικόνα 29). Οι κύριες δομικές περιοχές της παραγόμενης πρωτεΐνης εντοπίζονται στην μεσότητά της σε όλες τις διαφορετικές ισομορφές και είναι τρεις: η περιοχή C2 η οποία προσδένει ιόντα Ca^{2+} , η περιοχή GAP που ενεργοποιεί GTPάσες των Ras και Rap πρωτεϊνών καθώς και η περιοχή φωσφορυλίωσης για κατάλοιπα σερίνης και τυροσίνης η οποία πραγματοποιείται μέσω πρωτεϊνικών κινασών. Το είδος των παραλλαγών που απαντάται στους ασθενείς είναι απώλειας λειτουργίας που οδηγεί σε απλοανεπάρκεια. Στο 60% των περιπτώσεων απαντώνται παραλλαγές αλλαγής του πλαισίου ανάγνωσης ή δημιουργίας πρώιμου κωδικονίου λήξης, στο 30% ματίσματος ή παρερμηνεύσιμες και στους υπόλοιπους μικροέλλειμμα της περιοχής 6p21.3 [22]. Η ανεύρεση της μοριακής βλάβης εντός των εξονίων 1-4 σχετίζεται με ηπιότερη κλινική συμπτωματολογία [213].



Εικόνα 29: Δομικές περιοχές πρωτεϊνών SYNGAP1. Η περιοχή PH (plekstrin homology) είναι βασική για τον εντοπισμό των πρωτεϊνών στην μεμβράνη, ενώ η περιοχή T/SXV διαμεσολαβεί τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Αναπροσαρμογή από: Agarwal M. et al. (2019) "SYNGAP1 mutations: Clinical, genetic, and pathophysiological features." *Int J Dev Neurosci*, Nov;78:65-76, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2019.08.003.

1.7.2.8 ΑΕΕ σχετιζόμενη με το γονίδιο *AFF3*

Η συσχέτιση παραλλαγών του γονιδίου *AFF3* με νευροαναπτυξιακές διαταραχές εδραιώθηκε το 2021 με την περιγραφή 15 ασθενών που εμφάνιζαν νοητική υστέρηση, αναπτυξιακή καθυστέρηση, δυσμορφικά στίγματα, σκελετικές δυσπλασίες, πεταλοειδείς ή υποπλαστικούς νεφρούς και σπασμούς. Από αυτούς οι 14 διεγνώσθησαν με ΑΕΕ, με σπασμούς που περιλάμβαναν γενικευμένους τονικοκλονικούς και σπανιότερα εστιακούς και μυοκλονίες ενώ καταγράφηκαν επίσης στερεοτυπίες, αταξία και πτώσεις. Η ηλικία έναρξης κυμαινόταν από 3 μηνών έως 5 ετών και σε τρεις ασθενείς αναφέρεται φαρμακοανθεκτικότητα παρά τα πολλαπλά σχήματα. Η μαγνητική τομογραφία ήταν ενδεικτική για ατροφία εγκεφάλου, διαταραχές του μεσολοβίου ή παχυγυρία [214]. Στην πρώτη ασθενή που περιγράφηκε το 2008 αναφέρονται σκελετικές δυσπλασίες, υποπλασία ονύχων, μυοκλονίες από την ηλικία των 3 εβδομάδων, επεισόδια άπνοιας, αμφίβολα έξω γεννητικά όργανα και ψυχοκινητική καθυστέρηση που κατέληξε σε ηλικία τεσσάρων μηνών. Η νεκροψία κατέδειξε πεταλοειδείς νεφρούς και από τον μοριακό έλεγχο αναδείχθηκε *de novo* έλλειμμα 500kb που εμπεριείχε μόνο το γονίδιο *AFF3* [215]. Μία δεκαετία αργότερα, η αποκάλυψη *de novo* σημειακής παραλλαγής εντός του γονιδίου σε ασθενή με σκελετικές δυσπλασίες, υποπλαστικούς νεφρούς και σοβαρή ψυχοκινητική

καθυστέρηση ενίσχυσε την συσχέτιση νευροαναπτυξιακής διαταραχής με το γονίδιο *AFF3* [216].

Το γονίδιο *AFF3* (AF4/FMR2 family, member 3) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 2q11.2 και κωδικοποιεί για έναν μεταγραφικό παράγοντα της οικογένειας ALF που αποτελείται από τέσσερα συνολικά μέλη *AFF1-4*. Δομικά αποτελούνται από πέντε ομόλογες περιοχές, την αμινοτελική NHD, την ALF η οποία αλληλεπιδρά με λιγάσες ουβικουϊτίνης και ελέγχει την πρωτεϊνική αποδόμηση, την πλούσια σε κατάλοιπα σερίνης περιοχή ενεργοποίησης TAD, την αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού NLS και την καρβοξυτελική περιοχή που περιλαμβάνει οκτώ ελικάσες CHD και μετέχει στον ομο- ή ετερο- διμερισμό των πρωτεϊνών AFF (Εικόνα 30). Λειτουργικά ενέχονται στην μεταγραφή άλλων γονιδίων που δρουν στη νευρογένεση και σε αναπτυξιακές διεργασίες (όπως οι ιστόνες και η οικογένεια *HOX*) ενώ ειδικά η πρωτεΐνη *AFF3* φαίνεται, μέσω της πρόσδεσής της σε διαφορετικά μεθυλιωμένες περιοχές, να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που υπόκεινται σε αποτύπωση όπως το *XIST* [214].

Στον υποκινητή του γονιδίου *AFF3* υπάρχει μια πολυμορφική αλληλουχία με επαναλαμβανόμενα τρινουκλεοτίδια CGG. Επέκταση της επανάληψης σε πρότυπο σωματικού μωσαϊκισμού επάγει την υπερμεθυλίωση του γονιδίου στο ΚΝΣ και σχετίζεται με την εμφάνιση νοητικής υστέρησης σε οικογένειες [214].



Εικόνα 30: Δομή γονιδίων *AFF*. Αναπροσαρμογή από: Voisin N., et al. (2021). "Variants in the degron of *AFF3* are associated with intellectual disability, mesomelic dysplasia, horseshoe kidney, and epileptic encephalopathy." *Am J Hum Genet*, May 6;108(5):857-873, doi: 10.1016/j.ajhg.2021.04.001.

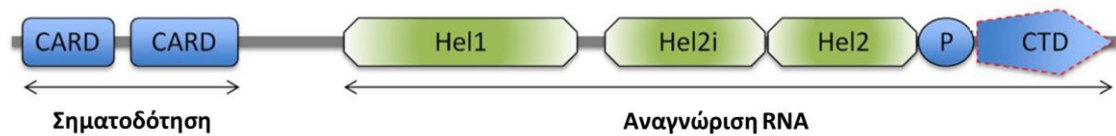
1.8 Νευροανοσολογικά Σύνδρομα και ΑΕΕ

Γονίδιο *IFIH1*

Παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου *IFIH1* (interferon-induced helicase C domain-containing protein 1) έχουν συσχετισθεί με την εμφάνιση των νευροανοσολογικών αυτοσωμικών επικρατητικών συνδρόμων Aicardi Goutieres

τύπου 7 και Singleton-Merten τύπου 1. Το σύνδρομο Aicardi Goutieres 7 συγκαταλέγεται στις εγκεφαλοπάθειες και χαρακτηρίζεται από αποτιτανώσεις των βασικών γαγγλίων και διαταραχές της λευκής ουσίας του εγκεφάλου. Εν αντιθέσει το σύνδρομο Singleton-Merten 1 χαρακτηρίζεται από αορτικές αποτιτανώσεις, οστεοπενία, οστεόλυση των φαλάγγων των άκρων και οδοντιατρικές διαταραχές όπως καθυστέρηση της έκφυσης οδόντων ή πρώιμη απώλειά τους [217]. Παραλλαγές που οδηγούν σε ενίσχυση της λειτουργίας του γονιδίου (GOF) έχουν ως αποτέλεσμα την λανθασμένη αναγνώριση των νουκλεϊκών οξέων του οργανισμού σαν ιικά μόρια και τελικά στην δημιουργία αυτοφλεγμονής η οποία ονομάζεται Ιντερφερονοπάθεια τύπου 1. Αν και οι GOF παραλλαγές αναμενόταν να σχετίζονται με σύνδρομο Singleton-Merten 1 από την αναλυτική περιγραφή περισσότερων ασθενών η κλινική εικόνα του νοσήματος επεκτάθηκε ώστε να περιλαμβάνει και νευροανοσολογικούς φαινοτύπους. Χαρακτηριστική είναι η μεγάλη ετερογένεια της κλινικής εικόνας όπου είναι δυνατόν να παρατηρούνται σπαστική παραπάρεση, παλινδρόμηση, σύνδρομο σπαστικότητας- δυστονίας και διαταραχές της λευκής ουσίας και καθώς και τα φαινόμενα ατελούς διεισδυτικότητας που καταγράφονται σε πολλές οικογένειες [218].

Το γονίδιο *IFIH1* εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 2q24.2 και κωδικοποιεί για τον κυτταροπλασματικό υποδοχέα MDA5 ο οποίος εντοπίζει ιικά μόρια RNA με διπλή έλικα και ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι της ιντερφερόνης 1 για την καταπολέμησή τους [218]. Η παραγόμενη πρωτεΐνη αποτελείται από τις περιοχές CARD (Caspase Activation Recruitment Domain), Hel 1-2 (Helicase 1-2), Hel2i (Helicase 2 insertion), P (Pincer/bridge) και CTD (C-Terminal Domain) [219]. Οι περιοχές CARD ενεργοποιούν τις πρωτεΐνες MAVS (Mitochondrial AntiViral Signaling proteins), οι ελικάσες προσδένονται σε μόρια RNA και υδρολύουν μόρια RNA σε αντιδράσεις εξαρτώμενες από ATP. Η Hel2i είναι ένθετη περιοχή μεταξύ των δύο ελικασών, η P δρα ως γέφυρα συνδέοντας την Hel2 με την CTD και η CTD μπορεί επίσης να προσδένει μόρια RNA (Εικόνα 31) [219, 220].



Εικόνα 31: Δομικές περιοχές πρωτεΐνης IFIH1. Αναπροσαρμογή από: Zaki M. et al. (2017) "Recurrent and Prolonged Infections in a Child with a Homozygous IFIH1 Nonsense Mutation." *Front Genet*, Sep 22;8:130, doi: 10.3389/fgene.2017.00130.

1.9 Νευροεκφυλιστικά νοσήματα και ΑΕΕ

Νόσος Krabbe – Γονίδιο *GALC*

Η νόσος Krabbe είναι μία σπάνια γενετική διαταραχή που επηρεάζει την μυελίνη των νευρικών κυττάρων στον εγκέφαλο και σε όλο το νευρικό σύστημα. Μπορεί, ανάλογα με την ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων, να κατηγοριοποιηθεί σε τέσσερις υποτύπους, τον πρώιμο βρεφικό (0-13 μηνών), τον μεταγενέστερο βρεφικό (13-36 μηνών), τον εφηβικό (3-16 ετών) και τον ενήλικο (>16 ετών). Η βρεφική μορφή της νόσου είναι η πιο συχνή και έχει μειωμένο προσδόκιμο ζωής. Η κλινική εικόνα περιλαμβάνει ψυχοκινητική καθυστέρηση, σπασμούς, ευερεθιστότητα, κώφωση, τύφλωση και σπαστικότητα. Το ΗΕΓ είναι αποδιοργανωμένο και η μαγνητική εγκεφάλου αποκαλύπτει απομυελίνωση στο στέλεχος και στην παρεγκεφαλίδα [221, 222]. Η εμφάνιση της αυτοσωμικής υπολειπόμενης νόσου Krabbe σχετίζεται με παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου *GALC* (glycosylceramidase) που εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 14q31.3 και κωδικοποιεί για την λυσοσωμική υδρολάση γαλακτοκερεβροζιδάση η οποία συμμετέχει στον καταβολισμό των σφιγγολιπιδίων. Σε περίπτωση δυσλειτουργίας της παρατηρείται αδυναμία διάσπασης λιπιδίων, κυτταροτοξική συσσώρευση ψυχωσίνης στα ολιγοδενδροκύτταρα και στα κύτταρα Schwann στο κεντρικό και περιφερικό σύστημα με επακόλουθη αναστολή της μυελίνωσης και κατ' επέκταση απομυελίνωση και νευροεκφυλισμός [221].

1.10 Ο ρόλος του μωσαϊκισμού στη διάγνωση ασθενών με επιληπτικά σύνδρομα

Ως μωσαϊκισμός ορίζεται η συνύπαρξη δύο κυτταρικών πληθυσμών ταυτόχρονα σε ένα άτομο και αφορά έναν κυτταρικό πληθυσμό που φέρει μια παραλλαγή και έναν που δεν την φέρει. Η παραλλαγή πιθανότατα συνέβη κάποια στιγμή μετά τη δημιουργία του ζυγωτού σε κάποιο στάδιο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Τα κύτταρα που προκύπτουν από αυτήν την μιτωτική διαίρεση θα εμφανίζουν αυτήν την παραλλαγή και τελικά θα έχουμε ένα πληθυσμό κυττάρων που θα έχει την παραλλαγή. Αυτός ο κυτταρικός πληθυσμός μπορεί να βρίσκεται στον ίδιο ή σε διαφορετικούς ιστούς ανάλογα με το στάδιο της ανάπτυξης στο οποίο συνέβη αυτή η παραλλαγή.

Σε ασθενείς με AEE οι οποίοι παρέμειναν αδιάγνωστοι διαπιστώθηκαν παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές που ερμήνευαν τον φαινότυπο σε ποσοστό έως και 3% μετά την επανάλυση των δεδομένων τους ή την επανάληψη της διαγνωστικής μεθόδου σε δείγματα από άλλους ιστούς όπως αίμα ή σάλιο. Ιδανικά για την διάγνωση ιστοειδικού μωσαϊκισμού σε ασθενείς με AEE θα χρειαζόταν βιοψία εγκεφάλου ωστόσο επειδή αυτό δεν είναι εφικτό, η αναζήτηση παθογόνων παραλλαγών σε γονίδια που σχετίζονται με την κλινική εικόνα ακόμα και όταν εμφανίζουν χαμηλή συχνότητα/αναγνώσεις θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως διαγνωστική προσέγγιση [65].

1.11 Επιγενετικές αλλοιώσεις και AEE

Ο ρόλος των επιγενετικών τροποποιήσεων όπως η μεθυλίωση του DNA ή οι τροποποιήσεις των ιστονών είναι ήδη γνωστό ότι είναι ο κύριος μηχανισμός εκδήλωσης συμπτωμάτων σε νοσήματα αποτύπωσης όπως τα σύνδρομα Angelman, Prader Willi, Silver Russell και Beckwith Wiedemann. Η επιγενετική έχει κρίσιμο ρόλο στη νευρωνική λειτουργία από τα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης και της ανάπτυξης του εγκεφάλου έως τον καθορισμό της ιστοειδικής έκφρασης των γονιδίων.

Η μεθυλίωση του DNA δεν αλλάζει την αλληλουχία του ωστόσο μέσω της χημικής τροποποίησης που επιφέρει αλλάζει το πρότυπο της έκφρασής του. Σε

δείγματα βιοψίας εγκεφάλου ασθενών με επιληψία του κροταφικού λοβού διαπιστώθηκε υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *RELN* και επακόλουθη μείωση της έκφρασής του. Άλλες διαταραχές που σχετίζονται με την μεθυλίωση και οδηγούν στην εμφάνιση νευροαναπτυξιακών νοσημάτων είναι σημειακές παραλλαγές εντός των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις μεθυλοτρανσφεράσες (DNA methyltransferases – DNMTs) οι οποίες καταλύουν την μεθυλίωση του DNA και μεθυλιώνουν κυτοσίνες στο 5' άκρο νησίδων δινουκλεοτιδίων CG [223].

Οι ιστόνες είναι πυρηνικές πρωτεΐνες που συνδέονται με το DNA και καθορίζουν τη δομή της χρωματίνης μέσω μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων. Βασικές κυτταρικές διεργασίες που ρυθμίζουν είναι η γονιδιακή έκφραση, η επιδιόρθωση του DNA, η μείωση και η μίτωση. Δύο βασικοί μηχανισμοί δράσης τους είναι η μεθυλίωση και η ακετυλίωση. Μέσω της μεθυλίωσης καταλοίπων λυσίνης ή αργινίνης επιτυγχάνεται η σύνδεση ρυθμιστικών πρωτεϊνών που επηρεάζουν τη δομή της χρωματίνης. Με τα διαθέσιμα επιστημονικά δεδομένα δεν υπάρχουν νευροαναπτυξιακά νοσήματα που σχετίζονται με την μεθυλίωση αργινών, εν αντιθέσει, με τη μεθυλίωση λυσινών, η οποία επιτυγχάνεται με τη δράση μεθυλοτρανσφερασών, και σχετίζεται με τα σύνδρομα Sotos, Kabuki και Wiedemann-Steiner. Ο μηχανισμός που οδηγεί σε νόσο για τις μεθυλοτρανσφεράσες λυσίνης φαίνεται να ενέχει και τη δράση άλλων ρυθμιστικών πρωτεϊνών σε συγκεκριμένα σημεία στην χρωματίνη με τελικό αποτέλεσμα τη διακοπή της σύνδεσης του συμπλόκου των ιστονών με το DNA [224].

Η ακετυλίωση των ιστονών διεξάγεται από τις ακετυλοτρανσφεράσες και αφορά κατάλοιπα λυσινών. Τα κατάλοιπα αυτά εντοπίζονται στο αμινοτελικό άκρων των ιστονών, είναι θετικά φορτισμένα και ικανά να πραγματοποιήσουν ισχυρή σύνδεση με το DNA, το οποίο είναι αρνητικά φορτισμένο. Το τελικό προϊόν αυτής της σύνδεσης είναι η αλλαγή της δομής χρωματίνης σε ετεροχρωματίνη και κατ' επέκταση η μεταγραφική αποσιώπηση των γονιδίων. Η ακετυλίωση των καταλοίπων λυσίνης, «εξουδετερώνει» το θετικό φορτίο και οδηγεί σε αδύναμες ηλεκτροστατικές επιδράσεις μεταξύ ιστονών και DNA και τελικά σε ευχρωματίνη. Αντίθετα η απακετυλίωση σχετίζεται με την μετατροπή της ευχρωματίνης σε ετεροχρωματίνη [224]. Παραδείγματα νευροαναπτυξιακών συνδρόμων που σχετίζονται με τη

δυσλειτουργία ακετυλοτρανσφερασών λυσίνης αποτελούν τα σύνδρομα Arboleda-Tham και Li-Ghorgani-Weisz-Hubshman.

Μικρά μη κωδικοποιούντα μόρια RNA που αναφέρονται ως micro-RNAs έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζουν των μετάφραση σε γονίδια - στόχους τους κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου ελέγχοντας την μετάφραση και ή την σταθερότητα των μορίων mRNA μέσω πρόσδεσης στις 3' αμετάφραστες περιοχές τους. Η συνεισφορά των μορίων αυτών είναι στη δημιουργία συνάψεων, στη δένδριτογένεση και στην ωρίμαση των νευρώνων [223].

Το εύρος των επιγενετικών μηχανισμών στην παθογένεια των ΑΕΕ δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο ωστόσο έχει αποδειχθεί ότι επιγενετικές αλλοιώσεις προωθούν την γενωμική αστάθεια και τον σχηματισμό παραλλαγών. Όπως στην περίπτωση νησίδων CG που υπόκεινται σε μεθυλίωση και την αντικατάσταση της κυτοσίνης από θυμίνη. Παράλληλα οι χρωμοσωμικές μεταθέσεις ή οι αναστροφές επηρεάζονται επίσης από επιγενετικά φαινόμενα της εκάστοτε χρωμοσωμικής περιοχής [223]. Σύμφωνα με τα διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα μια *de novo* διαταραχή μεθυλίωσης πιθανόν να είναι η επιληπτογόνος αιτία σε ποσοστό 5-10% των ασθενών [225].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα εργασία αποτελεί μια προσπάθεια χαρτογράφησης του γενετικού τοπίου της επιληψίας με την ταυτοποίηση αιτιοπαθογόνων παραλλαγών, την άμεση συσχέτισή τους με συγκεκριμένες κλινικές εικόνες, και την ανάδειξη νέων στοιχείων και χαρακτηριστικών που θα επιτρέπουν τον χαρακτηρισμό των διαφορετικών βιολογικών μονοπατιών και των επικείμενων μηχανισμών επιληπτογένεσης.

Στο πλαίσιο αυτό μελετήθηκαν ασθενείς που παραπέμπονται για διερεύνηση σπασμών αγνώστου αιτιολογίας, με ή χωρίς συνοδά ευρήματα όπως ψυχοκινητική καθυστέρηση, και η πιο περίπλοκη ομάδα αφορά τους ασθενείς με έναρξη διαφόρων τύπων σπασμών στη βρεφική και νεογνική ηλικία, και φτωχή ψυχοκινητική ανάπτυξη.

Συνοπτικά, στους άμεσους στόχους της εργασίας περιλαμβάνονται:

1. Η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός αιτιοπαθογόνων παραλλαγών:
 - A. σε επιλεγμένα γονίδια όπως τα *ARX*, *CDKL5*, *FOXG1*, *SCN1A* και *POLG* στο πυρηνικό DNA με αλληλούχηση κατά Sanger και
 - B. στο σύνολο των εξονικών περιοχών του γονιδιώματος με αλληλούχηση επόμενης γενιάς (WES, Whole Exome Sequencing).
2. Η καταχώρηση νέων παραλλαγών σε βάσεις δεδομένων σύμφωνα με την παθολογικότητά τους, η συσχέτισή τους με νόσους και η καταγραφή φαινοτυπικής ετερογένειας που περιλαμβάνει νέα κλινικά στοιχεία ακόμα και για ήδη γνωστά γενετικά νοσήματα.
3. Η αναζήτηση νέων σχέσεων γονοτύπου-φαινοτύπου ή/και η αναγνώριση άγνωστων γενετικών τόπων και μηχανισμών που εμπλέκονται στην επιληπτογένεση.
4. Η μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης του χρωμοσώματος X στις περιπτώσεις ανίχνευσης παραλλαγών σε φυλοσύνδετα γονίδια σε θήλεα άτομα.
5. Η επακόλουθη επιβεβαίωση της κλινικής διάγνωσης των ασθενών αλλά και την ανίχνευση φορέων παθογόνων παραλλαγών με στόχο την έγκαιρη και ορθή γενετική συμβουλευτική για την εξέλιξη και την πρόληψη της νόσου στις οικογένειες των

ασθενών αλλά και την επιλογή της καταλληλότερης φαρμακευτικής αγωγής και θεραπευτικής προσέγγισης από το θεράποντα ιατρό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

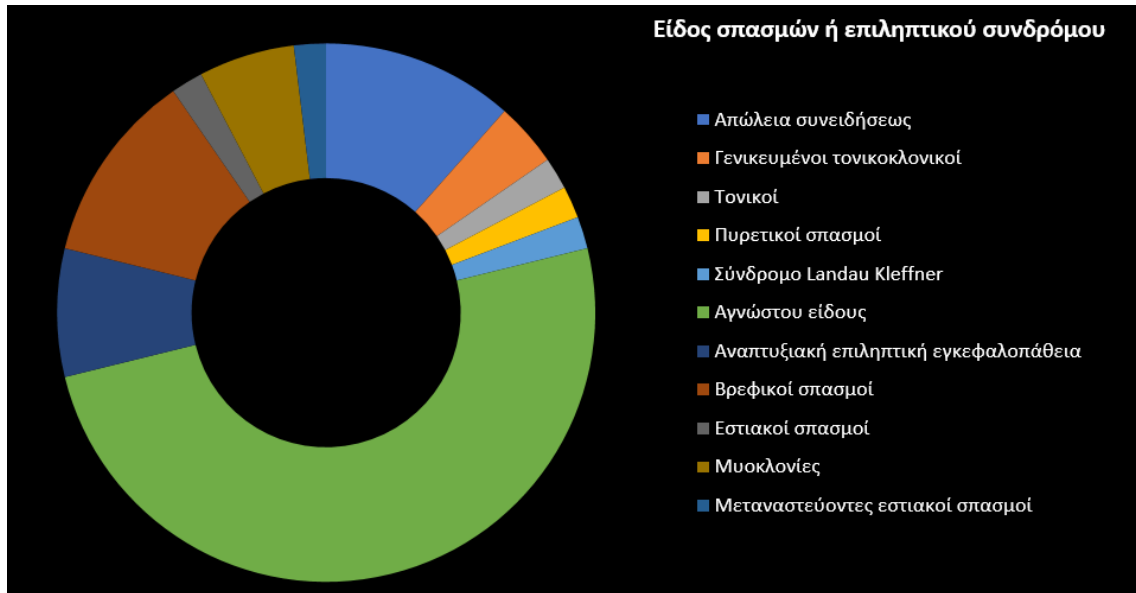
3.1 Υλικό Μελέτης

Η παρούσα μελέτη, η οποία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, περιλαμβάνει ασθενείς οι οποίοι παραπέμφθηκαν για γενετική αξιολόγηση από παιδίατρους, παιδονευρολόγους και νευρολόγους ενηλίκων από όλες τις νοσοκομειακές μονάδες της Ελλάδας κατά τη χρονική περίοδο 2016-Μάιος 2022.

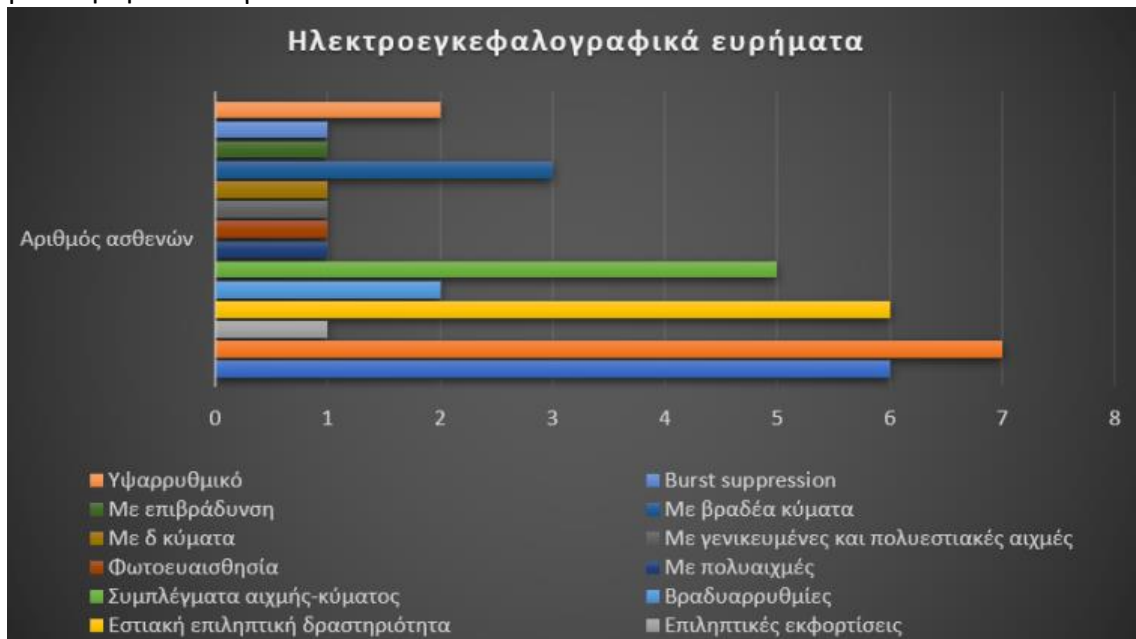
Για την μελέτη του γονιδίου *MECP2* αναλύθηκαν συνολικά 122 δείγματα εκ των οποίων τα 115 (100 θήλεα και 15 άρρενα) για την ανεύρεση σημειακών παραλλαγών και 62 (45 θήλεα και 17 άρρενα) για την ανίχνευση ελλειμμάτων ή διπλασιασμών τμήματος ή ολόκληρου του γονιδίου. Η μέση ηλικία των εξεταζόμενων ήταν οι 71 μήνες (εύρος 3 μήνες έως 24 έτη). Τα κλινικά χαρακτηριστικά που καταγράφηκαν ήταν ψυχοκινητική καθυστέρηση στο 80,32% (98/122), παλινδρόμηση κεκτημένων ικανοτήτων στο 19,67% (24/122), μικροκεφαλία στο 35,25% (43/122), στερεοτυπίες στο 26,23% (32/122), διαταραχές στο φάσμα του αυτισμού στο 18,85% (23/122), υποτονία στο 18,85% (23/122), αταξία στο 9,83% (12/122), στραβισμός στο 3,27% (4/122), υπερτονία στο 4,09% (5/122), αυτοτραυματισμοί στο 8,19% (10/122), σιελόρροια στο 2,45% (3/122), συμπεριφορικές διαταραχές στο 6,55% (8/122), αστάθεια βάδισης στο 3,27% (4/122), πλαγιοκεφαλία στο 1,64% (2/122) και βαρηκοΐα στο 1,64% (2/122). Παράλληλα υπήρξαν και μοναδικά περιστατικά με ημιπληγία, τριγωνοκεφαλία, κρanioσυνοστέωση, αιμαγγειώματα και ψευδαισθήσεις. Θετικό οικογενειακό ιστορικό αναφέρθηκε στο 4,09% (5/122) με 3 άτομα να έχουν αδελφό με αναπτυξιακή και επιληπτική εγκεφαλοπάθεια, 1 άτομο αδελφή με επιληψία και 1 άτομο αδελφό με ψυχοκινητική καθυστέρηση. Σπασμούς εμφάνιζε το 42,62% των ασθενών (52/122). Το είδος των σπασμών καθώς και τα ηλεκτροεγκεφαλογραφικά και απεικονιστικά ευρήματα των ασθενών συνοψίζονται στα Γραφήματα 1, 2 και 3 αντίστοιχα. Ο προηγούμενος γενετικός έλεγχος που είχε διεξαχθεί στους ασθενείς περιλάμβανε καρυότυπο (20/122), μοριακό καρυότυπο (21/122) και στοχευμένο έλεγχο συνδρόμου Angelman (4/122). Σε δείγματα που είχε προηγηθεί αλληλούχηση επόμενης γενιάς - WES (5/62) πραγματοποιήθηκε έλεγχος μόνο για ελλείμματα ή

διπλασιασμούς τμήματος ή ολόκληρου του γονιδίου *MECP2*. Σημειώνεται ότι σε μία ασθενή αναφέρεται καρύοτυπος με μωσαϊκισμό για σύνδρομο Turner.

Γράφημα 1: Κατανομή είδους σπασμών ή επιληπτικού συνδρόμου στους ασθενείς που μελετήθηκαν στο γονίδιο *MECP2*.



Γράφημα 2: Κατανομή ηλεκτροεγκεφαλογραφικών ευρημάτων των ασθενών που μελετήθηκαν στο γονίδιο *MECP2*.

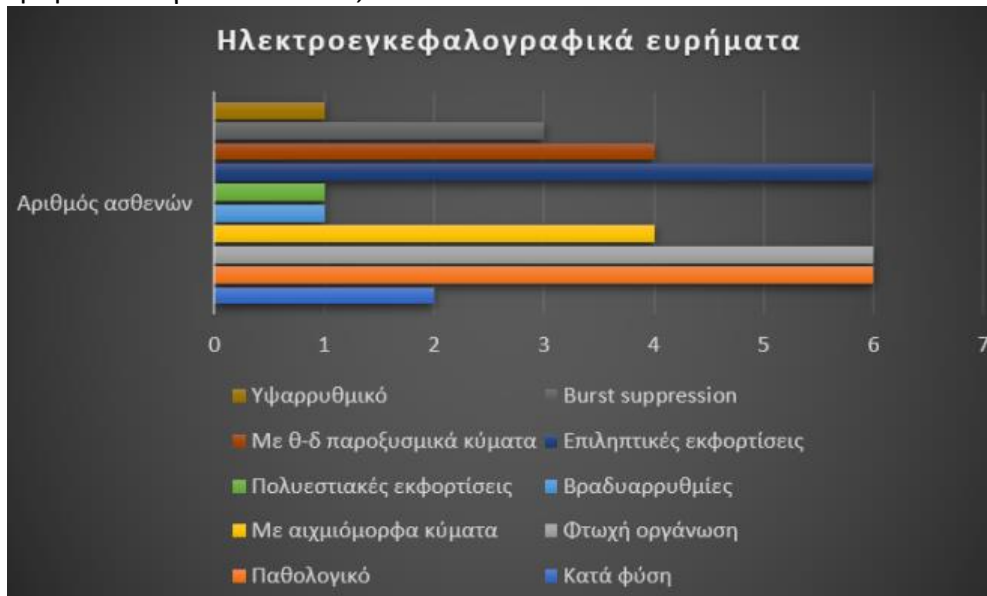


Γράφημα 3: Κατανομή απεικονιστικών ευρημάτων των ασθενών που μελετήθηκαν στο γονίδιο *MECP2*.

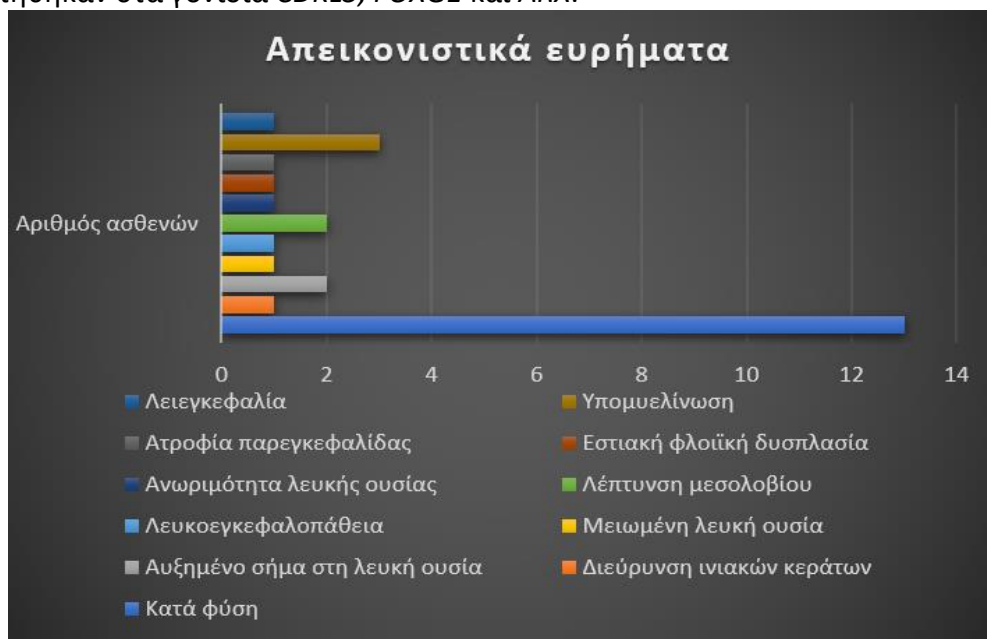


Σε 39 ασθενείς (26 θήλεα και 19 αρρένα) πραγματοποιήθηκε μελέτη των γονιδίων *CDKL5*, *FOXG1* και *ARX*. Ειδικότερα όλα τα δείγματα αναλύθηκαν για σημειακές παραλλαγές και 10 δείγματα (5 θήλεα και 5 αρρένα) για ελλείμματα ή διπλασιασμούς τμήματος ή ολόκληρων των γονιδίων *CDKL5*, *FOXG1* και *ARX*. Όλοι οι ασθενείς εμφάνιζαν σπασμούς βρεφικής ηλικίας με μέση έναρξη τους 3,5 μήνες (εύρος μετά τη γέννηση έως 2 ετών). Τα ηλεκτροεγκεφαλογραφικά και απεικονιστικά ευρήματα των ασθενών συνοψίζονται στα Γραφήματα 4 και 5. Από τα συνοδά συμπτώματα αναφέρονται ψυχοκινητική καθυστέρηση στο 77% (30/39), μικροκεφαλία στο 48,7% (19/39), υποτονία στο 33,33% (13/39), στερεοτυπίες στο 23% (9/39) και στραβισμός στο 7,69% (3/39). Επιπρόσθετα υπήρχαν και μεμονωμένα περιστατικά με ατροφία οπτικού νεύρου, κώφωση και υπερτονία. Ο προηγούμενος γενετικός έλεγχος των ασθενών περιελάμβανε καρυότυπο (11/39) και μοριακό καρυότυπο (9/39). Σε δείγματα που είχε προηγηθεί αλληλούχηση επόμενης γενιάς - WES (3/10) πραγματοποιήθηκε έλεγχος μόνο για ελλείμματα ή διπλασιασμούς τμήματος ή ολόκληρων των προαναφερθέντων γονιδίων.

Γράφημα 4: Κατανομή ηλεκτροεγκεφαλογραφικών ευρημάτων στους ασθενείς που μελετήθηκαν στα γονίδια *CDKL5*, *FOXG1* και *ARX*.



Γράφημα 5: Κατανομή των απεικονιστικών ευρημάτων των ασθενών που μελετήθηκαν στα γονίδια *CDKL5*, *FOXG1* και *ARX*.



Σε 13 ασθενείς (1 θήλυ και 12 άρρενα) πραγματοποιήθηκε στοχευμένος έλεγχος μόνο του γονιδίου *ARX* κατόπιν παραπομπής από τον θεράποντα νευρολόγο. Όλοι οι εξεταζόμενοι εμφάνιζαν βρεφικούς σπασμούς με μέση ηλικία έναρξης τους 3.5 μήνες (εύρος μετά τη γέννηση έως 8 μηνών). Θετικό οικογενειακό ιστορικό με άρρενα αδέρφια με κλινική διάγνωση αναπτυξιακής και επιληπτικής εγκεφαλοπάθειας είχαν 2 ασθενείς εκ των οποίων το ένα ήταν και το μοναδικό θήλυ που εξετάστηκε. Σε

ποσοστό 46,15% (6/13) των ασθενών συνυπήρχε ψυχοκινητική καθυστέρηση και στο 15,38% μικροκεφαλία (2/13). Επιπρόσθετα σε έναν άρρενα εξεταζόμενο καταγράφηκε δυσγενεσία γεννητικών οργάνων. Τα ηλεκτροεγκεφαλογραφικά ευρήματα που καταγράφηκαν ήταν υψαρρυθμία, burst suppression και αιχιμόμορφα κύματα ενώ μόλις ένας ασθενής είχε φυσιολογικό πρότυπο. Η μαγνητική εγκεφάλου ήταν φυσιολογική σε 4 άτομα ενώ καταδείκνυε εγκεφαλομαλάκυνση σε έναν ασθενή. Προηγηθείς γενετικός έλεγχος αφορούσε καρυότυπο σε τρεις και μοριακό καρυότυπο σε δύο άτομα.

Σε 9 ασθενείς (8 θήλεα και 1 άρρενα) πραγματοποιήθηκε στοχευμένος έλεγχος μόνο του γονιδίου *CDKL5* κατόπιν παραπομπής από τον θεράποντα νευρολόγο. Όλοι οι εξεταζόμενοι εμφάνιζαν βρεφικούς σπασμούς με μέση ηλικία έναρξης 4.8 μηνών (εύρος 40 ημερών έως 8 μηνών). Ψυχοκινητική καθυστέρηση εμφάνιζε το 33,33% (3/9) και υποτονία επίσης το 33,33% (3/9). Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά οι ασθενείς εμφάνιζαν παθολογικά πρότυπα όπως πλήρη αποδιοργάνωση, πολυεστιακές ή επιληπτικές εκφορτίσεις ενώ μόνο ένας ασθενής είχε φυσιολογικό πρότυπο. Από τον απεικονιστικό έλεγχο διαπιστώθηκε καθυστέρηση μυελίνωσης (2/9) και ατροφία εγκεφάλου (1/9) ενώ τρεις ασθενείς δεν είχαν ευρήματα. Σε έναν ασθενή είχε διεξαχθεί πρωτύτερα καρυότυπος και μοριακός καρυότυπος.

Σε 9 ασθενείς (6 θήλεα και 3 άρρενα) πραγματοποιήθηκε στοχευμένος έλεγχος του γονιδίου *FOXG1* κατόπιν παραπομπής από τον θεράποντα νευρολόγο, στους οκτώ για σημειακές παραλλαγές και σε έναν άρρενα μόνο για έλεγχο ελλειμμάτων και διπλασιασμών καθότι είχε προηγηθεί έλεγχος με WES. Βρεφικούς σπασμούς εμφάνιζε το 88,88% (8/9), ψυχοκινητική καθυστέρηση το 66,66% (6/9), υποτονία το 22,22% (2/9) και μικροκεφαλία το 22,22% (2/9). Σύμφωνα με τον απεικονιστικό έλεγχο οι δομικές παραλλαγές, που αποκαλύφθηκαν σε 6 ασθενείς αφορούσαν μειωμένη λευκή ουσία, κυστικό μόρφωμα επίφυσης, διαταραχές μυελίνωσης και απλοποιημένο φλοιό. Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά τέσσερις ασθενείς είχαν ευρήματα και αυτά ήταν υψαρρυθμία, burst suppression και επιληπτικές εκφορτίσεις. Στο πλαίσιο συνοσηροτήτων σε μία ασθενή αναφέρεται διάγνωση του μεταβολικού νοσήματος MCAD (Medium Chain acyl-CoA Deficiency).

Σε 6 ασθενείς (όλοι θήλεα) με μέσο όρο ηλικίας τα 22 έτη (εύρος από 14 μηνών έως 53 ετών) πραγματοποιήθηκε στοχευμένος έλεγχος του γονιδίου *POLG*, για σημειακές παραλλαγές ή για ελλείμματα και διπλασιασμούς. Σπασμούς εμφάνιζαν όλοι οι εξεταζόμενοι και ειδικότερα μυοκλονίες, εστιακή επιληψία και αναπτυξιακή και επιληπτική εγκεφαλοπάθεια. Στα συνοδά συμπτώματα που ήταν μοναδικά για κάθε ασθενή περιλαμβάνονται ημιπάρεση, υπαισθησία, δυσμετρία άκρων, αισθητική νευροπάθεια, πυραμιδική συνδρομή, βραδυψυχισμό και ημιπληγική ημικρανία. Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά δεδομένα ήταν διαθέσιμα για τρία άτομα και εμπεριείχαν φυσιολογικό πρότυπο (2/3) και βραδέα κύματα (1/3). Από τον απεικονιστικό έλεγχο καταγράφηκαν ισχαιμία ινιακού λοβού (1/6), εκσεσημεσμένη φλοιϊκή ατροφία και βλάβες στη λευκή ουσία του εγκεφάλου (1/6) και αλλοιώσεις της υποφλοιώδους και κεντρικής λευκής ουσίας (1/6). Κοινή γεωγραφική καταγωγή γονέων ανέφεραν όλα τα άτομα που μελετήθηκαν ενώ σε μία οικογένεια αναφέρθηκε και αιμομιξία.

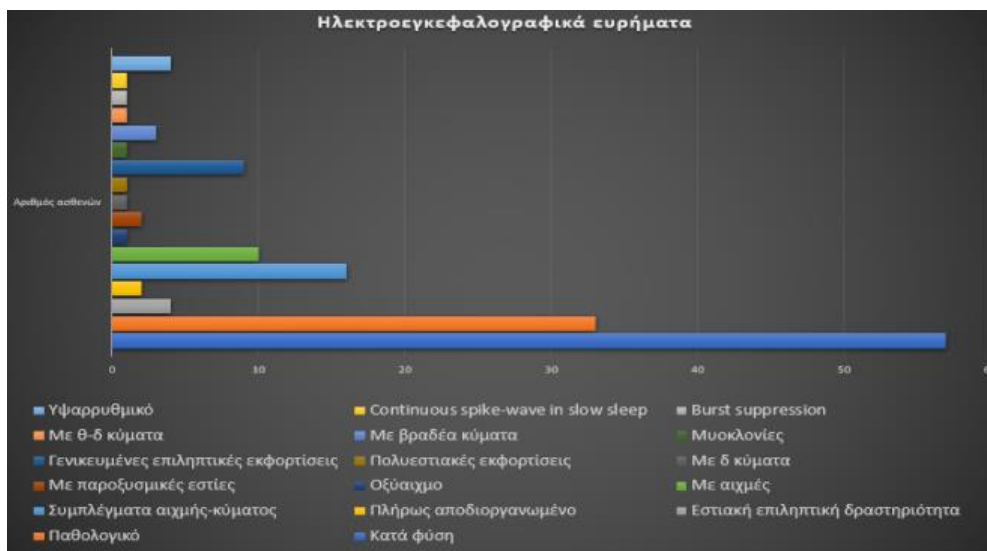
Για την μελέτη του γονιδίου *SCN1A* αναλύθηκαν 270 δείγματα (131 θήλεα και 139 άρρενα) για την ανεύρεση σημειακών παραλλαγών και 41 δείγματα (22 θήλεα και 19 άρρενα) για την ανίχνευση ελλειμμάτων ή διπλασιασμών τμήματος ή ολόκληρου του γονιδίου. Θετικό οικογενειακό ιστορικό για νευρολογικές διαταραχές παρουσίαζε το 33% των ασθενών (89/270) εκ των οποίων 17,4% ανέφερε επιληψία (47/270), 13% πυρετικούς σπασμούς (35/270), 1% (3/270) ψυχιατρικό νόσημα, 0,7% (2/270) ΝΥ, 0,4% (1/270) εγκεφαλίτιδα και 0,4% (1/270) διαταραχή στο φάσμα του αυτισμού. Όλοι οι ασθενείς εμφάνιζαν σπασμούς με μέση ηλικία έναρξης τους 21 μήνες (εύρος από τη γέννηση έως 15 ετών). Τα είδη σπασμών ή επιληπτικών συνδρόμων συνοψίζονται στο Γράφημα 6. Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά δεδομένα ήταν διαθέσιμα για το 54,44% (147/270) των ασθενών και απεικονιστικά για το 31,11% (84/270) και συνοψίζονται στα Γραφήματα 7 και 8. Άλλα κλινικά χαρακτηριστικά που παρατηρήθηκαν ήταν ψυχοκινητική καθυστέρηση στο 27% (72/270), διαταραχές στο φάσμα του αυτισμού στο 7,4% (20/270), διαταραχές λόγου στο 6,66% (18/270), μικροκεφαλία στο 2,22% (6/270), νοητική υστέρηση στο 2,22% (6/270), υποτονία στο 1,85% (5/270), δυσμορφίες προσώπου στο 1,48% (4/270), μακροκεφαλία στο 0,74% (2/270) ενώ καταγράφηκαν και μοναδικές περιπτώσεις με διαταραχές λεπτής κινητικότητας, υπέρτονια, τρόμο, ημιπληγία, εξοστώσεις, κρυφορχία, υπονατριαιμία,

τριγωνοκεφαλία, νυχτερινή ενούρηση, αταξία και υπογοναδισμό. Στοχευμένος έλεγχος για την μοριακή διάγνωση των υπόλοιπων πασχόντων μελών της οικογένειας πραγματοποιήθηκε σε 4 δείγματα εκ των οποίων 2 μητέρες, 1 πατέρας και 1 εξαδέλφη.

Γράφημα 6: Κατανομή είδους σπασμών ή επιληπτικού συνδρόμου στους ασθενείς που μελετήθηκαν στο γονίδιο *SCN1A*.



Γράφημα 7: Κατανομή των ηλεκτροεγκεφαλογραφικών ευρημάτων των ασθενών που μελετήθηκαν στο γονίδιο *SCN1A*.



Γράφημα 8: Κατανομή των απεικονιστικών ευρημάτων των ασθενών που μελετήθηκαν στο γονίδιο *SCN1A*.



Με αλληλούχηση επόμενης γενιάς μελετήθηκαν συνολικά 107 ασθενείς 53 θήλεα και 54 άρρενα (9 με CES, 97 με WES και 1 με trio WES) ηλικίας 4 ημερών έως 47 ετών με κλινική διάγνωση AEE (52/107), ISS (13/107), SL(F)NIE (7/107), EME (2/107), GGE (15/107), GEFS+ (5/107), D/EE-SWAS (3/107), SMEI (1/107), SHE (2/107), επιληπτικού συνδρόμου επί εδάφους ετεροτοπίας ή πολυμικρογυρίας (4/107) και επιληπτικού συνδρόμου με πολλαπλά είδη σπασμών (3/107). Σε έναν ασθενή με πολλαπλά είδη σπασμών συνυπήρχε και ταπητοαμφιβληστροειδοπάθεια. Η ηλικία έναρξης των σπασμών ήταν 0-2 μηνών σε 34, >2μηνών – 1 έτους σε 36, >1 έτους – 4 ετών σε 22, >4 ετών - 12 ετών σε 10 και εφηβική (>12 ετών) σε 5 ασθενείς. Προηγούμενος γενετικός έλεγχος είχε διεξαχθεί σε 51 ασθενείς ο οποίος ανάλογα με την κλινική συμπτωματολογία περιελάμβανε καρυότυπο, μοριακό καρυότυπο ή στοχευμένο έλεγχο των γονιδίων *SCN1A*, *MECP2*, *ARX*, *CDKL5*, *FOXP1* ή *FMR1* καθώς και έλεγχο συνδρόμου Angelman.

Πριν τη διεξαγωγή των μοριακών ελέγχων πραγματοποιήθηκε λήψη λεπτομερούς ατομικού και οικογενειακού ιστορικού ώστε να καταγραφούν σημαντικά στοιχεία όπως η ηλικία έναρξης, το είδος και η συχνότητα των σπασμών, τα συνοδά κλινικά ευρήματα όπως ψυχοκινητική καθυστέρηση, νοητική υστέρηση ή διαταραχές στο αυτιστικό φάσμα, τα ευρήματα από τον ηλεκτροεγκεφαλογραφικό και απεικονιστικό έλεγχο, τα πιθανά δυσμορφικά στίγματα καθώς και λοιπά νευρολογικά

συμπτώματα και σε άλλα μέλη της οικογένειας. Επιπρόσθετα οι κηδεμόνες των ασθενών ενημερώθηκαν για τις δυνατότητες και τους περιορισμούς του γενετικού ελέγχου και συμπληρώθηκε ενυπόγραφο έντυπο συγκατάθεσής τους. Η παρούσα μελέτη έλαβε έγκριση διεξαγωγής από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Γενικού Νοσοκομείου Παιδων «Η Αγία Σοφία» κατά τη συνεδρίαση του στις 23/05/2016 (Αριθμός πρωτοκόλλου:12160/23-05-16).

3.2 Μεθοδολογία

3.2.1 Λήψη βιολογικού υλικού

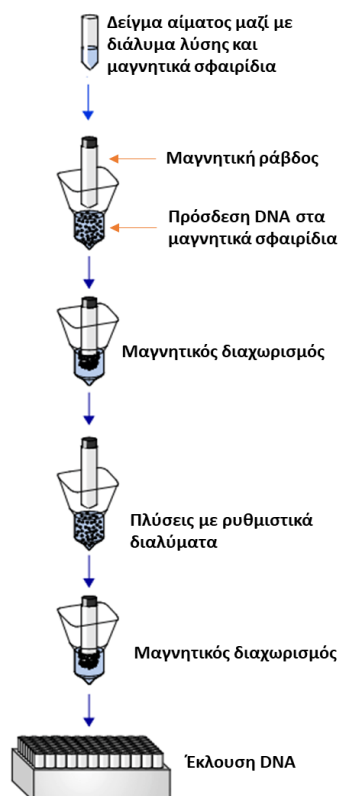
Από τους ασθενείς έγινε λήψη 2 ml περιφερικού αίματος σε φιαλίδιο όγκου 3 ml με μικρή ποσότητα στερεού άλατος EDTA το οποίο δεσμεύοντας ιόντα ασβεστίου αποτρέπει τη δημιουργία πηγμάτων τα οποία επηρεάζουν τη διαδικασία της απομόνωσης του DNA.

Σε δύο ασθενείς πραγματοποιήθηκε λήψη επιχρίσματος παρειών λόγω προηγηθείσας μετάγγισης ή λόγω αδυναμίας του εξεταζόμενου για συνεργασία στην αιμοληψία. Σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιήθηκε βαμβακοφόρος στυλεός χωρίς καλλιεργητικό υλικό και διεξήχθη μηχανική αποκόλληση κυττάρων από το εσωτερικό κάθε παρειάς για μερικά δευτερόλεπτα.

3.2.2 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA από τα δείγματα περιφερικού αίματος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αυτοματοποιημένου ρομποτικού συστήματος QIASymphony DSP και του εμπορικά διαθέσιμου συστήματος QIASymphony DSP DNA mini Blood της εταιρείας QIAGEN σύμφωνα με τις οδηγίες και το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας.

Το σύστημα QIASymphony DSP βασιζόμενο στην τεχνολογία επιφανειών πυριτίου και μαγνητικών σωματιδίων επιτρέπει την απόλυτα αυτοματοποιημένη απομόνωση ολικού DNA και τον ταυτόχρονο καθαρισμό του με σκοπό την χρήση του σε μοριακές τεχνικές. Ειδικότερα δείγμα αίματος, διάλυμα λύσης των κυττάρων και μαγνητικά σφαιρίδια προστίθενται σε φιαλίδια, ακολουθεί πρόσδεση του DNA στην πυριτική επιφάνεια των μαγνητικών σφαιριδίων παρουσία ενός χαοτροπικού άλατος, μαγνητικός διαχωρισμός και έκλυση του προσδεόμενου DNA με χρήση ρυθμιστικού διαλυμάτος ATE που εξασφαλίζει την καλή ποιότητα του DNA για μακροχρόνια αποθήκευση και την απόδοσή του σε ευαίσθητες μοριακές τεχνικές (Εικόνα 32). Το DNA που αποδίδεται από την διαδικασία της απομόνωσης εξαρτάται από τον αριθμό των λευκοκυττάρων του δείγματος και τις συνθήκες φύλαξής του.



Εικόνα 32: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας απομόνωσης DNA με χρήση συστήματος QIAasympphony DNA DSP DNA mini Blood (Αναπροσαρμογή από το εγχειρίδιο της εταιρείας).

Η διαδικασία απομόνωσης DNA από επίχρισμα παρειών πραγματοποιήθηκε χειροκίνητα με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου κιτ Qiagen mini Blood, ενός υδατόλουτρου και μιας φυγοκέντρου ως εξής:

- Αποκοπή του τμήματος του βαμβακοφόρου στυλεού που περιείχε το βαμβάκι και τοποθέτησή του σε σωληνάριο του 1,5 ml με συνοδά 200μl χλωριούχο νάτριο, 200μl διάλυμα λύσης (AL buffer) και 20μl πρωτεΐνάση K.
- Διατήρηση του σωληναρίου για 30 λεπτά σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 56°C.
- Μεταφορά του υλικού σε ειδικά σωληνάκια με ηθμό (όπως αυτά παρέχονται από το κιτ), προσθήκη 200μl αιθανόλης και φυγοκέντρωση στα 130gpm για 1 λεπτό.
- Απόρριψη του διηθήματος, προσθήκη 500μl ρυθμιστικού διαλύματος AW1, και φυγοκέντρωση στα 130gpm για 1 λεπτό.

- Απόρριψη του διηθήματος, προσθήκη 500μl ρυθμιστικού διαλύματος AW2, και φυγοκέντρηση στα 130g για 3 λεπτά.
- Απόρριψη του διηθήματος, προσθήκη 20μl απεσταγμένου νερού και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά με σκοπό την πρόσδεση του DNA στον ηθμό και τελική έκλουσή του.
- Φυγοκέντρηση στα 100g για 1 λεπτό. Σημειώνεται ότι η ποιότητα του DNA που απομονώθηκε καθορίστηκε από την λήψη του επιχρίσματος.

3.2.3 Στοχευμένη ανάλυση της πρωτοταγούς δομής ενός γονιδίου: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και Αλληλούχηση κατά Sanger

3.2.3.1 Σχεδιασμός εκκινητών για την κωδικοποιούσα περιοχή του εκάστοτε γονιδίου

Οι εκκινητές (primers) είναι συνθετικά μονόκλινα ολιγονουκλεοτίδια, που υβριδίζονται στις συμπληρωματικές θέσεις των δύο αλυσίδων, στα άκρα του επιθυμητού τμήματος DNA.

Ο σχεδιασμός των εκκινητών για το γονίδιο ενδιαφέροντος πραγματοποιήθηκε ως εξής: αρχικά επιλέχθηκε το επιθυμητό μετάγραφο από τη βάση δεδομένων Ensembl (version GRCh37) (<http://grch37.ensembl.org/index.html>), ακολούθησε χρήση του in silico εργαλείου (<https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>) με σκοπό τον σχεδιασμό δύο εκκινητών για την κάθε περιοχή έναν εμπρόσθιο (forward) και έναν ανάστροφο (reverse) και του in silico εργαλείου (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>) για τον έλεγχο των εκκινητών ως προς την ορθότητα τους στον πολλαπλασιασμό μόνο των επιθυμητών περιοχών.

Η επιλογή του κατάλληλου ζεύγους εκκινητών πραγματοποιείται με βάση το μήκος και τη σύσταση των βάσεων συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων. Σε γενικές γραμμές ολιγονουκλεοτίδια μήκους 18-24 βάσεων χωρίς επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που ίσως οδηγούν σε μη ειδική σύνδεση, και με σύσταση σε βάσεις γουανίνης και κυτοσίνης (GC) στο 45-55%, είναι ιδανικά. Παράλληλα θα πρέπει οι δύο εκκινητές να έχουν παρόμοιες θερμοκρασίες υβριδισμού και να μην εμφανίζουν συμπληρωματικότητα μεταξύ τους καθώς ενέχεται κίνδυνος σχηματισμού διμερών εκκινητών (primer dimer formation). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την

μελέτη των γονιδίων *SCN1A*, *MECP2*, *CDKL5*, *FOXG1*, *POLG* και *ARX* αναγράφονται στο παράρτημα.

3.2.3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για τον πολλαπλασιασμό των υπό μελέτη περιοχών

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR - Polymerase Chain Reaction) αναπτύχθηκε για πρώτη φορά το 1983 από τον Αμερικάνο Βιοχημικό Kary Mullis και αφορά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA με τη χρήση ειδικής θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (Taq polymerase) και διαδοχικούς κύκλους μεταβολών θερμοκρασίας. Τα προϊόντα της PCR ποικίλλουν σε μέγεθος ανάλογα με τους εκκινητές που χρησιμοποιούνται για τον πολλαπλασιασμό της επιθυμητής περιοχής και παράγονται πολλαπλά αντίγραφα (2^n με n =αριθμό κύκλων αντίδρασης PCR) ενός τμήματος DNA σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών ακόμη και με ελάχιστη αρχική ποσότητα υποστρώματος όπως DNA από 1 κύτταρο. Η PCR βασίζεται στην ιδιότητα της DNA πολυμεράσης να συνθέτει συμπληρωματική αλυσίδα DNA σε κατεύθυνση 5' προς 3', χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα μονόκλωνο DNA με τη βοήθεια των εκκινητών. Απαιτούμενα αντιδραστήρια για τη διεξαγωγή της PCR είναι η DNA πολυμεράση, το ρυθμιστικό της διάλυμα, ζεύγος των εκκινητών, διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), το υπόστρωμα δηλαδή η δίκλωνη αλληλουχία DNA που θα πολλαπλασιαστεί, νερό και θερμικός κυκλοποιητής. Σημειώνεται ότι σε ορισμένα εξόνια των γονιδίων *MECP2*, *CDKL5*, *FOXG1* και *ARX* χρησιμοποιήθηκαν επίσης τα αντιδραστήρια DMSO (Dimethyl sulfoxide) και 7-deaza-dGTP (7-deaza-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate) με σκοπό την αποφυγή σχηματισμού δευτεροταγών δομών DNA που επιδρούν στον πολλαπλασιασμό της επιθυμητής αλληλουχίας σε περιοχές πλούσιες σε νουκλεοτίδια γουανίνης-κυτοσίνης ή με επαναλαμβανόμενες τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Επιπρόσθετα χρησιμοποιήθηκε και χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$) για τη βελτιστοποίηση της δράσης της πολυμεράσης μέσω ενσωμάτωσης dNTPs κατά τη διάρκεια της PCR.

Η διαδικασία της PCR περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. αρχική αποδιάταξη του υποστρώματος (δίκλωνο DNA) και ενεργοποίηση της πολυμεράσης 94-96°C για 1-15 λεπτά.
2. αποδιάταξη του δίκλωνου DNA σε υψηλή θερμοκρασία (94-98°C) για 30-90 δευτερόλεπτα.

3. υβριδισμός των εκκινητών στα άκρα της μονόκλωνης αλληλουχίας-στόχου, σε θερμοκρασία που εξαρτάται κάθε φορά από τη σύνθεση των εκκινητών (50-70°C) για 30 δευτερόλεπτα - 3 λεπτά.
 4. επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών, με την προσθήκη των dNTPS από την πολυμεράση με σκοπό την αντιγραφή της αλληλουχίας-στόχου, για 30 δευτερόλεπτα -3 λεπτά στους 72°C.
 5. τελική επιμήκυνση 10 λεπτά στους 72°C.
 6. αναμονή των αντιδράσεων στο μηχάνημα στους 4-10°C μέχρι την αφαίρεση τους από τον χειριστή.
- Τα στάδια 2-4 επαναλαμβάνονται για 20-40 κύκλους και οι χρόνοι τους καθορίζονται από το μήκος σε ζεύγη βάσεων του υπό ενίσχυση τμήματος DNA.

3.2.3.3 Έλεγχος της απόδοσης της PCR με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της επιτυχίας της PCR όπου γραμμικά μόρια DNA κινούνται προς την άνοδο λόγω των αρνητικών φορτίων των φωσφορικών ομάδων του μορίου με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του βάρους τους. Για την παρασκευή του πηκτώματος χρησιμοποιήθηκε αγαρόζη η οποία είναι γραμμικό πολυμερές που βρίσκεται στο άγαρ το οποίο απομονώνεται από τα φύκη και ρυθμιστικό διάλυμα (Tris - acetate ή borate - EDTA) το οποίο δρα ως δότης ιόντων για τη δημιουργία αγωγιμότητας. Επιπρόσθετα προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο το οποίο παρεισφρέει μεταξύ των δύο αλυσίδων του DNA και φθορίζει μετά την έκθεσή του σε υπεριώδη ακτινοβολία επιτρέποντας την ανίχνευση των προϊόντων της PCR. Η περιεκτικότητα του πηκτώματος σε αγαρόζη επιλέγεται με βάση το μέγεθος των θραυσμάτων DNA που θα διαχωρισθούν με τα μεγαλύτερα θραύσματα να διαχωρίζονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις.

Πριν την τοποθέτηση των προϊόντων της PCR στο πήκτωμα πραγματοποιήθηκε ανάμιξή τους με την χρωστική φόρτωσης (loading dye) Ficoll η οποία εμπεριέχει το μπλε της βρωμοφαινόλης που είναι ορατό στο φυσικό φως. Τα νουκλεϊκά οξέα είναι διαυγή οπότε πρέπει να χρωματιστούν για πρακτικούς λόγους όπως η αναγνώριση της θέσης του δείγματος και η αξιολόγηση της μετακίνησής του στο πήκτωμα. Τέλος στο πήκτωμα τοποθετήθηκε και ένας μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους (ladder) για να προσδιορίσει το μέγεθος του ηλεκτροφορούμενου μορίου.

Στις πειραματικές διαδικασίες της παρούσας διατριβής παρασκευάστηκαν πηκτώματα περιεκτικότητας 1% αγαρόζης βάρος κατ' όγκο (w/v) και τα δείγματα, μετά την τοποθέτησή τους στις ειδικές εσοχές του πηκτώματος (πηγαδάκια), ηλεκτροφορήθηκαν στα 140 Volt για 20 λεπτά.

3.2.3.4 Καθαρισμός προϊόντων PCR (PCR clean-up)

Η ενζυμική διαδικασία καθαρισμού των προϊόντων της PCR έχει ως στόχο την αποικοδόμηση των μη ενσωματωμένων εκκινητών και την αποφωσφορυλίωση των εναπομείναντων dNTPs με σκοπό την παραγωγή καθαρών προϊόντων που θα λειτουργήσουν ως υπόστρωμα για την αλληλούχηση. Για τον καθαρισμό χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα:

1. με τη χρήση δύο ενζύμων: εξωνουκλεάσης I (Exonuclease I / Exo I, NEB #M0293) και αλκαλικής φωσφατάσης από γαρίδα (Shrimp Alkaline Phosphatase / rSAP, NEB #M0371) της εταιρίας New England BioLabs και
2. με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου συστήματος ExS-Pure της εταιρίας NimaGen που εμπεριέχει έτοιμο μίγμα των δύο προαναφερθέντων ενζύμων.

Η στοιχειομετρία ανά δείγμα και οι συνθήκες για τους τρόπους καθαρισμού συνοψίζονται στους Πίνακες 6 και 7. Η προετοιμασία των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 0°C (παγωμένο στατώ) και ολοκληρώθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή για τη διεξαγωγή τους.

Πίνακας 6: Καθαρισμός προϊόντων PCR με χρήση ενζύμων Exo I και rSAP.

Καθαρισμός προϊόντων PCR με χρήση ενζύμων Exo I και rSAP	
ExoI	0,25 μl
rSAP	0,50 μl
Προϊόν PCR	2,50 μl
Συνθήκες αντίδρασης	37°C για 15 λεπτά 85°C για 15 λεπτά 4°C μέχρι την απομάκρυνση της αντίδρασης από το μηχανήμα

Πίνακας 7: Καθαρισμός προϊόντων PCR με χρήση του κιτ ExS-Pure.

Καθαρισμός προϊόντων PCR με τη χρήση του κιτ ExS-Pure	
ExS-Pure	1 μl
Προϊόν PCR	2,50 μl
Συνθήκες αντίδρασης	37°C για 4 λεπτά 80°C για 1 λεπτό 4°C μέχρι την απομάκρυνση της αντίδρασης από το μηχάνημα

3.2.3.5 Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του DNA με αντίδραση αλληλούχησης κατά Sanger

Η αλληλούχηση είναι ο καθορισμός της πρωτοταγούς δομής του DNA που επιτρέπει την ανίχνευση αλλαγών της ακολουθίας ακόμα και στο επίπεδο της μιας βάσης. Η αρχή της αλληλούχησης όπως αυτή ανακαλύφθηκε και εφαρμόστηκε το 1977 από τον Βρετανό βιοχημικό Frederick Sanger απαιτεί ένα μονόκλωνο μόριο DNA ως μήτρα, έναν DNA εκκινητή, μια DNA πολυμεράση και ραδιενεργά σημασμένα ή σημασμένα με χρωστική τροποποιημένα νουκλεοτίδια τα οποία θα τερματίσουν την επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA. Το δείγμα του DNA διαχωρίζεται σε τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις αλληλούχησης, στις οποίες περιλαμβάνονται τα τέσσερα βασικά dNTPs και η DNA πολυμεράση. Σε καθεμία από τις αντιδράσεις προστίθεται μόνο ένα από τα τέσσερα διδεοξυνουκλεοτίδια τερματισμού (ddATP, ddGTP, ddCTP, ή ddTTP), από τα οποία απουσιάζει η 3'-OH ομάδα η οποία είναι απαραίτητη για τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ δύο νουκλεοτιδίων, τερματίζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την επιμήκυνση της αλυσίδας και καταλήγοντας σε τμήματα DNA ποικίλου μήκους. Τα νεοσυντιθέμενα και σημασμένα τμήματα DNA αποδιατάσσονται με αύξηση της θερμοκρασίας και διαχωρίζονται βάσει μεγέθους (με ανάλυση ενός νουκλεοτιδίου) με τη βοήθεια της ηλεκτροφόρησης σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Η σύγχρονη μέθοδος για την αντίδραση αλληλούχησης δεν εμπεριέχει ραδιενέργεια και στηρίζεται στον φθορισμό. Παράλληλα κάθε δείγμα δεν χρειάζεται να μελετηθεί με τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις καθώς τα διαλύματα εμπεριέχουν μίγμα δεοξυ- και διδεοξυ- νουκλεοτιδίων με καθένα από τα τέσσερα ddNTPs να σημαίνεται με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική και να

εκπέμπει σε διαφορετικό μήκος κύματος. Οπότε με τη χρήση ενός ανιχνευτή laser, καταγράφεται ο φθορισμός και τελικά η αλληλουχία με τη μορφή ηλεκτροφορήματος.

Για τη διεξαγωγή της αλληλούχησης χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit της εταιρείας Applied Biosystems, τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR, εκκινητές, νερό, ειδικά διαμορφωμένα πιάτα (plates) 96 θέσεων (12 σειρές με οκτώ διαθέσιμες θέσεις σε κάθε σειρά), παγωμένο στατώ και ένας θερμικός κυκλοποιητής. Η στοιχειομετρία της αντίδρασης αλληλούχησης ανά δείγμα καθώς και οι συνθήκες αντίδρασης συνοψίζονται στον Πίνακα 8. Σημειώνεται ότι για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές αντιδράσεις αλληλούχησης μια με τον πρόσθιο εκκινητή και μία με τον ανάστροφο.

Πίνακας 8: Στοιχειομετρία αντίδρασης αλληλούχησης ανά δείγμα.

Αντίδραση αλληλούχησης	
H ₂ O	7,43 μl
Big Dye Terminator Buffer	1 μl
Big Dye Terminator Enzyme	0,25 μl
Εκκινητής	0,32 μl
Καθαρισμένο PCR προϊόν	1 μl
Σύνολο	9 μl
Συνθήκες αντίδρασης	96°C για 1 λεπτό 96°C για 10 δευτερόλεπτα 55°C για 5 δευτερόλεπτα 60°C για 4 λεπτά 4°C μέχρι την απομάκρυνση της αντίδρασης από το μηχάνημα } για 25 κύκλους

3.2.3.6 Καθαρισμός των προϊόντων της αντίδρασης αλληλούχησης

Ο καθαρισμός των προϊόντων της αντίδρασης αλληλούχησης έχει ως στόχο την απομάκρυνση της περίσσειας αντιδραστηρίων που δεν χρησιμοποιήθηκαν κατά την αλληλούχηση και μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την ποιότητα του ηλεκτροφορήματος κατά την ανάγνωση του φθορισμού από τον ανιχνευτή laser. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με αιθανόλη και προσθήκη άλατος και

διαδοχικές φυγοκεντρήσεις. Η κατακρήμνιση με αιθανόλη παρουσία αλάτων είναι μια ευρέως διαδεδομένη διαδικασία για τον καθαρισμό των νουκλεϊκών οξέων.

Ειδικότερα το πρωτόκολλο για τον καθαρισμό εμπεριείχε παρασκευή μίγματος σε σωληνάριο των 15 ml στο οποίο προστέθηκαν για κάθε δείγμα 28 ml αιθανόλης (EtOH) 100% και 1 ml οξικού αμμωνίου (NH₄Ac), ακολούθησε ελαφριά ανάδευση και διαμοίραση 29 ml ανά δείγμα με τη χρήση δοχείου – δεξαμενής και οκτακάναλης πιπέτας. Το πιάτο καλύφθηκε με κάλυμμα σιλικόνης και τοποθετήθηκε για μισή ώρα στο ψυγείο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση του πιάτου στα 2210g στους 4°C για μισή ώρα και φυγοκέντρηση με το πιάτο αναποδογυρισμένο (χωρίς κάλυμμα) στα 200g στους 4°C για 2 λεπτά. Έπειτα προστέθηκαν 50 ml EtOH 70% ανά δείγμα και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 2210g στους 4°C για 3 λεπτά. Το πιάτο φυγοκεντρήθηκε ξανά αναποδογυρισμένο (χωρίς κάλυμμα) στα 200g στους 4°C για 3 λεπτά. Μετά το πέρας των φυγοκεντρήσεων το πιάτο αφέθηκε να στεγνώσει από πιθανά υπολείμματα EtOH σε σκιερό μέρος για περίπου 5 λεπτά. Τέλος προστέθηκαν 10 ml φορμαμιδίου (HiDi) σε κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκε vortex και ήπια φυγοκέντρηση στους 4°C μέχρι η φυγόκεντρος να φτάσει στα 200g. Η χρήση του φορμαμιδίου εξαλείφει τις δευτεροταγείς δομές των νουκλεϊκών οξέων οπότε βελτιστοποιεί την εικόνα του ηλεκτροφορήματος που προκύπτει από τον αναλυτή.

Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε για την καταγραφή του φθορισμού και την ανάλυση της πρωτοταγούς δομής ήταν το ABI3500 της εταιρείας Applied Biosystems. Η λειτουργία του αναλυτή συνοψίζεται ως εξής τα νουκλεϊκά οξέα εισέρχονται με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στα 8 γυάλινα τριχοειδή που είναι γεμάτα με το πολυμερές (POP) και μετακινούνται καθότι είναι αρνητικά φορτισμένα κατά μήκος του προς την άνοδο. Στο τέλος κάθε τριχοειδούς υπάρχει ο ανιχνευτής laser ο οποίος εγείρει τις διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές να εκπέμψουν σε διαφορετικό μήκος κύματος το οποίο καταγράφεται από τον ανιχνευτή. Με την χρήση λογισμικού γίνεται μετατροπή των καταγραφών του ανιχνευτή σε ανάκληση βάσεων (base calling) και παράγονται το ηλεκτροφόρημα το οποίο εμπεριέχει κορυφές των οποίων το κάθε χρώμα αντιστοιχεί σε μία βάση του DNA (πράσινο για

αδενίνη, κόκκινο για θυμίνη, μαύρο για γουανίνη και μπλε για κυτοσίνη) και ένα αρχείο .txt που εμπεριέχει την αλληλουχία όπως αυτή αποδόθηκε από τον αναλυτή.

3.2.3.7 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της αντίδρασης αλληλούχησης με *in silico* προγράμματα

Η ανάλυση των ηλεκτροφορημάτων και των αρχείων .txt του αναλυτή πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα BioEdit (<https://bioedit.software.informer.com/7.2/>) και Chromas (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>).

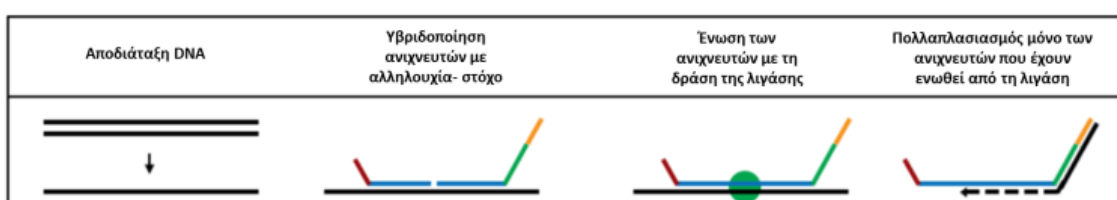
Η αξιολόγηση πιθανών ευρημάτων από την αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε με βάση τα *in silico* προγράμματα αξιολόγησης παθογνωμικότητας των παραλλαγών VarMap (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/DisaStr/GetPage.pl?vormap=TRUE>), Varsome (<https://varsome.com/>), Franklin by Genoox (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>), Human Spicing Finder 3 (<https://hsf.genomnis.com/home>), τις βάσεις δεδομένων: ClinVar, GnomAD, EXAC και τις βάσεις δεδομένων των γονιδίων *MECP2* (http://mecp2.chw.edu.au/mecp2/mecp2_upgrade_proband_list_copy.php), *SCN1A* (http://scn1a.caae.org.cn/scn1a_variant.php) και *POLG* (<https://tools.niehs.nih.gov/polg/>). Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκε αναζήτηση της διεθνούς βιβλιογραφίας για την εκάστοτε παραλλαγή.

3.2.4 Μελέτη του αριθμού αντιγράφων του εξονικών περιοχών γονιδίων με τη χρήση πολλαπλής ενίσχυσης υβριδοποιημένων ανιχνευτών με το ένζυμο της λιγάσης (Multiplex Ligation – dependant Probe Amplification, MLPA)

Η τεχνική MLPA είναι μια ποσοτική μέθοδος για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση αλλαγών του αριθμού αντιγράφων γονιδίων που επιτρέπει την ταυτόχρονη μελέτη έως και 60 διαφορετικών αλληλουχιών DNA σε μία αντίδραση που βασίζεται στην τεχνολογία της PCR και επιτρέπει την ανίχνευση πολλαπλών αλληλουχιών σε ολόκληρο το γονιδίωμα με τη χρήση ενός μόνο ζεύγους εκκινητών.

Η μέθοδος χρησιμοποιεί ως μήτρα μονόκλινα τμήματα DNA και μονόκλινα ολιγονουκλεοτίδια - ανιχνευτές (probes) τα οποία υβριδοποιούνται το ένα δίπλα στο

άλλο ανά ζεύγη στην αλληλουχία-στόχο η οποία φέρει μέγεθος 60-80 βάσεις. Ο δεξιός εκκινητής εμπεριέχει μία ακόμα εσωτερική αλληλουχία που καθορίζει το μέγεθος του ανιχνευτή. Κάθε ανιχνευτής του μίγματος έχει μοναδικό μέγεθος ώστε να μπορεί να ταυτοποιηθεί στο τέλος μετά από τριχοειδή ηλεκτροφόρηση σε αυτόματο αναλυτή. Οι ανιχνευτές ενώνονται μεταξύ τους με τη δράση της λιγάσης. Ακολουθεί εφαρμογή PCR με ένα ζεύγος εκκινητών, συμπληρωματικών ως προς τους ανιχνευτές, όπου ο πρόσθιος είναι σημασμένος με φθορίζουσα χρωστική FAM για τον πολλαπλασιασμό του τμήματος DNA που προκύπτει από την ένωση των ανιχνευτών με την αντίδραση της λιγάσης (Εικόνα 33).



Εικόνα 33: Σχηματική απεικόνιση της αρχής της μεθόδου MLPA. Αναπροσαρμογή από το πρωτόκολλο της εταιρείας MRC Holland.

Για τους σκοπούς της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκαν τα συστήματα SALSA MLPA της εταιρείας MRC Holland με κωδικούς P137 για την μελέτη του γονιδίου *SCN1A*, P015 για το γονίδιο *MECP2*, P189 για τα γονίδια *CDKL5/ARX/FOGX1*, P395 για τα γονίδια *MEF2C/FOGX1* και P010 για το γονίδιο *POLG*.

Η πειραματική διαδικασία της μεθόδου διαρκεί συνήθως δύο μέρες και χωρίζεται σε τρία στάδια.

1^η ημέρα: Αποδιάταξη DNA και υβριδισμός ανιχνευτών

Προετοιμασία δειγμάτων Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων DNA πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο Nanodrop 1000 της εταιρείας ThermoScientific. Η αντίδραση MLPA προϋποθέτει συγκέντρωσεις από 50-100ng, ποσότητες που συνήθως εμπεριέχονται σε 1-2μl δείγματος. Καθότι η μέθοδος είναι συγκριτική όλα τα δείγματα πρέπει να έχουν παρόμοια συγκέντρωση. Ειδικότερα πραγματοποιήθηκε μεταφορά 1-2 μl δείγματος σε σωληνάρια όγκου 0,2 ml και ακολούθησε προσθήκη νερού έως τελικό όγκο 5 μl. Σε κάθε αντίδραση

χρησιμοποιήθηκε δείγμα αναφοράς (άτομο γενικού πληθυσμού χωρίς βλάβη εντός των υπό μελέτη γονιδίων) και δείγμα θετικού ελέγχου με διαπιστωμένη βλάβη αριθμού αντιγράφων όλου ή τμήματος του υπό εξέταση γονιδίου ή χρωμοσωμικής περιοχής για την επιβεβαίωση της ορθής λειτουργίας της πειραματικής διαδικασίας. Σημειώνεται ότι για τις αντιδράσεις MLPA γονιδίων που εδράζονται στο X χρωμόσωμα όπως τα *MECP2*, *CDKL5* και *ARX* τα δείγματα αναφοράς και θετικού ελέγχου ήταν του ίδιου φύλου με τα υπό μελέτη δείγματα ώστε να πραγματοποιηθεί ορθά η σύγκριση των παραγόμενων σημάτων.

Αποδιάταξη DNA Με το πέρας των αραιώσεων των δειγμάτων τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή για 10 λεπτά στους 98°C.

Υβριδισμός ανιχνευτών Το μίγμα προετοιμάζεται κατά την αναμονή της αποδιάταξης, σε παγωμένο στατώ, με στοιχειομετρία αναγράφεται στον Πίνακα 9 και διαμοιράζεται σε καθένα από τα δείγματα εντός του κυκλοποιητή και ενώ η θερμοκρασία έχει μειωθεί στους 25°C.

Πίνακας 9: Στοιχειομετρία μίγματος υβριδοποίησης.

Στοιχειομετρία μίγματος υβριδοποίησης	
MLPA buffer (yellow cap)	0,75 μl
Probemix (black cup)	0,75 μl
Σύνολο	1,5 μl

Ακολούθησε παραμονή των δειγμάτων στους 25°C για δύο λεπτά και τελικά στους 60°C όπου και πραγματοποιείται ο υβριδισμός για 3-20 ώρες.

2^η ημέρα: Αντίδραση λιγάσης και PCR

Αντίδραση λιγάσης Σε παγωμένο στατώ, ετοιμάστηκε μίγμα με την στοιχειομετρία που αναγράφεται στον Πίνακα 10 και διαμοιράστηκε σε καθένα από τα δείγματα εντός του κυκλοποιητή και ενώ η θερμοκρασία είχε μειωθεί στους 54°C.

Πίνακας 10: Στοιχειομετρία μίγματος λιγάσης.

Στοιχειομετρία μίγματος λιγάσης	
Ligase Buffer A	1,5 μl
Ligase Buffer B	1,5 μl
Ligase 65 (green cup)	0,5 μl
H ₂ O	12,5 μl
Σύνολο	16 μl

Ακολούθησε παραμονή των δειγμάτων στους 54°C για 15 λεπτά και στους 98°C για 5 λεπτά. Οι αντιδράσεις παρέμειναν στον κυκλοποιητή στους 25°C μέχρι την απομάκρυνσή τους από τον χειριστή για τη διεξαγωγή σύντομης φυγοκέντρησης για την απαλοιφή σταγονιδίων ή φυσαλίδων που μπορεί να παρέμειναν στα τοιχώματα κατά τις διαμοιράσεις των δειγμάτων.

Αντίδραση PCR Σε παγωμένο στατώ, ετοιμάστηκε μίγμα με την στοιχειομετρία του Πίνακα 11 και διαμοιράστηκε σε καθένα από τα δείγματα εντός του κυκλοποιητή και ενώ η θερμοκρασία είχε μειωθεί στους 25°C. Σημειώνεται ότι το μίγμα της αντίδρασης PCR ήταν κοινό και για όλα τα διαφορετικά μίγματα ανιχνευτών που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 11: Στοιχειομετρία μίγματος PCR.

Στοιχειομετρία μίγματος PCR	
H ₂ O	3,75 μl
PCR master mix	1 μl
Salsa polymerase(orange cup)	0,25 μl
Σύνολο	5 μl
Συνθήκες αντίδρασης	95°C για 30 δευτερόλεπτα } για 35 κύκλους 60°C για 30 δευτερόλεπτα } 72°C για 60 δευτερόλεπτα } 72°C για 10 λεπτά 15°C μέχρι την απομάκρυνση της αντίδρασης από το μηχάνημα

Προετοιμασία δειγμάτων για τριχοειδή ηλεκτροφόρηση σε αυτόματο αναλυτή ABI3500 Μετά το πέρας της αντίδρασης PCR τα προϊόντα διαχωρίζονται σε αυτόματο αναλυτή για την επίτευξη της πειραματικής διαδικασίας παρασκευάστηκε το μίγμα

του ακόλουθου πίνακα για κάθε δείγμα σε παγωμένο στατώ και διαμοιράστηκε σε πιάτα 96 θέσεων.

Πίνακας 12: Στοιχειομετρία μίγματος για τριχοειδή ηλεκτροφόρηση.

Στοιχειομετρία μίγματος για τριχοειδή ηλεκτροφόρηση	
Φορμαμίδιο (HiDi)	9 μl
Μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους (LIZ)	0,2 μl
Σύνολο	9,2 μl
Προϊόν PCR	0,7 μl

Αξιολόγηση αποτελεσμάτων MLPA Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Coffalyser.Net της εταιρείας MRC Holland. Το σχετικό σήμα για κάθε ανιχνευτή υπολογίζεται διαιρώντας το εμβαδόν της καμπύλης που καταγράφεται για το προϊόν της PCR του συγκεκριμένου ανιχνευτή, με το σύνολο των εμβαδών των καμπύλων που καταγράφονται για όλους τους ανιχνευτές στο δείγμα, και εκφράζεται ως πολλαπλάσιο του σχετικού σήματος του ίδιου ανιχνευτή σε ένα φυσιολογικό δείγμα ελέγχου. Οπότε για δείγμα με φυσιολογικό αριθμό αντιγράφων η αναλογία (ratio) είναι 1, για ομόζυγη έλλειψη είναι 0, για ετερόζυγη έλλειψη είναι 0,5 και για διπλασιασμό είναι 1,5.

Η ταξινόμηση των παραλλαγών αριθμού αντιγράφου πραγματοποιήθηκε με βάση τις κατευθυντήριες οδηγίες του ACMG [226, 227] και τα επιμέρους κριτήρια όπως αυτά αναγράφονται στον Πίνακα 13. Κάθε παραλλαγή απέκτησε ένα αριθμό ο οποίος ονομάζεται «σκορ» που προέκυψε από τον συνδυασμό των επιμέρους κριτηρίων και τελικά οδήγησε στην αξιολόγηση της παραλλαγής ως «Παθολόγος» με σκορ $\geq 0,99$, «Πιθανώς παθολόγος» με σκορ από 0,90 έως 0,98, «Αγνώστου κλινικής σημασίας» με σκορ -0,89 έως 0,89, «Πιθανώς καλοήθης» με σκορ -0,90 έως -0,98 και τέλος «Καλοήθης» με σκορ $\leq -0,99$.

Πίνακας 13: Κριτήρια ACMG για την κατηγοριοποίηση παραλλαγών αριθμού αντιγράφων και περιπτώσεις εφαρμογής τους.

Τάξη Κριτηρίου	Κριτήριο και περιπτώσεις εφαρμογής για ελλείμματα	Κριτήριο και περιπτώσεις εφαρμογής για διπλασιασμούς
1: Γενωμικό περιεχόμενο	1A Εμπεριέχει γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή άλλα σημαντικά για τη λειτουργία του οργανισμού στοιχεία (σکور=0).	1A Εμπεριέχει γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή άλλα σημαντικά για τη λειτουργία του οργανισμού στοιχεία (σکور=0).
	1B Δεν εμπεριέχει γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή άλλα σημαντικά για τη λειτουργία του οργανισμού στοιχεία (σکور=-0,60).	1B Δεν εμπεριέχει γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή άλλα σημαντικά για τη λειτουργία του οργανισμού στοιχεία (σکور=-0,60).
2: Επικάλυψη με περιοχές που επηρεάζονται από απλοανεπάρκεια ή τριπλοευαισθησία	2A Πλήρης επικάλυψη, το γονίδιο ή η γενωμική περιοχή που χαρακτηρίζεται από απλοανεπάρκεια εμπεριέχεται πλήρως στην παρατηρούμενη αλλαγή αριθμού αντιγράφων (σکور=1).	2A Πλήρης επικάλυψη, το γονίδιο ή η γενωμική περιοχή που χαρακτηρίζεται από τριπλοευαισθησία εμπεριέχεται πλήρως στην παρατηρούμενη αλλαγή αριθμού αντιγράφων (σکور=1).
	2B Μερική επικάλυψη, το γονίδιο ή η γενωμική περιοχή που χαρακτηρίζεται από απλοανεπάρκεια δεν εμπεριέχεται στην παρατηρούμενη αλλαγή αριθμού αντιγράφων ή είναι άγνωστο αν πλήττονται το γονίδιο ή η γενωμική περιοχή ή δεν έχει εντοπιστεί το γονίδιο ή η γενωμική περιοχή που επηρεάζονται από απλοανεπάρκεια (σکور=0).	2B Μερική επικάλυψη, το γονίδιο ή η γενωμική περιοχή που χαρακτηρίζεται από τριπλοευαισθησία δεν εμπεριέχεται στην παρατηρούμενη αλλαγή αριθμού αντιγράφων ή είναι άγνωστο αν πλήττονται το γονίδιο ή η γενωμική περιοχή ή δεν έχει εντοπιστεί το γονίδιο ή η γενωμική περιοχή που επηρεάζονται από τριπλοευαισθησία (σکور=0).
	2C-1 Μερική επικάλυψη με το 5' άκρο ενός γονιδίου που επηρεάζεται από απλοανεπάρκεια και εμπεριέχεται η κωδική αλληλουχία (σکور=1).	2C Η παρατηρούμενη αλλαγή αριθμού αντιγράφων έχει ίδιο γενωμικό περιεχόμενο με γνωστή καλοήθη παραλλαγή αριθμού αντιγράφων (σکور= -1).
	2C-1 Μερική επικάλυψη με το 5' άκρο ενός γονιδίου που επηρεάζεται από απλοανεπάρκεια και εμπεριέχεται μόνο η αλληλουχία του 5' άκρου (σکور=0,45).	
	2D-1 Μερική επικάλυψη με το 3' άκρο ενός γονιδίου που επηρεάζεται από απλοανεπάρκεια και εμπεριέχεται μόνο η αλληλουχία του 3' αμετάφραστου άκρου (σکور=0).	2D Η παρατηρούμενη αλλαγή αριθμού αντιγράφων έχει μικρότερο γενωμικό περιεχόμενο συγκριτικά με γνωστή καλοήθη παραλλαγή αριθμού αντιγράφων αλλά θα σημεία θραύσης δεν επηρεάζουν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (σکور= -1).
	2D-2 Μερική επικάλυψη με το 3' άκρο ενός γονιδίου που επηρεάζεται από απλοανεπάρκεια και εμπεριέχεται μόνο το τελευταίο εξόνιο στο οποίο έχουν περιγραφεί παθολόγες παραλλαγές (σکور=0,90).	
	2D-3 Μερική επικάλυψη με το 3' άκρο ενός γονιδίου που επηρεάζεται από απλοανεπάρκεια και εμπεριέχεται μόνο το τελευταίο εξόνιο στο οποίο έχουν δεν έχουν περιγραφεί παθολόγες παραλλαγές (σکور=0,30).	
	2D-4 Μερική επικάλυψη με το 3' άκρο ενός γονιδίου που επηρεάζεται από απλοανεπάρκεια και εμπεριέχεται το τελευταίο εξόνιο καθώς και άλλα εξώνια (σکور=0,90).	

	<p>2E Και τα δύο σημεία θραύσης εντοπίζονται στο ίδιο γονίδιο (σκορ=0-0.90 ανάλογα με το γονίδιο).</p> <p>2F Η παρατηρούμενη αλλαγή αριθμού αντιγράφων έχει ίδιο γενωμικό περιεχόμενο με γνωστή καλοήγη παραλλαγή αριθμού αντιγράφων (σκορ=-1).</p> <p>2G Η παρατηρούμενη αλλαγή αριθμού αντιγράφων έχει μεγαλύτερο γενωμικό περιεχόμενο συγκριτικά με γνωστή καλοήγη παραλλαγή αριθμού αντιγράφων (σκορ=0).</p> <p>2H Δύο ή περισσότερα προγράμματα εκτίμησης απλοανεπάρκειας υποδεικνύουν ότι τουλάχιστον ένα από τα γονίδια που εμπεριέχονται επηρεάζεται από απλοανεπάρκεια (σκορ=0,15).</p>	<p>2E Η παρατηρούμενη αλλαγή αριθμού αντιγράφων έχει μικρότερο γενωμικό περιεχόμενο συγκριτικά με γνωστή καλοήγη παραλλαγή αριθμού αντιγράφων και θα σημεία θραύσης πιθανώς να διαταράσσουν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (σκορ=0).</p> <p>2F Η παρατηρούμενη αλλαγή αριθμού αντιγράφων έχει μεγαλύτερο γενωμικό περιεχόμενο συγκριτικά με γνωστή καλοήγη παραλλαγή αριθμού αντιγράφων αλλά δεν εμπεριέχει επιπρόσθετα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (σκορ= -1).</p> <p>2G Η παρατηρούμενη αλλαγή αριθμού αντιγράφων έχει μεγαλύτερο γενωμικό περιεχόμενο συγκριτικά με γνωστή καλοήγη παραλλαγή αριθμού αντιγράφων (σκορ=0).</p> <p>2H Εντός της παρατηρούμενης αλλαγής αριθμού αντιγράφων υπάρχει γονίδιο που επηρεάζεται από απλοανεπάρκεια (σκορ=0).</p> <p>2I Τα σημεία θραύσης εντοπίζονται εντός του ίδιου γονιδίου (σκορ=0-0.90 ανάλογα με το γονίδιο).</p> <p>2J Το ένα σημείο θραύσης βρίσκεται εντός γονιδίου που επηρεάζεται από απλοανεπάρκεια, ο φαινότυπος του ασθενούς δεν είναι συμβατός με τον αναμενόμενο για παραλλαγή απώλειας λειτουργίας του γονιδίου ή είναι άγνωστος (σκορ=0).</p> <p>2K Το ένα σημείο θραύσης βρίσκεται εντός γονιδίου που επηρεάζεται από απλοανεπάρκεια, ο φαινότυπος του ασθενούς είναι πολύ ειδικός και συνάδει με τον αναμενόμενο για παραλλαγή απώλειας λειτουργίας του γονιδίου (σκορ=0,45).</p> <p>2L Το ένα ή και τα δύο σημεία θραύσης βρίσκονται εντός γονιδίου ή γονιδίων με άγνωστη κλινική σημασία (σκορ=0).</p>
3: Αριθμός γονιδίων	<p>3A Εμπεριέχει 0-24 γονίδια (ολόκληρα ή τμήματά τους) που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (σκορ=0).</p> <p>3B Εμπεριέχει 25-34 γονίδια (ολόκληρα ή τμήματά τους) που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (σκορ=0,45).</p> <p>3C Εμπεριέχει ≥ 35 γονίδια (ολόκληρα ή τμήματά τους) που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (σκορ=0,90).</p>	<p>3A Εμπεριέχει 0-34 γονίδια (ολόκληρα ή τμήματά τους) που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (σκορ=0).</p> <p>3B Εμπεριέχει 35-49 γονίδια (ολόκληρα ή τμήματά τους) που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (σκορ=0,45).</p> <p>3C Εμπεριέχει ≥ 50 γονίδια (ολόκληρα ή τμήματά τους) που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (σκορ=0,90).</p>
4: Ανεύρεση σε άλλους ασθενείς στη βιβλιογραφία ή σε βάσεις δεδομένων	<p>4A Ο φαινότυπος είναι πολύ ειδικός και σχετικά μοναδικός για το συγκεκριμένο γονίδιο ή γενωμική περιοχή (σκορ=0,45 εάν είναι <i>de novo</i> ή 0,30 αν θεωρείται <i>de novo</i> χωρίς εργαστηριακή επιβεβαίωση).</p> <p>4B Ο φαινότυπος είναι ειδικός αλλά όχι μοναδικός για το συγκεκριμένο γονίδιο ή γενωμική περιοχή (σκορ=0,30 εάν είναι <i>de novo</i> ή 0,15 αν θεωρείται <i>de novo</i> χωρίς εργαστηριακή επιβεβαίωση).</p> <p>4C Παρατηρείται συσχέτιση γονοτύπου-φαινοτύπου αλλά ο φαινότυπος δεν είναι μοναδικός ή καταγράφεται μεγάλη φαινοτυπική ετερογένεια για το συγκεκριμένο</p>	<p>4A Ο φαινότυπος είναι πολύ ειδικός και σχετικά μοναδικός για το συγκεκριμένο γονίδιο ή γενωμική περιοχή (σκορ=0,45 εάν είναι <i>de novo</i> ή 0,30 αν θεωρείται <i>de novo</i> χωρίς εργαστηριακή επιβεβαίωση).</p> <p>4B Ο φαινότυπος είναι ειδικός αλλά όχι μοναδικός για το συγκεκριμένο γονίδιο ή γενωμική περιοχή (σκορ=0,30 εάν είναι <i>de novo</i> ή 0,15 αν θεωρείται <i>de novo</i> χωρίς εργαστηριακή επιβεβαίωση).</p> <p>4C Παρατηρείται συσχέτιση γονοτύπου-φαινοτύπου αλλά ο φαινότυπος δεν είναι μοναδικός ή καταγράφεται μεγάλη φαινοτυπική ετερογένεια για το συγκεκριμένο γονίδιο ή γενωμική περιοχή</p>

	γονίδιο ή γενωμική περιοχή (σκορ=0,15 εάν είναι <i>de novo</i> ή 0,10 αν θεωρείται <i>de novo</i> χωρίς εργαστηριακή επιβεβαίωση).	(σκορ=0,15 εάν είναι <i>de novo</i> ή 0,10 αν θεωρείται <i>de novo</i> χωρίς εργαστηριακή επιβεβαίωση).
	4D Δεν παρατηρείται συσχέτιση γονοτύπου-φαινοτύπου (σκορ=0).	4D Δεν παρατηρείται συσχέτιση γονοτύπου-φαινοτύπου (σκορ=0).
	4E Ο φαινότυπος είναι ειδικός αλλά το πρότυπο κληρονόμησης είναι άγνωστο (σκορ=0,10).	4E Ο φαινότυπος είναι ειδικός αλλά το πρότυπο κληρονόμησης είναι άγνωστο (σκορ=0).
	4F Παρατηρείται σε 3-4 συγγένειες (segregations) εντός της ίδιας οικογένειας (σκορ=0,15).	4F Παρατηρείται σε 3-4 συγγένειες (segregations) εντός της ίδιας οικογένειας (σκορ=0,15).
	4G Παρατηρείται σε 5-6 συγγένειες εντός της ίδιας οικογένειας (σκορ=0,30).	4G Παρατηρείται σε 5-6 συγγένειες εντός της ίδιας οικογένειας (σκορ=0,30).
	4H Παρατηρείται σε ≥ 7 συγγένειες εντός της ίδιας οικογένειας (σκορ=0,45).	4H Παρατηρείται σε ≥ 7 συγγένειες εντός της ίδιας οικογένειας (σκορ=0,45).
	4I Δεν ανιχνεύεται σε άλλον πάσχοντα της ίδιας οικογένειας με προϋπόθεση καλά περιγεγραμμένους φαινοτύπους (σκορ= -0,45).	4I Δεν ανιχνεύεται σε άλλον πάσχοντα της ίδιας οικογένειας με προϋπόθεση καλά περιγεγραμμένους φαινοτύπους (σκορ= -0,45).
	4J Ανιχνεύεται σε ασυμπτωματικό άτομο της οικογένειας με προϋπόθεση καλά περιγεγραμμένο φαινότυπο στον ασθενή αναφοράς (σκορ= -0,30).	4J Ανιχνεύεται σε ασυμπτωματικό άτομο της οικογένειας με προϋπόθεση καλά περιγεγραμμένο φαινότυπο στον ασθενή αναφοράς (σκορ= -0,30).
	4K Ανιχνεύεται σε ασυμπτωματικό άτομο της οικογένειας με τον ασθενή αναφοράς να εμφανίζει μη ειδικό φαινότυπο (σκορ= -0,15).	4K Ανιχνεύεται σε ασυμπτωματικό άτομο της οικογένειας με τον ασθενή αναφοράς να εμφανίζει μη ειδικό φαινότυπο (σκορ= -0,15).
	4L Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ περιστατικών με ειδικό καλά περιγεγραμμένο φαινότυπο σε σχέση με δείγματα ελέγχου (σκορ=0,45).	4L Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ περιστατικών με ειδικό καλά περιγεγραμμένο φαινότυπο σε σχέση με δείγματα ελέγχου (σκορ=0,45).
	4M Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ περιστατικών με μη ειδικό ή άγνωστο φαινότυπο σε σχέση με δείγματα ελέγχου (σκορ=0,30).	4M Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ περιστατικών με μη ειδικό ή άγνωστο φαινότυπο σε σχέση με δείγματα ελέγχου (σκορ=0,30).
	4N Μη σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ περιστατικών σε σχέση με δείγματα ελέγχου (σκορ= -0,90).	4N Μη σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ περιστατικών σε σχέση με δείγματα ελέγχου (σκορ= -0,90).
	4O Αλληλοεπικάλυψη με κοινές παραλλαγές του γενικού πληθυσμού (σκορ= -1).	4O Αλληλοεπικάλυψη με κοινές παραλλαγές του γενικού πληθυσμού (σκορ= -1).
5:Πρότυπο κληρονόμησης	5A <i>De novo</i> (σκορ σύμφωνα με τα κριτήρια 4A-4D).	5A <i>De novo</i> (σκορ σύμφωνα με τα κριτήρια 4A-4D).
	5B Κληρονομούμενο από υγιή γονέα σε ασθενή με ειδικό καλά περιγεγραμμένο φαινότυπο (σκορ= -0,30).	5B Κληρονομούμενο από υγιή γονέα σε ασθενή με ειδικό καλά περιγεγραμμένο φαινότυπο (σκορ= -0,30).
	5C Κληρονομούμενο από υγιή γονέα σε ασθενή με μη ειδικό φαινότυπο (σκορ= -0,15).	5C Κληρονομούμενο από υγιή γονέα σε ασθενή με μη ειδικό φαινότυπο (σκορ= -0,15).
	5D Η παραλλαγή αριθμού αντιγράφων παρατηρείται μόνο στα άτομα που έχουν φαινότυπο (σκορ σύμφωνα με τα κριτήρια 4F-4H).	5D Η παραλλαγή αριθμού αντιγράφων παρατηρείται μόνο στα άτομα που έχουν φαινότυπο (σκορ σύμφωνα με τα κριτήρια 4F-4H).
	5E Η παραλλαγή αριθμού αντιγράφων δεν παρατηρείται μόνο στα άτομα της οικογένειας που έχουν φαινότυπο (σκορ σύμφωνα με τα κριτήρια 4I-4K).	5E Η παραλλαγή αριθμού αντιγράφων δεν παρατηρείται μόνο στα άτομα της οικογένειας που έχουν φαινότυπο (σκορ σύμφωνα με τα κριτήρια 4I-4K).
	5F Μη διαθέσιμα ή μη πληροφοριακά στοιχεία για τρόπο κληρονόμησης (σκορ=0).	5F Μη διαθέσιμα ή μη πληροφοριακά στοιχεία για τρόπο κληρονόμησης (σκορ=0).

	5G Μη διαθέσιμα ή μη πληροφοριακά στοιχεία για τρόπο κληρονόμησης, σε ασθενή με φαινότυπο μη ειδικό ο οποίος όμως συνάδει με ότι περιγράφεται σε παρόμοιες περιπτώσεις (σκορ=0,10).	5G Μη διαθέσιμα ή μη πληροφοριακά στοιχεία για τρόπο κληρονόμησης, σε ασθενή με φαινότυπο μη ειδικό ο οποίος όμως συνάδει με ότι περιγράφεται σε παρόμοιες περιπτώσεις (σκορ=0,10).
	5H Μη διαθέσιμα ή μη πληροφοριακά στοιχεία για τρόπο κληρονόμησης, σε ασθενή με ειδικό φαινότυπο ο οποίος συνάδει με ότι περιγράφεται σε παρόμοιες περιπτώσεις (σκορ=0,30).	5H Μη διαθέσιμα ή μη πληροφοριακά στοιχεία για τρόπο κληρονόμησης, σε ασθενή με ειδικό φαινότυπο ο οποίος συνάδει με ότι περιγράφεται σε παρόμοιες περιπτώσεις (σκορ=0,10).

3.2.5 Μελέτη πρότυπου απενεργοποίησης X χρωμοσώματος (X-inactivation)

Η απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος στα θήλεα περιγράφηκε πρώτη φορά το 1961 από την Βρετανή Γενετίστρια Mary Frances Lyon η οποία για να εξηγήσει την εξισορρόπηση της γονιδιακής δόσης μεταξύ θήλεων με δύο X χρωμοσώματα και άρρενων με ένα X, στα θήλεα μελέτησε τον μηχανισμό με τον οποίο ένα από τα δύο X αλληλόμορφα απενεργοποιείται και δεν εκφράζεται. Για την επίτευξη της γονιδιακής αποσιώπησης πραγματοποιείται συνήθως μεθυλίωση του DNA με αποτέλεσμα τα θήλεα άτομα να εμφανίζουν μωσαϊκό πρότυπο ενεργών και ανενεργών X χρωμοσωμάτων σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού τους. Η διαδικασία της απενεργοποίησης συμβαίνει τυχαία, δεν είναι καθολική για ολόκληρο το ένα χρωμόσωμα και δεν υπάρχει προτιμώμενο (σύμφωνα με τη γονεϊκή του προέλευση) για απενεργοποίηση αλληλόμορφο. Επιπρόσθετα παρατηρείται ιστοειδικότητα και κάθε μελετούμενος ιστός του ίδιου ατόμου μπορεί να παρουσιάζει διαφορετικό πρότυπο. Σε υγιή θήλεα επιλεκτική απενεργοποίηση του ενός X χρωμοσώματος σε επίπεδα που ξεπερνάνε το 80% παρατηρείται σε ποσοστό 8-10% των ατόμων του γενικού πληθυσμού, ενώ σε υψηλότερα (>90%) σε ποσοστό ~2% [169].

Η μελέτη του πρότυπου απενεργοποίησης σε θήλεα άτομα πραγματοποιείται στην κλινική πράξη για την πιθανή εξήγηση διαφορετικών κλινικών εκδηλώσεων ανάμεσα σε θήλεα φορείς για φυλοσύνδετα επικρατητικά νοσήματα.

Ο προσδιορισμός του πρότυπου απενεργοποίησης του X χρωμοσώματος αρχικά ακολουθούσε μόνο την μέθοδο HUMARA (HUMAN Androgen Receptor Assay) που αφορά το πρότυπο μεθυλίωσης της επαναλαμβανόμενης πολυμορφικής τρινουκλεοτιδικής επανάληψης CAG του εξονίου 1 του γονιδίου του υποδοχέα των ανδρογόνων (AR) που εδράζεται στο X χρωμόσωμα και θεωρείται ότι αντικατοπτρίζει

το πρότυπο απενεργοποίησης όλου του χρωμοσώματος X. Πλέον η μελέτη έχει επεκταθεί και σε άλλες περιοχές του X χρωμοσώματος, ιδανικά αυτές που εμπλέκονται στην εκάστοτε νόσο, με προϋποθέσεις να είναι εξαιρετικά πολυμορφικές στον πληθυσμό (ώστε να μπορούν να διαχωριστούν τα δύο διαφορετικά X αλληλόμορφα), να υπόκεινται σε μεθυλίωση και να έχουν αλληλουχία η οποία είναι στόχος για πέψη από περιοριστικές ενδονουκλεάσες ευαίσθητες στη μεθυλίωση.

Η μελέτη του προτύπου απενεργοποίησης του X χρωμοσώματος, για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας, εφαρμόστηκε σε δείγματα που περιλάμβαναν:

1. θήλεα με παθολόγο παραλλαγή στο γονίδιο *MECP2* και μεγάλη κλινική ετερογένεια,
2. θήλυ με παθολόγο παραλλαγή εντός του γονιδίου *ARX* και κλινική εικόνα συμβατή με φυλοσύνδετο υπολειπόμενο σύνδρομο Ohtahara για να διαπιστωθεί αν είναι συμπτωματική φορέας (manifesting carrier),
3. ασυμπτωματική μητέρα με παθολόγο παραλλαγή εντός του γονιδίου *ARX* η οποία είχε αποκτήσει δύο άρρενες πάσχοντες απογόνους,
4. θήλεα με παθολόγες παραλλαγές του γονιδίου *PCDH19* και μεγάλη κλινική ετερογένεια.

Τα στάδια της μεθόδου συνοψίζονται στα εξής: πέψη γενωμικού DNA με περιοριστικό ένζυμο ευαίσθητο σε μεθυλίωση (πέψη αλληλουχιών που δεν έχουν μεθυλομάδες) ή εξαρτώμενο από μεθυλίωση (πέψη αλληλουχιών με μεθυλομάδες), εφαρμογή PCR με ζεύγος εκκινητών, που περικλείει την περιοχή ενδιαφέροντος με τις διαφορετικά μεθυλωμένες περιοχές και τις πολυμορφικές επαναλήψεις και με έναν εκκινητή σημασμένο, και ανάλυση των παραγόμενων θραυσμάτων με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση σε αυτόματο αναλυτή ABI3500. Σημειώνεται ότι κάθε δείγμα μελετήθηκε συγκριτικά πριν και μετά την πέψη και σε κάθε δοκιμασία υπήρχε δείγμα άρρενος για τον έλεγχο της ποιότητας της πέψης (καθότι οι άρρενες έχουν ένα X χρωμόσωμα μετά την πέψη το DNA τους θα είναι κατακερματισμένο και δεν θα μπορεί να πολλαπλασιαστεί). Επιπρόσθετα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αλβουμίνης 10% (BSA, Bovine Serum Albumin) για την αποφυγή απώλειας ποσότητας ενζύμου κατά την παρασκευή του μίγματος για την πέψη.

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ευαίσθητες σε μεθυλίωση περιοριστικές ενδονουκλεάσες HhaI και HpaII της εταιρείας New England Biolabs. Οι πολυμορφικές επαναλήψεις, τα γονίδια και οι χρωμοσωμικές θέσεις που μελετήθηκαν για την αξιολόγηση του προτύπου απενεργοποίησης περιλάμβαναν την επανάληψη CAG γονίδιο *AR* στη θέση Xq12, την CGG στο γονίδιο *FMR1* στη θέση Xq27.3 και την CA/AG στο γονίδιο *PCSK1N* στη θέση Xp11.23. Η πέψη για τα γονίδια *AR* και *FMR1* πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο HhaI ενώ για το γονίδιο *PCSK1N* με το ένζυμο HpaII. Η στοιχειομετρία των αντιδράσεων πέψης και PCR και οι θέσεις αναγνώρισης των ενζύμων αναφέρονται στους Πίνακες 14 - 16. Επισημαίνεται ότι οι αναγραφόμενες ποσότητες αφορούν ένα δείγμα και η μελέτη των δειγμάτων πριν και μετά την πέψη πραγματοποιήθηκε σε δύο ξεχωριστές αντιδράσεις PCR.

Πίνακας 14: Πρωτόκολλο πέψης για τα γονίδια *AR* και *FMR1*.

Πρωτόκολλο πέψης για τα γονίδια <i>AR</i> και <i>FMR1</i>	
HhaI	1 μl
Cutsmart Buffer	1 μl
Bovine Serum Albumine 10%	0,06 μl
H ₂ O	5 μl
Σύνολο	7,06 μl
Γενωμικό DNA	3 μl
Συνθήκες	1 ώρα στους 37°C
Θέση αναγνώρισης κοπής ενζύμου	5'...GCGC...3' 3'...CGC...5'

Πίνακας 15: Πρωτόκολλο πέψης για το γονίδιο *PCSK1N*.

Πρωτόκολλο πέψης για το γονίδιο <i>PCSK1N</i>	
HpaII	1 μl
Cutsmart Buffer	1 μl
Bovine Serum Albumine 10%	0,06 μl
H ₂ O	5 μl
Σύνολο	7,06 μl
Γενωμικό DNA	3 μl
Συνθήκες	1 ώρα στους 37°C
Θέση αναγνώρισης κοπής ενζύμου	5'...C [▼] CGG...3' 3'...GGC [▲] ...5'

Πίνακας 16: Πρωτόκολλο PCR για τα γονίδια *AR*, *PCSK1N* και *FMR1*.

	Πρωτόκολλο PCR για το γονίδιο <i>AR</i>	Πρωτόκολλο PCR για το γονίδιο <i>PCSK1N</i>	Πρωτόκολλο PCR για το γονίδιο <i>FMR1</i>
Πολυμεράση MMΤαq της εταιρείας Qiagen	5 μl	5 μl	5 μl
Q solution	1 μl	1 μl	1 μl
7-deaza-dGTP	0,25 μl	0,25 μl	0,5 μl
DMSO	1 μl	1 μl	1 μl
H ₂ O	1 μl	1 μl	3 μl
FAM-Forward εκκινητής	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl
Reverse εκκινητής	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl
Σύνολο	9,25 μl	9,25 μl	11,5 μl
Γενωμικό DNA	1 μl	1 μl	1 μl
Προϊόν πέψης	3 μl	3 μl	3 μl
Συνθήκες αντίδρασης	95°C για 15 λεπτά 95°C για 1 λεπτό 58°C για 1 λεπτό 72°C για 1 λεπτό 72°C για 10 λεπτά 4°C μέχρι την απομάκρυνση της αντίδρασης από το μηχάνημα } για 32 κύκλους		95°C για 15 λεπτά 98°C για 2 λεπτά 96°C για 1 λεπτό 60°C για 2 λεπτά 72°C για 2 λεπτά 94°C για 45 δευτερόλεπτα 60°C για 1 λεπτό 60°C για 2 λεπτά 72°C για 2 λεπτά 72°C για 15 λεπτά 4°C μέχρι την απομάκρυνση της αντίδρασης από το μηχάνημα } για 15 κύκλους } για 21 κύκλους

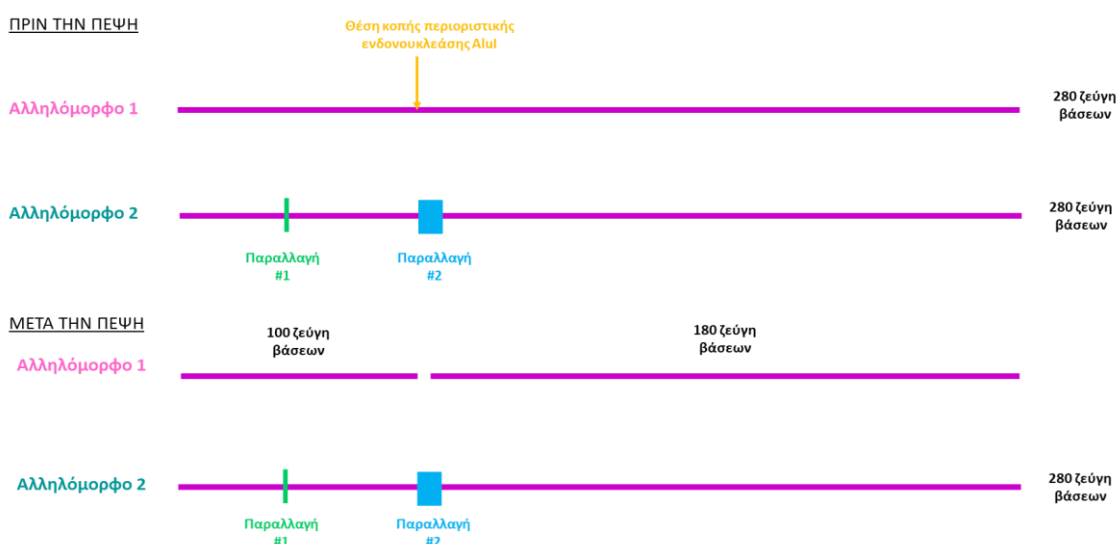
Αφότου ολοκληρώθηκε η διαδικασία της PCR ακολούθησε τριχοειδής ηλεκτροφόρηση στον αυτόματο αναλυτή.

3.2.6 Μελέτη της διάταξης παραλλαγών σε θήλυ ασθενή με δυο παθογόνες παραλλαγές στο γονίδιο *MECP2*

Ενδιαφέρον παρουσίασε η περίπτωση θήλεος ασθενούς με δύο εκ νέου πλαισιοτροπικές παθογόνες παραλλαγές σε κοντινές θέσεις στο ίδιο εξόνιο του γονιδίου *MECP2*. Για την μελέτη της διάταξης των παραλλαγών και τον χαρακτηρισμό τους σε *in cis* (στο ίδιο X χρωμόσωμα) ή *in trans* (στα δύο διαφορετικά X

χρωμοσώματα) τυποποιήθηκε πρωτόκολλο που περιλάμβανε PCR, πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση, ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, απομόνωση των θραυσμάτων DNA από το πήκτωμα και αλληλούχηση.

Η πειραματική διαδικασία που ακολούθησε συνοψίζεται ως εξής με τη χρήση εκκινητών πολλαπλασιάστηκε τμήμα του εξονίου 4 του γονιδίου *MECP2* μεγέθους 280 ζευγών βάσεων στο οποίο εμπεριέχονταν και οι δύο παραλλαγές. Ακολούθησε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *AluI* της εταιρείας New England Biolabs το οποίο έχει μόνο μία θέση αναγνώρισης κοπής στην φυσιολογική αλληλουχία η οποία καταργείται με την ύπαρξη της δεύτερης παραλλαγής, οπότε υποθέτοντας ότι οι παραλλαγές είναι σε διάταξη *cis* μετά την πέψη λαμβάνονται δύο προϊόντα για την φυσιολογική αλληλουχία και ένα άκοπο προϊόν για την αλληλουχία με τις παραλλαγές. Σχηματική απεικόνιση του αποτελέσματος της πέψης αποδίδεται στην Εικόνα 34. Η υπόθεση ότι οι παραλλαγές είναι σε *cis* διάταξη πραγματοποιήθηκε με βάση ότι το νόσημα είναι φυλοσύνδετο επικρατητικό και η μη ύπαρξη φυσιολογικού αλληλομόρφου του γονιδίου *MECP2* δεν είναι συμβατή με τη ζωή γνώση που ανάγεται και από την απουσία άρρενων ασθενών με καρυότυπο 46,XY και ημίζυγες παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες σημειακές παραλλαγές εντός του γονιδίου. Ακολούθησε απομόνωση των θραυσμάτων από το πήκτωμα και αλληλούχηση τους.



Εικόνα 34: Απεικόνιση των αναμενόμενων αποτελεσμάτων μετά την πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *AluI* παρουσία των παραλλαγών σε *cis* διάταξη.

Η στοιχειομετρία της αντίδρασης PCR και πέψης αναγράφονται στους Πίνακες 17, 18 και αφορά ποσότητα για ένα δείγμα. Σημειώνεται ότι για τον έλεγχο της πέψης χρησιμοποιήθηκε και δείγμα αναφοράς από θήλυ χωρίς παραλλαγές εντός της περιοχής ενδιαφέροντος.

Πίνακας 17: Πρωτόκολλο PCR για την περιοχή ενδιαφέροντος του γονιδίου *MECP2*.

Πρωτόκολλο PCR για το γονίδιο <i>MECP2</i>	
Πολυμεράση HSTaq της εταιρείας Qiagen	5 μl
H ₂ O	7 μl
Forward εκκινητής	1 μl
Reverse εκκινητής	1 μl
Σύνολο	14 μl
Γενωμικό DNA	1 μl
Συνθήκες αντίδρασης	95°C για 5 λεπτά 95°C για 1 λεπτό 58°C για 1 λεπτό 72°C για 1 λεπτό 72°C για 10 λεπτά 4°C μέχρι την απομάκρυνση της αντίδρασης από το μηχάνημα } για 32 κύκλους

Πίνακας 18: Πρωτόκολλο πέψης για την περιοχή ενδιαφέροντος του γονιδίου *MECP2*.

Πρωτόκολλο πέψης για την περιοχή ενδιαφέροντος του γονιδίου <i>MECP2</i>	
AluI	2 μl
Buffer	2 μl
Bovine Serum Albumine 10%	0,6 μl
H ₂ O	5,4 μl
Σύνολο	10 μl
Προϊόν PCR	10 μl
Συνθήκες	Αφέθηκε ολονύχτια στους 37°C
Θέση αναγνώρισης κοπής ενζύμου	5'... AGCT ... 3' 3'... TCGA ... 5'

Για την απομόνωση των προϊόντων πέψης από το πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το kit QIAquick Gel extraction της εταιρείας Qiagen, ένα υδατόλουτρο και μια φυγόκεντρος για σωληνάρια 1,5ml. Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε ήταν η εξής:

1. Τα προϊόντα της πέψης έγιναν ορατά μετά την έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία, αποκόπηκαν με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού και μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια όγκου 1,5ml.
2. Ακολούθησε μέτρηση βάρους των κομμένων τμημάτων σε ζυγό ακριβείας και προστέθηκαν 3 όγκοι διαλύματος QG για κάθε 1 όγκο πηκτώματος (το βάρος του άδειου σωληναρίου ήταν 1,03 γραμμάρια και του γεμάτου με κομμάτι πηκτώματος 1,08 γραμμάρια η διαφορά είναι 0,05 γραμμάρια ή 50mg που αντιστοιχούν σε 50 μl οπότε για αυτό το τμήμα χρειάστηκαν $50 \times 3 = 150$ μl διάλυμα QG).
3. Τα δείγματα επώαστηκαν σε υδατόλουτρο για 10 λεπτά στους 50°C με σκοπό την διαλυτοποίηση του πηκτώματος αгарόζης. Ενδιάμεσα πραγματοποιήθηκαν αναδεύσεις με χρήση vortex. Ως δείκτης της διαλυτοποίησης του πηκτώματος χρησιμοποιείται το χρώμα του διαλύματος το οποίο θα πρέπει να γίνει κίτρινο.
4. Έπειτα προστέθηκε 1 όγκος πηκτώματος ισοπροπανόλη (50 μl) και πραγματοποιήθηκε ανάδευση.
5. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε ειδικά σωληνάρια-στήλες με ηθμό που παρέχονται από το κιτ.
6. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 130gpm, απορρίφθηκε το διήθημα και προστέθηκαν 500μl διαλύματος QG (για την απομάκρυνση υπολειμμάτων αгарόζης) και φυγοκέντρηση για ακόμα 1 λεπτό.
7. Για την πραγματοποίηση των πλύσεων προστέθηκαν 750μl διαλύματος PE, παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 130gpm. Απόρριψη διηθήματος. Επαναφυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 130gpm για την απομάκρυνση εναπομείναντος διαλύματος.
8. Προσθήκη 30μl διαλύματος EB (elution buffer) στον ηθμό κάθε στήλης και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έκλυση του DNA πραγματοποιήθηκε μετά από φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 130gpm.

Μετά το πέρας της απομόνωσης των προϊόντων της πέψης ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων και αντίδραση αλληλούχησης σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των ενοτήτων 3.2.3.4 και 3.2.3.5.

3.2.7 Αλληλούχηση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS)

Αλληλούχηση επόμενης γενιάς εφαρμόστηκε σε 107 ασθενείς σύμφωνα με την παραπομπή του εκάστοτε ιατρού. Έλεγχος με CES πραγματοποιήθηκε σε 9 ασθενείς των οποίων ο φαινότυπος ήταν ξεκάθαρος και υποδεικνυε την ύπαρξη συγκεκριμένου επιληπτικού συνδρόμου όπως η αυτοπεριοριζόμενη (οικογενής) νεογνική-βρεφική επιληψία με συγκεκριμένη γενετική αιτιολογία. Σε ασθενείς με σύνθετη κλινική εικόνα που δεν παρέπεμπε σε συγκεκριμένο επιληπτικό σύνδρομο επιλέχθηκε η εφαρμογή WES.

Η διαδικασία μελέτης των περιστατικών με αλληλούχηση επόμενης γενιάς περιλαμβάνει συνοπτικά τα εξής στάδια:

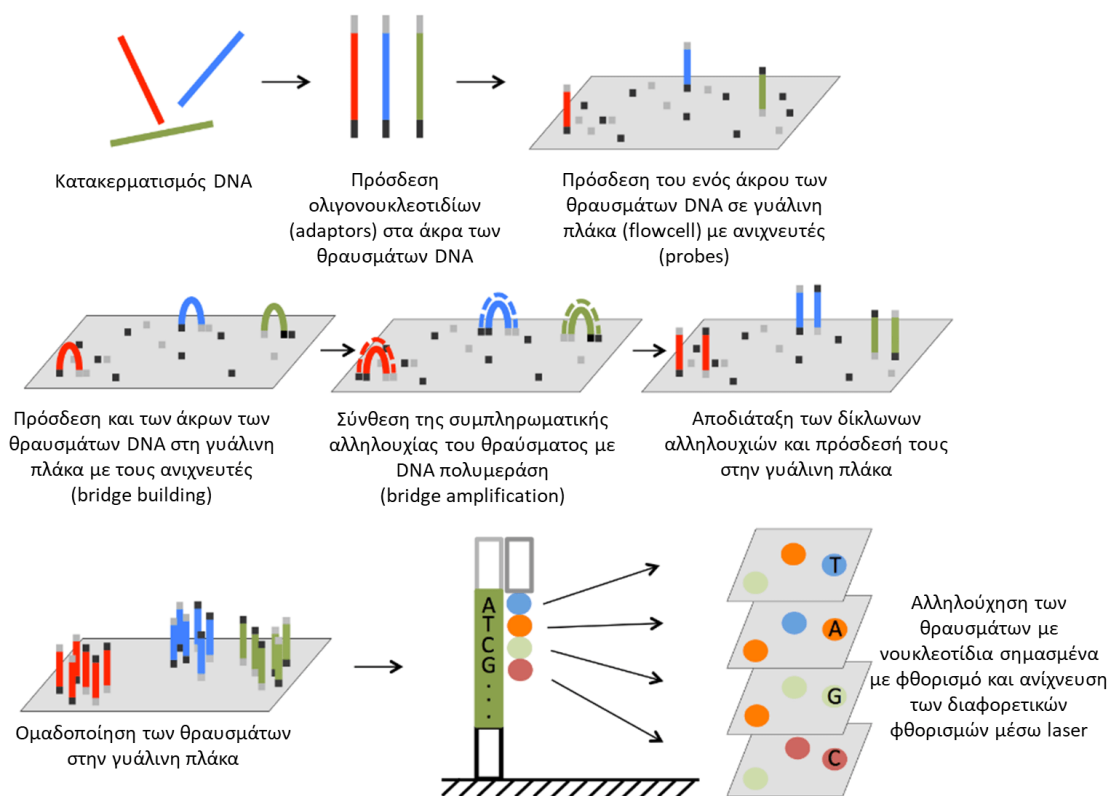
- 1)Εργαστηριακή επεξεργασία για την εφαρμογή του CES ή του WES.
- 2)Βιοπληροφορική επεξεργασία των δεδομένων που προκύπτουν.
- 3)Ερμηνεία και ταξινόμηση των παραλλαγών.
- 4)Κλινική αξιολόγηση των τελικών παραλλαγών.
- 5)Υποστήριξη ερμηνείας-αξιολόγησης των τελικών παραλλαγών με οικογενειακές μελέτες και άλλες μεθοδολογίες.

1)Εργαστηριακή επεξεργασία για την εφαρμογή του CES ή του WES.

- Απομόνωση DNA σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της ενότητας 3.2.2.
- Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος του DNA με τη χρήση συστήματος Qubit Fluorimeter της εταιρείας Invitrogen και Bioanalyzer 2100 της εταιρείας Agilent.
- Κατακερματισμός του DNA σε μικρά θραύσματα (DNA fragmentation).
- Πρόσδεση ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων (adaptors) με χρήση λιγάσης στα άκρα των θραυσμάτων. Οι αλληλουχίες αυτές είναι διαφορετικές για τα δύο άκρα ενός θραύσματος και είναι συμπληρωματικές ως προς τους ανιχνευτές της γυάλινης

πλάκας (flowcell) στην οποία συνδέονται τα θραύσματα. Επιπρόσθετα εμπεριέχουν θέσεις για την έναρξη της αλληλούχησης (sequencing binding sites).

- Κατασκευή «βιβλιοθήκης» με εμπλουτισμό μέσω >150.000 ανιχνευτών σχεδιασμένων για συγκεκριμένες εξονικές που καλύπτουν περίπου 11Mb του γονιδιώματος (114.405 εξόνια) για το CES (κιτ Nextera Rapid Capture Exome της εταιρείας Illumina και αναλυτής Illumina NextSeq-500) και >340.000 ανιχνευτές σχεδιασμένων για όλες τις εξονικές αλληλουχίες που καλύπτουν περίπου 37Mb του γονιδιώματος (214.405 εξόνια) για το WES (κιτ Nextera Rapid Capture Exome της εταιρείας Illumina ή κιτ Human Comprehensive Exome της εταιρείας Twist Bioscience ή κιτ IDT xGen Exome Research v2 της εταιρείας Integrated DNA Technologies και αναλυτής Illumina NextSeq-500). Μέσω του CES μελετήθηκαν 4.900 ειδικά επιλεγμένα γονίδια σύμφωνα με τη διεθνώς αναγνωρισμένη βάση δεδομένων HGMD (Human Gene Mutation Database, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) ενώ μέσω του WES μελετήθηκαν οι εξονικές περιοχές ~19.000 γονιδίων που αντιστοιχούν στο 99,3% των εξονίων του γονιδιώματος σύμφωνα με τη διεθνώς αναγνωρισμένη βάση δεδομένων RefSeq (Reference Sequence Database, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>).
- Ακολούθησε αλληλούχηση και ελήφθησαν εκατομμύρια μικρές αλληλουχίες - αναγνώσεις (reads) οι οποίες στοιχίστηκαν (sequence alignment) με την ανθρώπινη αλληλουχία αναφοράς (human reference genome) χρησιμοποιώντας υπολογιστικά συστήματα. Το τελικό προϊόν της στοίχισης, το οποίο εμπεριείχε ομοιότητες και διαφορές μεταξύ των δύο αλληλουχιών, κατατάχθηκε σε πίνακες και προσδιορίστηκε η εξονική αλληλουχία του εξεταζόμενου ατόμου για συγκεκριμένα γονίδια (CES) ή για όλα τα γονίδια (WES). Επιπρόσθετα ελήφθησαν πληροφορίες για την κατάσταση της παραλλαγής (ομόζυγη, ετερόζυγη ή ημίζυγη), την ποιότητα της εργαστηριακής ανάλυσης όπως το βάθος κάλυψης (depth) και τη συχνότητα μιας παραλλαγής στα reads (frequency).
- Η περάτωση των εργαστηριακών διαδικασιών των μεθοδολογιών CES και WES πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία της εξωτερικής ανάθεσης (outsourcing) στο εργαστήριο Γενότυπος Science Labs στην Αθήνα ή στο εργαστήριο NIPD Genetics στην Κύπρο και η βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής της Ιατρικής Σχολής Αθηνών.



Εικόνα 35: Σχηματική απεικόνιση της ροής εργασίας για τη διεξαγωγή αλληλούχησης επόμενης γενιάς. Αναπροσαρμογή από [228].

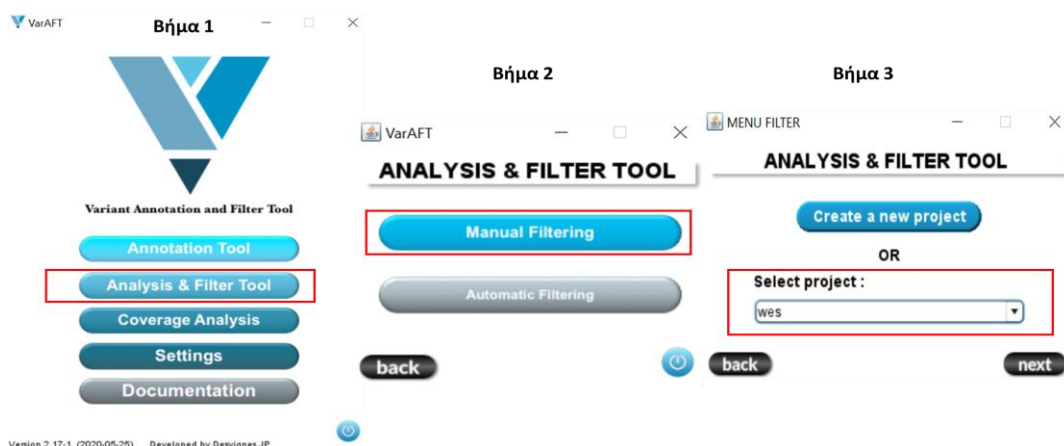
2) Βιοπληροφορική επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν από τις προαναφερθείσες μεθοδολογίες

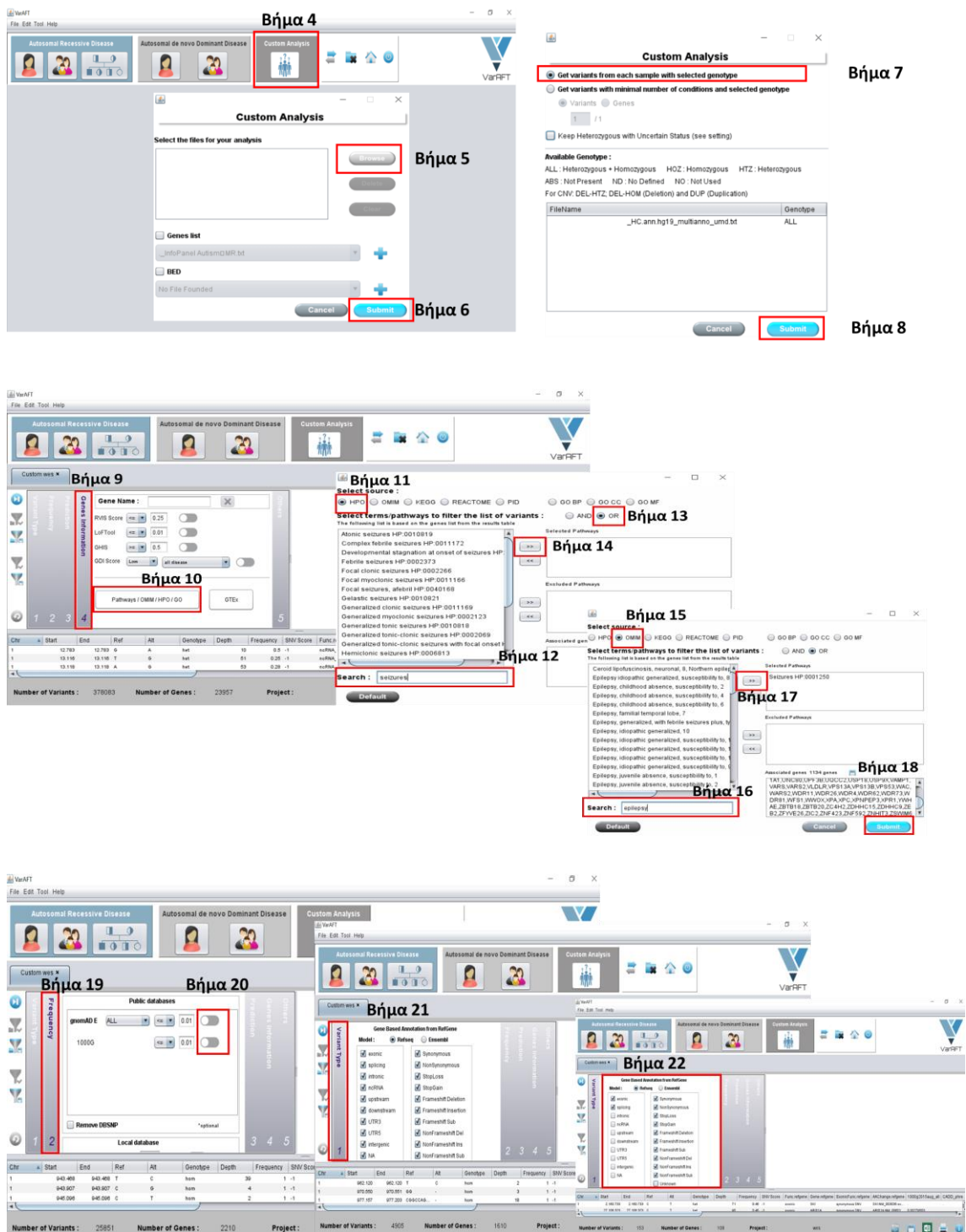
- Πραγματοποιήθηκε χρήση της πλατφόρμας SOPHiA DDM[®] της εταιρείας SOPHiA GENETICS[®] για τα δείγματα που αλληλουχήθηκαν με το kit Nextera Rapid Capture Exome με στόχο τη στοίχιση των αναγνώσεων που προέκυψαν κατά την αλληλούχηση με το γονιδίωμα αναφοράς, την ποιοτική αξιολόγηση των δεδομένων και τον προσδιορισμό των αλλαγών που εντοπίστηκαν σε κάθε δείγμα σε σύγκριση με το γονιδίωμα αναφοράς. Η βιοπληροφορική ροή εργασίας για τα δείγματα στα οποία το WES πραγματοποιήθηκε με το kit Human Comprehensive Exome πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής. Η παρούσα διατριβή εστιάζει μόνο στο φιλτράρισμα, την ταξινόμηση και την ερμηνεία των παραλλαγών που εξήχθησαν από τα προηγούμενα στάδια βιοπληροφορικής επεξεργασίας των δεδομένων.

- Η ανάλυση του βιοπληροφορικού αρχείου πραγματοποιήθηκε μέσω της εφαρμογής εφαρμογής VarAFT (<http://varaft.eu>) [229] για την αξιολόγηση και τον χαρακτηρισμό παραλλαγών (variant annotation) σύμφωνα με βάσεις δεδομένων και εργαλεία πρόβλεψης παθογονικότητας. Η συγκεκριμένη ανάλυση συμπεριέλαβε αξιολόγηση των ευρημάτων με βάση την κατηγορία της παραλλαγής, τη συχνότητα εμφάνισης στον πληθυσμό, την πρόβλεψη παθογνωμικότητας (variant prediction) και τη συσχέτιση με τον φαινότυπο χρησιμοποιώντας τις βάσεις δεδομένων γενετικής: 1000 Genome, gnomAD (ExAC), ClinVar, OMIM, ClinGen, τα *in silico* εργαλεία αξιολόγησης παραλλαγών: UMD-Predictor, Shift, PolyPhen, Mutation Taster, Mutation Assessor, Varsome, Franklin by Genoos, Varmap και τη βάση HPO (Human Phenotype Ontology).

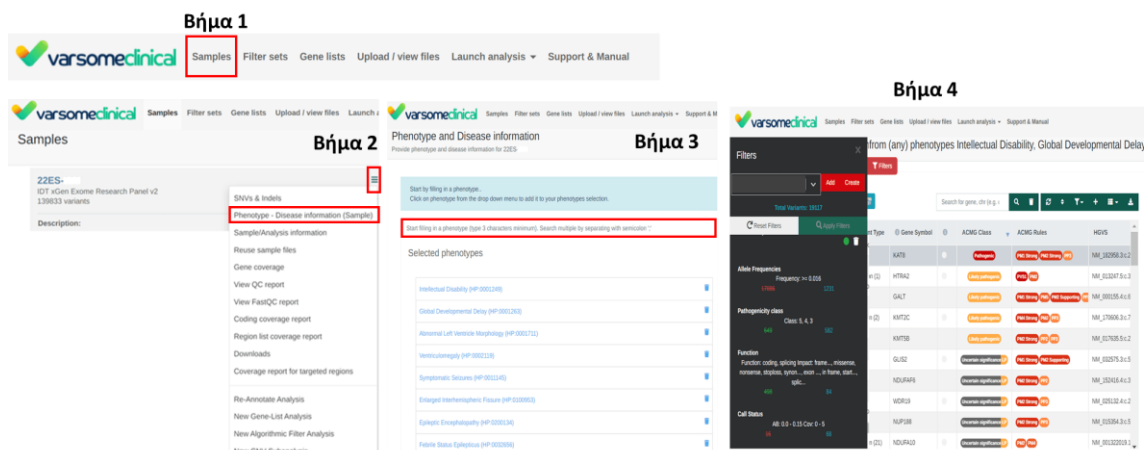
3) Ερμηνεία και ταξινόμηση των παραλλαγών από την εφαρμογή CES ή WES

Το φιλτράρισμα και η ερμηνεία (interpretation) των παραλλαγών υλοποιήθηκαν ως εξής: στο αρχείο των δεδομένων (.vcf) αρχικά πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα με βάση τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του ασθενούς (όπως αυτά αποδόθηκαν από τον εκάστοτε παραπέμποντα ιατρό). Έπειτα ακολούθησε φιλτράρισμα με βάση: τη συχνότητα των αλληλομόρφων στον γενικό πληθυσμό (MAF <1%), τον τύπο της παραλλαγής (παρανοηματική, αντινοηματική, ματίσματος, αλλαγής του πλαισίου ανάγνωσης), την παθογνωμικότητα και τέλος τα *in silico* προγράμματα αξιολόγησης της επίδρασης των παραλλαγών στην πρωτεΐνη.





Εικόνα 36: Ροή εργασίας για τη βιοπληροφορική ανάλυση αρχείου .vcf με το πρόγραμμα VarAFT.



Εικόνα 37: Ροή εργασίας για τη βιοπληροφορική ανάλυση αρχείου μέσω της πλατφόρμας VarSome Clinical.

Από την ανάλυση εξάγεται αρχείο .xlsx με παραλλαγές πιθανώς σχετιζόμενες με το φαινότυπο του υπό μελέτη ασθενούς οι οποίες ταξινομούνται σε παθογόνες, πιθανώς παθογόνες, αβέβαιης κλινικής σημασίας, πιθανώς ήπιες και ήπιες σύμφωνα με τον συνδυασμό των επιμέρους κριτηρίων του Αμερικάνικου Κολλεγίου Ιατρικής Γενετικής (ACMG-American College of Medical Genetics and Genomics) [230]. Τα κριτήρια, οι περιπτώσεις εφαρμογής τους και οι πιθανοί συνδυασμοί τους αποδίδονται στους Πίνακες 19 -21.

Πίνακας 19: Κριτήρια ACMG για κατηγοριοποίηση παραλλαγών ως παθογόνες και περιπτώσεις εφαρμογής τους.

Παθογνωμικότητα	Κριτήριο και περιπτώσεις εφαρμογής
Πολύ δυνατή	<p>PVS1 για παραλλαγές που οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας του γονιδίου όπως:</p> <ul style="list-style-type: none"> • πλαισιοτροπικές, • εισαγωγής πρώιμου κωδικονίου λήξης, ματίσματος (θέσεις ± 1 ή 2), • κατάρτησης κωδικονίου έναρξης, • ελλείμματος ενός ή πολλαπλών εξονίων του γονιδίου. <p>Η εφαρμογή του κριτηρίου γίνεται προσεκτικά λαμβάνοντας υπόψη το κανονικό μετάγραφο του γονιδίου, το μηχανισμό που οδηγεί σε νόσο (εφαρμόζεται μόνο σε γονίδια που η απώλεια λειτουργίας τους οδηγεί σε νόσο), τη θέση στην πρωτεΐνη (ιδιαίτερη προσοχή για παραλλαγές στο 3' άκρο) καθώς και την πιθανότητα η απαλοιφή ενός εξωνίου λόγω διαφορετικού ματίσματος να αφήνει την υπόλοιπη πρωτεϊνική δομή άθικτη.</p>
Δυνατή	<p>PS1 ήδη γνωστή παθογόνος παραλλαγή που αφορά ίδια αμινοξική αντικατάσταση αλλά διαφορετική νουκλεοτιδική αντικατάσταση. Η εφαρμογή του κριτηρίου χρειάζεται προσοχή για παραλλαγές που πιθανώς να επηρεάζουν το μάτισμα.</p> <p>PS2 η παραλλαγή εμφανίζεται εκ νέου σε ασθενή με αρνητικό οικογενειακό ιστορικό και έχει επιβεβαιωθεί η μητρότητα και η πατρότητα.</p>

	<p>PS3 in vivo ή in vitro τεκμηριωμένες λειτουργικές μελέτες που υποστηρίζουν επιβλαβή επίδραση της παραλλαγής στο γονίδιο ή στο προϊόν του.</p> <p>PS4 η συχνότητα της παραλλαγής σε πάσχοντες είναι σημαντικά μεγαλύτερη απ' ό,τι σε δείγματα ελέγχου.</p>
Μέτρια	<p>PM1 η παραλλαγή εδράζεται σε σημείο όπου καταγράφεται η πλειοψηφία των παραλλαγών και/ή σε κρίσιμη και καλά χαρακτηρισμένη λειτουργική περιοχή στην οποία δεν παρατηρούνται ήπιες παραλλαγές.</p> <p>PM2 απουσία της παραλλαγής από δείγματα ελέγχου ή πολύ μικρή συχνότητα σε δείγματα ελέγχου εάν πρόκειται για γονίδιο που ακολουθεί αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο κληρονόμησης όπως αυτή καταγράφεται στις βάσεις δεδομένων Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project ή Exome Aggregation Consortium.</p> <p>PM3 εφαρμογή μόνο για αυτοσωμικά υπολειπόμενα νοσήματα και όταν η παραλλαγή βρίσκεται σε διάταξη trans με ήδη γνωστή παθογόνο παραλλαγή. Για την εφαρμογή του φίλτρου προηγείται έλεγχος γονέων ή απογόνων.</p> <p>PM4 αλλαγή του μήκους της πρωτεΐνης ως αποτέλεσμα μη πλαισιοτροπικών ελλείψεων ή ενθέσεων σε μη επαναλαμβανόμενη περιοχή ή παραλλαγών που οδηγούν σε απώλεια του κωδικονίου τερματισμού.</p> <p>PM5 νέα αμινοξική αντικατάσταση σε αμινοξύ όπου διαφορετική αμινοξική αντικατάσταση έχει περιγραφεί ως παθογόνος.</p> <p>PM6 εικάζεται ότι πρόκειται για εκ νέου παραλλαγή, αλλά χωρίς επιβεβαίωση μητρότητας και πατρότητας</p>
Υποστηρικτικά	<p>PP1 η παραλλαγή παρατηρείται σε πολλαπλά πάσχοντα μέλη της οικογένειας και οι παραλλαγές του γονιδίου είναι γνωστό ότι προκαλούν νόσο.</p> <p>PP2 εφαρμόζεται σε αμινοξικές αντικαταστάσεις σε γονίδια με μικρό αριθμό ήπιων αμινοξικών αντικαταστάσεων και στα οποία το συγκεκριμένο είδος παραλλαγών είναι ο κοινός μηχανισμός που οδηγεί σε νόσο.</p> <p>PP3 πολλαπλά στοιχεία από υπολογιστικά προγράμματα που υποστηρίζουν παθογόνο επίδραση της παραλλαγής στο γονίδιο ή στο προϊόν του.</p> <p>PP4 ο φαινότυπος του ασθενούς ή το οικογενειακό ιστορικό είναι ειδικά για ένα νόσημα με μονογονιδιακή αιτιολογία.</p> <p>PP5 αξιόπιστη πηγή αναφέρει ότι η παραλλαγή είναι παθογόνος αλλά τα στοιχεία δεν είναι διαθέσιμα στο εργαστήριο ώστε να μπορεί να επιβεβαιώσει τον ισχυρισμό σε ανεξάρτητο πείραμα.</p>

Πίνακας 20: Κριτήρια ACMG για κατηγοριοποίηση παραλλαγών ως ήπιες και περιπτώσεις εφαρμογής τους.

Παθολογικότητα	Κριτήριο και περιπτώσεις εφαρμογής
Ευσταθεί μόνο του	BA1 η συχνότητα του αλληλομόρφου είναι >5% στις βάσεις δεδομένων Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project ή Exome Aggregation Consortium.
Δυνατά	BS1 η συχνότητα του αλληλομόρφου είναι μεγαλύτερη από την αναμενόμενη για το νόσημα.
	BS2 έχει βρεθεί σε υγιή ενήλικα σε: <ul style="list-style-type: none"> • ομοζυγωτία εάν πρόκειται για αυτοσωμικό υπολειπόμενο νόσημα • ετεροζυγωτία εάν πρόκειται για αυτοσωμικό επικρατητικό νόσημα • ημιζυγωτία εάν πρόκειται για φυλοσύνδετο νόσημα με την προϋπόθεση ότι το νόσημα εμφανίζει πλήρη διεισδυτικότητα σε μικρή ηλικία.
	BS3 in vivo ή in vitro τεκμηριωμένες λειτουργικές μελέτες που δεν υποστηρίζουν επιβλαβή επίδραση της παραλλαγής στο γονίδιο ή στο προϊόν του.
	BS4 η παραλλαγή δεν παρατηρείται σε όλα τα πάσχοντα μέλη της οικογένειας. Στην εφαρμογή του κριτηρίου χρειάζεται προσοχή καθότι μπορεί να

	συνυπάρχουν περισσότερες από μία παραλλαγές που συνεισφέρουν στην εκδήλωση μιας αυτοσωμικής επικρατητικής νόσου ή όπως στην περίπτωση της επιληψίας ο φαινότυπος να προσομοιάζει αυτόν ενός επιληπτικού συνδρόμου αλλά η αιτιολογία να μην είναι γενετική σε όλα τα μέλη.
Υποστηρικτικά	BP1 παραλλαγή που οδηγεί σε αμινοξική αντικατάσταση ενώ οι παραλλαγές που οδηγούν σε μικρότερη πρωτεΐνη σχετίζονται με εμφάνιση νόσου.
	BP2 <ul style="list-style-type: none"> • για αυτοσωμικά επικρατητικά νοσήματα με πλήρη διεισδυτικότητα όπου η παραλλαγή βρίσκεται σε διάταξη trans με ήδη γνωστή παθογόνο παραλλαγή ή • για όλους τους τρόπους κληρονόμησης σε διάταξη cis με παθογόνο παραλλαγή.
	BP3 μη πλαισιοτροπικές ελλείψεις ή ενθέσεις σε επαναλαμβανόμενη περιοχή η οποία δεν έχει γνωστή λειτουργία.
	BP4 πολλαπλά στοιχεία από υπολογιστικά προγράμματα που δεν υποστηρίζουν επίδραση της παραλλαγής στο γονίδιο ή στο προϊόν του.
	BP5 η παραλλαγή έχει βρεθεί σε άτομο με εναλλακτική μοριακή βάση για την εκδήλωση του νοσήματος.
	BP6 αξιόπιστη πηγή αναφέρει ότι η παραλλαγή είναι ήπια αλλά τα στοιχεία δεν είναι διαθέσιμα στο εργαστήριο ώστε να μπορεί να επιβεβαιώσει τον ισχυρισμό σε ανεξάρτητο πείραμα.
	BP7 για συνώνυμες παραλλαγές για τις οποίες τα προγράμματα πρόβλεψης επίδρασης στο μάτισμα δεν προβλέπουν αλλαγή ματίσματος ή δημιουργία νέας θέσης ματίσματος και το συγκεκριμένο νουκλεοτίδιο δεν είναι συντηρημένο.

Πίνακας 21: Συνδυασμός κριτηρίων για την τελική ταξινόμηση της παραλλαγής.

Η κάθε σειρά αντιπροσωπεύει κάθε πιθανό συνδυασμό. Η πολλαπλή αναφορά στην ίδια σειρά ενός είδους κριτηρίου αποτυπώνει τον ελάχιστο αριθμό μελών του για την τελική συνεισφορά στην ταξινόμηση.

Ταξινόμηση παραλλαγής	Συνδυασμός κριτηρίων
Παθογόνος	PVS1 (PS1-PS4)
	PVS1 (PM1-PM6) (PM1-PM6)
	PVS1 (PM1-PM6) (PP1-PP5)
	PVS1 (PP1-PP5) (PP1-PP5)
	(PS1-PS4) (PS1-PS4)
	(PS1-PS4) (PM1-PM6) (PM1-PM6) (PM1-PM6)
	(PS1-PS4) (PM1-PM6) (PM1-PM6) (PP1-PP5) (PP1-PP5)
	(PS1-PS4) (PM1-PM6) (PP1-PP5) (PP1-PP5) (PP1-PP5) (PP1-PP5)
	Πιθανώς παθογόνος
(PS1-PS4) (PM1-PM6)	
(PS1-PS4) (PM1-PM6) (PM1-PM6) (PM1-PM6)	
(PM1-PM6) (PM1-PM6) (PM1-PM6)	
(PM1-PM6) (PM1-PM6) (PP1-PP5) (PP1-PP5)	
(PM1-PM6) (PP1-PP5) (PP1-PP5) (PP1-PP5) (PP1-PP5)	
Αβέβαιης κλινικής σημασίας	Όσες παραλλαγές δεν πληρούν τα κριτήρια για ταξινόμηση ως παθογόνες, πιθανώς παθογόνες, ήπιες ή πιθανώς ήπιες
	Συνύπαρξη αντιφατικών κριτηρίων
Ήπια	BA1
	(BS1-BS4) (BS1-BS4)
Πιθανώς ήπια	(BS1-BS4) (BP1-BP7)
	(BP1-BP7) (BP1-BP7)

4) Κλινική αξιολόγηση των παραλλαγών από την εφαρμογή CES ή WES

Η κλινική αξιολόγηση των παραλλαγών διενεργήθηκε με τη συνεργασία Εργαστηριακών Γενετιστών, Κλινικών Γενετιστών, Παιδονευρολόγων, Νευρολόγων ή άλλων κλινικών ειδικοτήτων για την καλύτερη αξιοποίηση των αποτελεσμάτων. Στο στάδιο αυτό παραδόθηκε στον κλινικό μια αναφορά (technical report) με τις παραλλαγές που πιθανώς σχετίζονται με το φαινότυπο του εξεταζόμενου και πληρούν τα κριτήρια παθογνωμικότητας, το νόσημα με το οποίο σχετίζονται, τον τρόπο κληρονόμησης καθώς και ενδεικτική βιβλιογραφία ώστε να γίνει συσχέτιση γονοτύπου-φαινοτύπου.

5) Επιβεβαίωση των τελικών παραλλαγών από την εφαρμογή CES ή WES

Συμπληρωματικές εργαστηριακές μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν με στόχο:

- ⇒ την επιβεβαίωση της παραλλαγής με δεύτερη τεχνική (αλληλούχηση κατά Sanger) σε περίπτωση μη ικανοποιητικών ποιοτικών χαρακτηριστικών όπως μειωμένα reads της περιοχής ή χαμηλή συχνότητα της παραλλαγής στα reads.
- ⇒ τη διερεύνηση του πρότυπου κληρονόμησης επί ευρημάτων αγνώστου κλινικής σημασίας σε γονίδια των οποίων οι παραλλαγές ακολουθούν αυτοσωμικό επικρατητικό πρότυπο κληρονόμησης. Η ταυτοποίηση παραλλαγής ως εκ νέου σε ασθενείς με αρνητικό οικογενειακό ιστορικό και η επιβεβαίωση μητρότητας-πατρότητας οδήγησε στην εκ νέου ταξινόμησή της ως «Πιθανώς παθογόνος» μετά τη χρήση του κριτηρίου PS2. Σε αυτές τις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε PCR και αλληλούχηση κατά Sanger στοχευμένα για την περιοχή ενδιαφέροντος και PCR με σημασμένους εκκινητές και τριχοειδής ηλεκτροφόρηση σε πολυμορφικές θέσεις του γονιδιώματος. Οι ανωτέρω εργαστηριακές διαδικασίες εφαρμόστηκαν στα δείγματα όλης της οικογένειας. Σε περιπτώσεις εύρεσης της παραλλαγής σε ασυμπτωματικό γονέα πραγματοποιήθηκε ενδελεχής μελέτη της διεθνούς βιβλιογραφίας για αναφορές ατελούς διεισδυτικότητας, επανεκτιμήθηκε το είδος της παραλλαγής, η θέση της στο γονίδιο, η επίδρασή της στην πρωτεΐνη και η ύπαρξη άλλης μοριακής βλάβης που εξηγούσε τον φαινότυπο.
- ⇒ την ταυτοποίηση της διάταξης των παραλλαγών στις περιπτώσεις που ανιχνεύθηκαν αυτοσωμικά υπολειπόμενα νοσήματα μέσω ελέγχου γονεϊκών

δειγμάτων με αλληλούχηση κατά Sanger. Σημειώνεται ότι σε περιπτώσεις ομόζυγης παραλλαγής ο συμπληρωματικός έλεγχος διαλεύκανε αν πρόκειται για την ίδια κληρονομούμενη παραλλαγή ή αν συνυπήρχε έλλειμμα και σημειακή παραλλαγή.

- ⇒ τη διεξαγωγή συμπληρωματικού ελέγχου σε περιπτώσεις ένδειξης ελλείμματος ενός ή πολλαπλών εξονίων από το βάθος κάλυψης των εξονικών περιοχών. Για την επιβεβαίωση του αριθμού αντιγράφων πραγματοποιήθηκαν οι τεχνικές MLPA και ανάλυση απλοτύπων με εφαρμογή PCR με ειδικά σημασμένους εκκινητές σε μικροδορυφορικές αλληλουχίες (STRs – short tandem repeats) των περιοχών ενδιαφέροντος καθώς και μελέτη RNA.
- ⇒ τη διάγνωση και άλλων μελών της οικογένειας με παρόμοιο φαινότυπο με αυτόν του εξεταζόμενου ατόμου στοχευμένα για την εκάστοτε παραλλαγή μέσω αλληλούχησης κατά Sanger.

Με την ολοκλήρωση των συμπληρωματικών ελέγχων η τελική έκθεση αποτελεσμάτων δόθηκε στους κηδεμόνες των ασθενών μετά από γενετική συμβουλευτική.

3.2.8 Απομόνωση RNA και σύνθεση cDNA για τη διερεύνηση ευρημάτων από αλληλούχηση επόμενης γενιάς

Στην ασθενή 99 ο έλεγχος με WES κατέδειξε την ύπαρξη της σημειακής παραλλαγής NM_020686.6:c.1153G>T:p.Asp385Tyr σε ετεροζυγωτία στο εξόνιο 14 του γονιδίου *ABAT* καθώς και του μικροελλείμματος μεγέθους 9,7 kb (chr16:8,841,965-8,851,663) το οποίο εμπεριέχει τα εξόνια 4-6 του ίδιου γονιδίου. Καθώς το πρότυπο κληρονόμησης παραλλαγών του γονιδίου είναι αυτοσωμικό υπολειπόμενο και προϋποθέτει την διάταξη των παραλλαγών σε trans διάταξη για την εκδήλωση της ανεπάρκειας της GABA-τρανσαμινάσης κρίθηκε απαραίτητη η διερεύνηση του προτύπου κληρονόμησης των παραλλαγών στην ασθενή και τους γονείς της. Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA, PCR και αλληλούχηση κατά Sanger όπως αυτά περιγράφονται στις ενότητες 3.2.2 και 3.2.3 για την ανίχνευση της σημειακής παραλλαγής, η οποία ταυτοποιήθηκε ως πατρικής προέλευσης, ενώ για την μελέτη του μικροελλείμματος λόγω μη διαθέσιμου εμπορικού συστήματος MLPA

για την μελέτη αριθμού αντιγράφων του γονιδίου *ABAT* τυποποιήθηκε πρωτόκολλο μελέτης σε επίπεδο RNA. Η απομόνωση ολικού RNA πραγματοποιήθηκε σε δείγματα περιφερικού αίματος στην ασθενή και τους γονείς της καθώς και σε δείγμα ινοβλαστών μόνο στην ασθενή.

Για την απομόνωση ολικού RNA όλες οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής. Ειδικότερα για την απομόνωση από τα δείγματα αίματος χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο κιτ NucleoSpin RNA Blood kit της εταιρείας Macherey-Nagel και τα στάδια που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- 1) Μεταφορά 200μl αίματος σε σωληνάρια όγκου 2ml και προσθήκη 200μl διαλύματος λύσης κυττάρων DL και 5μl πρωτεϊνάσης K. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά με παράλληλη ανάδευση των σωληναρίων.
- 2) Φυγοκέντρηση στα 2.000g για 1 δευτερόλεπτο.
- 3) Προσθήκη 200μl αιθανόλης 70% και ανάδευση των σωληναρίων.
- 4) Φυγοκέντρηση στα 2.000g για 1 δευτερόλεπτο.
- 5) Μεταφορά όλου του περιεχομένου (610μl) από το σωληνάριο των 2ml σε ειδικά σωληνάρια με ηθμό που παρέχονται από το κιτ και φυγοκέντρηση στα 11.000g για 30 δευτερόλεπτα.
- 6) Προσθήκη 350μl διαλύματος MBL στον ηθμό και φυγοκέντρηση στα 11.000g για 30 δευτερόλεπτα.
- 7) Προσθήκη 95μl rDNAase στον ηθμό και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
- 8) Προσθήκη 200μl διαλύματος RB2 στον ηθμό, φυγοκέντρηση στα 11.000g για 30 δευτερόλεπτα και τοποθέτηση του ηθμού σε νέο σωληνάριο 2ml.
- 9) Προσθήκη 600μl διαλύματος RB3 στον ηθμό, φυγοκέντρηση στα 11.000g για 30 δευτερόλεπτα και τοποθέτηση του ηθμού σε νέο σωληνάριο 2ml.
- 10) Προσθήκη 250μl διαλύματος RB3 στον ηθμό, φυγοκέντρηση στα 11.000g για 2 λεπτά και τοποθέτηση του ηθμού σε σωληνάριο 1,5ml ελεύθερο νουκλεασών.
- 11) Προσθήκη 60μl H₂O ελεύθερου RNAσών και φυγοκέντρηση στα 11.000g για 30 δευτερόλεπτα.

Για την απομόνωση ολικού RNA από το δείγμα ινοβλαστών της ασθενούς, το ιστοτεμάχιο ομογενοποιήθηκε σε ειδικά σωληνάρια με κεραμικά σφαιρίδια και έγινε χρήση του εμπορικά διαθέσιμου κιτ Quick-RNA Miniprep kit της εταιρείας Zymo Research. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1)Μεταφορά του ιστοτεμαχίου σε σωληνάριο Precellys Lysing kit CKMix50 και προσθήκη 600μl διαλύματος RNA lysis.

2)Το σωληνάριο αφέθηκε σε ομογενοποιητή για 5 λεπτά, ακολούθησε μεταφορά του υγρού στοιχείου χωρίς τα σφαιρίδια σε σωληνάριο 1,5ml ελεύθερο νουκλεασών και φυγοκέντρηση στα 13.000g για 2 δευτερόλεπτα.

3)Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε ειδικά σωληνάρια με ηθμό κίτρινου χρώματος (Spin-Away filter, παρέχονται από το κιτ) και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 13.000g για 30 δευτερόλεπτα.

4)Στο διήθημα προστέθηκε ισόποσος όγκος αιθανόλης 100%, ανάδευση με χρήση πιπέτας και μεταφορά όλης της ποσότητας σε ειδικά σωληνάρια με ηθμό πράσινου χρώματος (Zymo-Spin III CG column, παρέχονται από το κιτ). Έπειτα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 13.000g για 30 δευτερόλεπτα.

5)Στον ηθμό προστέθηκαν 400μl διαλύματος RNA wash και φυγοκεντρήθηκε στα 13.000g για 30 δευτερόλεπτα.

6)Σε σωληνάριο ελεύθερο νουκλεασών προετοιμάσθηκε μίγμα που εμπεριείχε 5μl ενζύμου DNAase I και 75μl διαλύματος DNA digestion και προστέθηκε στον ηθμό.

7)Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.

8)Προσθήκη 400μl διαλύματος RNA prep στον ηθμό, φυγοκέντρηση στα 13.000g για 30 δευτερόλεπτα και απόρριψη διηθήματος.

9)Προσθήκη 700μl διαλύματος RNA wash στον ηθμό, φυγοκέντρηση στα 13.000g για 30 δευτερόλεπτα και απόρριψη διηθήματος.

10)Προσθήκη 400μl διαλύματος RNA wash στον ηθμό, φυγοκέντρηση στα 13.000g για 1 λεπτό και μεταφορά της στήλης με τον ηθμό σε σωληνάριο 1,5ml ελεύθερο νουκλεασών.

11)Προσθήκη 60μl H₂O ελεύθερου RNAσών και φυγοκέντρηση στα 13.000g για 30 δευτερόλεπτα.

Το εξαχθέν RNA και στις δύο περιπτώσεις εμπεριείχε όλα τα είδη RNA (ριβωσωμικό-rRNA, μεταφορικό-tRNA και αγγελιοφόρο-mRNA) και φυλάχθηκε μετά

την απομόνωσή του στους -80°C . Η εκτίμηση της ποσότητας και καθαρότητας του RNA διεξήχθη με χρήση φασματοφωτόμετρου Nanodrop 1000 της εταιρείας ThermoScientific.

Η δημιουργία συμπληρωματικού DNA (complementary DNA, cDNA) πραγματοποιήθηκε με αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription, RT) από το αρχικό ολικό mRNA μέσω της δράσης της αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase, RTase). Η αντίστροφη μεταγραφάση έχει την ικανότητα να συνθέτει cDNA σε κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το RNA. Για τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο κιτ PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis kit της εταιρείας Takara Bio και εκκινητής ολιγομερών δεοξυθυμιδίνης (oligo-dT) ο οποίος είναι σχεδιασμένος ώστε να υβριδοποιείται στην πολυαδενινική ουρά των μορίων mRNA, η οποία ανευρίσκεται υπάρχει μόνο σε ώριμα ευκαρυωτικά mRNA, με αποτέλεσμα την σύνθεση cDNA μόνο από τα μόρια mRNA.

Η πειραματική διαδικασία για τη δημιουργία μονόκλωνου cDNA πραγματοποιήθηκε σε παγωμένο στατώ και με τη χρήση θερμικού κυκλοποιητή σε δύο στάδια.

Στάδιο 1: 5μl ολικού εξαχθέντος RNA μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια όγκου 0,2ml και προστέθηκαν 1μl μίγμα νουκλεοτιδίων dNTP, 1μl εκκινητή oligo-dT και 3μl H_2O ελεύθερου RNAσών. Τα σωληνάρια επώαστηκαν στους 65°C για 5 λεπτά και αμέσως μετά τοποθετήθηκαν σε πάγο.

Στάδιο 2: στα σωληνάρια του σταδίου 1 προστίθενται 4μl διαλύματος 5X PrimeScript, 0,5μl ενζύμου RNase inhibitor, 1μl ενζύμου PrimeScript RTase και 4,5μl H_2O ελεύθερου RNAσών. Οι συνθήκες για τη διεξαγωγή της αντίδρασης εμπεριείχαν επώαση στους 30°C για 10 λεπτά, έπειτα στους 42°C για 45 λεπτά και τελικό στάδιο στους 95°C για 5 λεπτά για την απενεργοποίηση των ενζύμων.

Ακολούθησε RT-PCR (RT-PCR: Reverse Transcription- PCR) με υπόστρωμα το cDNA που προέκυψε από την ανωτέρω πειραματική διαδικασία με ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές για τις κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδίου *ABAT*. Ειδικότερα σχεδιάστηκε εμπρόσθιος εκκινητής εντός του εξονίου 2 και οπίσθιος εντός του εξονίου 8. Τα προϊόντα της PCR διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα

αγαρόζης 2%. Η στοιχειομετρία για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης συνοψίζεται στον Πίνακα 22.

Πίνακας 22: Πρωτόκολλο RT-PCR για το έλλειμμα του γονιδίου *ABAT*.

Πρωτόκολλο RT-PCR για το έλλειμμα του γονιδίου <i>ABAT</i>	
Πολυμεράση MultiplexTaq της εταιρείας Qiagen	5 μl
Διάλυμα Q (συνοδευτικό της πολυμεράσης)	1 μl
H ₂ O	2 μl
Forward εκκινητής	1 μl
Reverse εκκινητής	1 μl
Σύνολο	10 μl
cDNA	1,5 μl
Συνθήκες αντίδρασης	95°C για 15 λεπτά 95°C για 1 λεπτό 58°C για 1 λεπτό 72°C για 1 λεπτό 72°C για 10 λεπτά 4°C μέχρι την απομάκρυνση της αντίδρασης από το μηχάνημα } για 32 κύκλους

Για την ταυτοποίηση των ορίων του ελλείμματος ακολούθησε απομόνωση των μπαντών από το πήκτωμα αγαρόζης όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.2.6, PCR με τις προαναφερθείσες συνθήκες και αλληλούχηση κατά Sanger σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των ενοτήτων 3.2.3.4-3.2.3.6.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1.1 Αποτελέσματα γονιδίου *MECP2*

Από τους 115 ασθενείς που ελέγχθηκαν για σημειακές παραλλαγές εντός του γονιδίου *MECP2* θετικοί προέκυψαν οι 21 (18,26%) και από τους 62 που ελέγχθηκαν για ελλείμματα ή διπλασιασμούς του γονιδίου θετικοί ήταν 4 (6,45%). Σε τρεις ασθενείς (δεν συμπεριλήφθηκαν στα προηγούμενα ποσοστά) στους οποίους αρχικά πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση επόμενης γενιάς, μία έφερε σημειακή παραλλαγή ενώ δύο ασθενείς έφεραν μερικό έλλειμμα του γονιδίου (διάγνωση με MLPA). Ταυτοποιήθηκαν 6 ανερμηνεύσιμες παραλλαγές σε 10 ασθενείς, 5 πλαισιοτροπικές σε 4 (μία ασθενής έφερε 2 παραλλαγές), 5 παρερμηνεύσιμες σε 8 άτομα (μία κληρονομούμενη από ασυμπτωματική μητέρα), 1 παραλλαγή ματίσματος σε 1 ασθενή, 3 μερικά ετερόζυγα ελλείμματα του γονιδίου σε 3 και ένας διπλασιασμός που αφορούσε την ευρύτερη περιοχή Χq28 (εντός αυτής και το γονίδιο *MECP2*). Όλοι οι ασθενείς που ταυτοποιήθηκαν με μοριακή βλάβη του γονιδίου ήταν θήλεα εκτός από έναν άρρενα με τον γενωμικό διπλασιασμό. Μελέτη απενεργοποίησης του Χ χρωμοσώματος πραγματοποιήθηκε σε 7 ασθενείς. Στους Πίνακες 23 και 24 συνοψίζονται αντίστοιχα οι σημειακές παραλλαγές και οι παραλλαγές αριθμού αντιγράφων του γονιδίου που ανευρέθηκαν καθώς και τα κλινικά στοιχεία των ασθενών. Στο παράρτημα εντοπίζονται εικόνες των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης για τους ασθενείς με σημειακές παραλλαγές και στην Εικόνα 38 τα αποτελέσματα του MLPA των εξεταζόμενων.

Πίνακας 23: Αποτελέσματα και κλινικά στοιχεία ασθενών με σημειακές παραλλαγές του γονιδίου *MECP2*. Όλες οι παραλλαγές ανιχνεύθηκαν σε ετεροζυγωτία και η ονοματολογία τους έγινε βάσει του μεταγράφου αναφοράς GRCh37:NM_004992.

ΚΩΔΙΚΟΣ	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	ΠΑΡΑΛΛΑΓΗ	ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΠΑΡΑΛΛΑΓΗΣ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ACMG	ΚΛΙΝΙΚΑ	ΣΠΑΣΜΟΙ	ΗΕΓ	MRI	ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ
1	Θ	17 μηνών	c.763C>T p.R255X	Παθολόγος (PVS1,PS3,PM2,PP3)	Αναπτυξιακή καθυστέρηση.	Τονικοκλονικοί και εστιακοί, πυρετικοί και απύρετοι με έναρξη 10 μηνών.	Επιληπτικές εκφορτίσεις αριστερά.	Διάχυτη υπομελίνωση.	Οξυκαρβαζεπίνη.
2	Θ	2 ετών	c.916C>T p.R306C	Παθολόγος (PM1,PM2,PM5,PS3,PP2,PP3)	ΨΚΚ.	Δεν αναφέρεται.	Μη ειδικά ευρήματα.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.
3	Θ	3 ετών	c.880C>T p.R294X	Παθολόγος (PVS1,PS3,PM2,PP3,PP5)	ΨΚΚ, στερεοτυπίες, δυσπραξία, μικροκεφαλία.	Χωρίς κλινικούς σπασμούς.	Γενικευμένες και πολυεστιακές αιχμές, ινιακή βραδύτητα ρυθμού, παροξυσμικές ριπές δ δραστηριότητας.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.
4	Θ	10 ετών	c.1159_1195delinsAG p.P387Sfs*6	Παθολόγος (PVS1,PP3,PM2)	ΨΚΚ, επιληψία, εγκεφαλική παράλυση.	Ναι από 18 μηνών.	Παθολογικό.	Κατά φύση.	Λεβετιρασετάμη, κλοβαζάμη, καρβαμαζεπίνη.
5	Θ	3 ετών	c.1164_1207del p.P389X	Παθολόγος (PVS1,PM2,PP3,PP5)	ΨΚΚ, στερεοτυπίες, μικροκεφαλία.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.
6	Θ	18 ετών	c.808C>T p.R270X	Παθολόγος (PVS1,PS3,PM2,PP3,PP5)	ΨΚΚ, στερεοτυπίες.	Δεν αναφέρεται.	Διάχυτες βραδυαρρυθμίες θ και δ υψηλού δυναμικού και αιχμές-κύματα αριστερά μετωποβρεγματικά με τάση γενίκευσης.	Κατά φύση.	Δεν αναφέρεται.
7	Θ	24 ετών	c.473C>T p.T158M	Παθολόγος (PM1,PM2,PM5,PS3,PP2,PP3,PP5)	Από ηλικίας 1,5 ετών παλινδρόμηση.	Ναι.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.	Βαλπροϊκό οξύ, λεβετιρασετάμη, λαμοτριγίνη.
8	Θ	5 ετών	c.763C>T p.R255X	Παθολόγος (PVS1,PS3,PM2,PP3)	ΨΚΚ, ΝΥ, αυτοτραυματισμοί, μικροκεφαλία.	Ναι.	Αιχμές αριστερά.	Κατά φύση.	Δεν αναφέρεται.

9	Θ	8 ετών	c.401C>G p.S134C	Παθολόγος (PM1,PM2,PM5,PP2,PP3,PP5)	Αναπτυξιακή παλινδρόμηση, αυτισμός, στερεοτυπίες, ΝΥ	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.	Κατά φύση.	Δεν αναφέρεται.
10	Θ	22 μηνών	c.502C>T p.R168X	Παθολόγος (PVS1,PS3,PM2,PP3,PP5)	Από 3 μηνών head lag, υποτονία, μετέπειτα ΨΚΚ, κορμική αταξία, μικροκεφαλία, τρόμος κατά την αφύπνιση.	Ναι από 9 μηνών προσηλώσεις και drogs κεφαλής.	Παθολογικό διάγραμμα με φτωχή οργάνωση και ριπές αιχμών – πολυαιχμών.	Κατά φύση.	Λεβητρασετάμη, κλωβαζάμη (διακόπηκε), βαλπροϊκό οξύ, λεβοκαρνιτίνη.
11	Θ	14 ετών	c.1106A>G p.H369R κληρονομούμενη από υγιή μητέρα. Μελέτη απενεργοποίησης X χρωμοσώματος στο αίμα του παιδιού δείχνει επιλεκτική απενεργοποίηση φυσιολογικού πατρικού X χρωμοσώματος	Αβέβαιης κλινικής σημασίας (PM2,PP2)	ΝΥ, αυτισμός, μικροκεφαλία.	Ναι.	Βραδύ υπόστρωμα.	Κατά φύση.	Δεν αναφέρεται.
12	Θ	3 ετών	c.880C>T p.R294X	Παθολόγος (PVS1,PS3,PM2,PP3,PP5)	ΨΚΚ, μικροκεφαλία, υπερκινητικότητα, αταξικό βάδισμα, στερεοτυπίες.	Χωρίς κλινικούς σπασμούς.	Αιχμές – κύματα.	Κατά φύση.	Δεν αναφέρεται.
13	Θ	2 ετών	c.1363G>T p.E455X	Παθολόγος (PVS1,PM2,PP3,PP5)	Υποτονία, ΨΚΚ, στερεοτυπίες.	Ναι.	Δεν αναφέρεται.	Κατά φύση.	Βαλπροϊκό οξύ.
14	Θ	2 ετών	c.473C>T p.T158M	Παθολόγος (PM1,PM2,PM5,PS3,PP2,PP3,PP5)	Κορμική υποτονία, ΨΚΚ, αταξία, αθετωσικές κινήσεις.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.
15	Θ	6 ετών	c.1157_1197del p.L386Hfs*5	Παθολόγος (PVS1,PM2,PS3,PP3)	Νευροαναπτυξιακή καθυστέρηση, παλινδρόμηση, μικροκεφαλία, στερεοτυπίες.	Αφαιρέσεις.	Κατά φύση.	Κατά φύση.	Δεν αναφέρεται.
16	Θ	1.5 έτους	c.1163delC p.P388Hfs*21; c.1185_1194del p.S396Pfs*10	Παθολόγος (PVS1,PM2,PS2) Παθολόγος (PVS1,PM2,PS2,PP3)	ΨΚΚ, υποτονία, μικροκεφαλία, στερεοτυπίες.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.
17	Θ	9 ετών	c.232dupT p.S78Ffs*13	Παθολόγος (PVS1,PM2,PP3)	Σφαιρική ψυχοκινητική καθυστέρηση, στερεοτυπίες, υπέρταση κάτω άκρων, αταξικό βάδισμα.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.

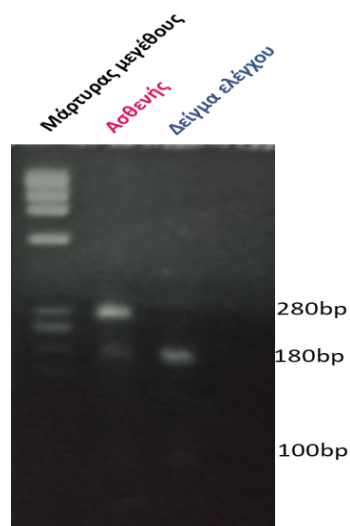
18	Θ	4 ετών	c.808C>T p.R270X	Παθογόνος (PVS1,PS3,PM2,PP3,PP5)	Παλινδρόμηση, μικροκεφαλία.	Δεν αναφέρεται.	Κατά φύση.	Κατά φύση.	Δεν αναφέρεται.
19	Θ	11 ετών	c.502C>T p.R168X	Παθογόνος (PVS1,PS3,PM2,PP3,PP5)	ΨΚΚ.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.
20	Θ	6 ετών	c.455C>G p.P152R	Παθογόνος (PM1,PM2,PM5,PP2,PP3,PS3)	Παλινδρόμηση, ΨΚΚ, στερεοτυπίες, αυτοτραυματισμοί.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.
21	Θ	2 ετών	c.916C>T p.R306C	Παθογόνος (PM1,PM2,PM5,PP2,PP3,PS3)	Αναπτυξιακή παλινδρόμηση σε ηλικία 18 μηνών, στερεοτυπίες, υπερκινητικότητα.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.

Πίνακας 24: Αποτελέσματα και κλινικά στοιχεία ασθενών με παραλλαγές αριθμού αντιγράφων τμήματος ή ολόκληρου του γονιδίου *MECP2*.

ΚΩΔΙΚΟΣ	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	ΠΑΡΑΛΛΑΓΗ	ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΠΑΡΑΛΛΑΓΗΣ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ACMG/ClinGen	ΚΛΙΝΙΚΑ	ΣΠΑΣΜΟΙ	ΗΕΓ	MRI	ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ
22	Θ	6 ετών	ChrX:153,296,228-153,296,972del (έλλειψη τμήματος του εξονίου 4 του γονιδίου <i>MECP2</i>)	Παθολόγος (1) 2B,2E,4L	Σφαιρική αναπτυξιακή καθυστέρηση από 18 μηνών, επίκτητη μικροκεφαλία, αταξία. WES αρνητικό.	Χωρίς κλινικούς σπασμούς.	Παθολογικό.	Κατά φύση.	Δεν αναφέρεται
23	Θ	3 ετών	ChrX:153,363,105-153,364,315del (έλλειψη του εξονίου 1 του γονιδίου <i>MECP2</i>)	Πιθανώς παθολόγος (0.9) 1A,2B,2C,3A	Μικροκεφαλία, αυτιστικά στοιχεία, σφαιρική αναπτυξιακή καθυστέρηση από ηλικίας 7 μηνών, αταξία. WES, μοριακός καρυότυπος αρνητικά.	Χωρίς κλινικούς σπασμούς.	Συμβατό με επιληπτική εγκεφαλοπάθεια.	Πολυγυρία, νευροεκφυλισμός.	Δεν αναφέρεται
24	Θ	2 ετών	ChrX:153,296,228-153,298,085del (έλλειψη ολόκληρου του εξονίου 3 και τμήματος του εξωνίου 4 του γονιδίου <i>MECP2</i>)	Παθολόγος (1) 2B,2E,4L	Σφαιρική νευροαναπτυξιακή καθυστέρηση, στερεοτυπίες, μικροκεφαλία.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.
25	A	2 ετών	ChrX:153,059,812-153,665,573dup (διπλασιασμός που αφορά τουλάχιστον τα γονίδια <i>MECP2</i> , <i>FLNA</i> , <i>AVPR2</i> , <i>L1CAM</i> , <i>TAZ</i> , <i>EMD</i> , <i>SSR4</i> , <i>GDI1</i> , <i>NAA10</i> , <i>IRAK1</i> , <i>ATP6AP1</i> , <i>RPL10</i> , <i>HCFC1</i> σύμφωνα με τα αποτελέσματα του MLPA)	Παθολόγος (1) 2A,2B,2C	Σφαιρική νευροαναπτυξιακή καθυστέρηση. Αδελφός με ΨΚΚ και σπασμούς με Xq28 dup 152991565-153832724 από μοριακό καρυότυπο	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.

4.1.2 Αποτελέσματα από την αλληλούχηση του γονιδίου *MECP2* και της διερεύνησης της διάταξης των παραλλαγών για την ασθενή 16.

Όπως αναλύεται στην ενότητα 3.2.6 για την μελέτη της ασθενούς 16 που έφερε δύο εκ νέου πλαισιοτροπικές παθογόνες παραλλαγές σε κοντινές θέσεις στο εξόνιο 4 του γονιδίου *MECP2* τυποποιήθηκε ειδικά διαμορφωμένο πρωτόκολλο για την μελέτη της διάταξής τους. Μετά τον πολλαπλασιασμό τμήματος του εξονίου 4 (μέγεθος 280 ζεύγη βάσεων) που εμπεριέχει τις δύο παραλλαγές και πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *AluI* (που φέρει μία θέση κοπής στη φυσιολογική αλληλουχία η οποία καταργείται παρουσία της δεύτερης παραλλαγής) παραμένει άκοπο το αλληλόμορφο με τις παραλλαγές και κόβεται το φυσιολογικό αλληλόμορφο (Εικόνα 39). Η αλληλούχηση του άκοπου προϊόντος της πέψης μετά από απομόνωση από πήκτωμα αγαρόζης κατέδειξε όπως φαίνεται στις ακόλουθες φωτογραφίες ότι οι παραλλαγές βρίσκονται στο ίδιο αλληλόμορφο (Εικόνα 40). Σημειώνεται ότι το δείγμα ελέγχου για την αλληλούχηση μετά την πέψη ήταν PCR που δεν είχε υποστεί πέψη καθότι διαφορετικά θα είχε κοπεί.



Εικόνα 39: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης μετά την πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *AluI*.



Εικόνα 40: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης πριν (A) και μετά την πέψη (B). Η εικόνα A προέρχεται από αντίδραση αλληλούχησης σε ανάστροφη κατεύθυνση λόγω έντονου θορύβου στην εμπρόσθια και η B από αλληλούχηση σε εμπρόσθια κατεύθυνση.

4.1.3 Αποτελέσματα από την μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης σε θήλα με παραλλαγές του γονιδίου *MECP2*

Όλα τα ευρήματα που αναλύονται σε αυτήν την ενότητα προκύπτουν από έλεγχο σε DNA από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος και δεν μπορούν να δώσουν πληροφορίες για τους υπόλοιπους ιστούς των ασθενών. Ειδικότερα στην περίπτωση ασθενών με νευροαναπτυξιακά νοσήματα ή επιληπτικά σύνδρομα το πλέον αντιπροσωπευτικό δείγμα θα ήταν βιοψία εγκεφάλου μια διαδικασία επεμβατική που χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη μόνο για ειδικούς διαγνωστικούς σκοπούς. Τα αποτελέσματα από την μελέτη ανά πολυμορφική θέση που μελετήθηκε καθώς και ο λόγος διεξαγωγής συνοψίζονται στον Πίνακα 25. Ως μη πληροφοριακές καταγράφονται οι θέσεις στις οποίες οι γονείς των εξεταζόμενων μοιράζονται αλληλόμορφα ίδιου μεγέθους οπότε δεν είναι εφικτή η ταυτοποίηση της γονεϊκής προέλευσης. Εικόνες από την ανάλυση του προτύπου μεθυλίωσης ανευρίσκονται στο παράρτημα.

Πίνακας 25: Αποτελέσματα από μελέτη προτύπου μεθυλίωσης.

Κωδικός δείγματος	Πολυμορφική επανάληψη γονιδίου <i>AR</i>	Πολυμορφική επανάληψη γονιδίου <i>FMR1</i>	Πολυμορφική επανάληψη γονιδίου <i>PCSK1N</i>	Λόγος διεξαγωγής
11	Μη πληροφοριακή.	Μη τυχαίο πρότυπο. Ανεργό το πατρικό X χρωμόσωμα σε ποσοστό ~70%.	-	Κληρονομούμενη νέα παρερμηνεύσιμη παραλλαγή από ασυμπτωματική μητέρα με τυχαίο πρότυπο μεθυλίωσης.
23	Μη τυχαίο πρότυπο. Ανεργό το μητρικό X χρωμόσωμα σε ποσοστό ~90%.	Τυχαίο πρότυπο.	Τυχαίο πρότυπο.	Σπάνιο εύρημα (έλλειψη εξονίου 1) που σχετίζεται με βαρύτερη κλινική εικόνα.
15	Τυχαίο πρότυπο.	Τυχαίο πρότυπο.	-	Ηπιότερη κλινική εικόνα.
16	Μη τυχαίο πρότυπο. Ανεργό το μητρικό X χρωμόσωμα σε ποσοστό ~70%.	-	-	Δύο παθογόνες παραλλαγές σε cis διάταξη.
5	Τυχαίο πρότυπο.	-	-	Ηπιότερη κλινική εικόνα.
17	Μη πληροφοριακή.	-	-	Ηπιότερη κλινική εικόνα.
13	Μη πληροφοριακή.	Μη τυχαίο πρότυπο. Ανεργό το μητρικό X χρωμόσωμα σε ποσοστό ~70%.	-	Ηπιότερη κλινική εικόνα.

4.2 Αποτελέσματα από την μελέτη των γονιδίων *CDKL5*, *FOXG1*, *ARX*, *POLG*.

Στους ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα μελέτη, δύο (4,16%) εμφάνιζαν μία πλαισιοτροπική και μία παρερμηνεύσιμη παραλλαγή του γονιδίου *CDKL5* (οι οποίες ανιχνεύθηκαν με αλληλούχηση κατά Sanger), δύο έφεραν πλαισιοτροπικές σημειακές παραλλαγές του γονιδίου *FOXG1* ενώ υπήρξε και μοναδιαίο περιστατικό με εκ νέου ετερόζυγο έλλειμμα του γονιδίου (6,25%). Από τις τρεις παραλλαγές που εντοπίστηκαν στο γονίδιο *FOXG1* στους δύο ασθενείς πραγματοποιήθηκε στοχευμένος έλεγχος με αλληλούχηση του γονιδίου (ασθενής 29) ή MLPA (ασθενής 30), ενώ στην ασθενή 93 αλληλούχηση επόμενης γενιάς. Παθογόνες πλαισιοτροπικές παραλλαγές του γονιδίου *ARX* ταυτοποιήθηκαν σε τρεις ασθενείς, ένα θήλυ (μέσω αλληλούχησης κατά Sanger) (1,92%) και δύο άρρενα αδέρφια (ο ένας διαγνώσθηκε μέσω WES και ο δεύτερος με αλληλούχηση κατά Sanger, οπότε και δεν προσμετρώνται στο ανωτέρω ποσοστό). Η ταυτοποίηση της προέλευσης της παραλλαγής στα δύο άρρενα αδέρφια ως μητρική πραγματοποιήθηκε με στοχευμένο έλεγχο. Από τους έξι ασθενείς που ελέγχθηκαν για σημειακές παραλλαγές του γονιδίου *POLG* μόνο μία ασθενής ήταν θετική (16,66%) στην οποία η παραλλαγή εντοπίστηκε σε ομοζυγωτία οπότε και πραγματοποιήθηκε έλεγχος για ελλείμματα του γονιδίου για την εξακρίβωση της αληθούς κατάστασης ομοζυγωτίας ή πιθανό συνδυασμό σημειακής παραλλαγής και ελλείμματος το οποίο θα έδινε ψευδή εικόνα ομοζυγωτίας κατά την αλληλούχηση. Οι ανευρεθείσες παραλλαγές καθώς και κλινικά στοιχεία των ασθενών περιλαμβάνονται στον Πίνακα 26 και εικόνες από την αλληλούχηση ή το MLPA στην Εικόνα 41.

Πίνακας 26: Αποτελέσματα και κλινικά στοιχεία ασθενών με παραλλαγές των γονιδίων *POLG*, *CDKL5*, *FOXP1*, *ARX*.

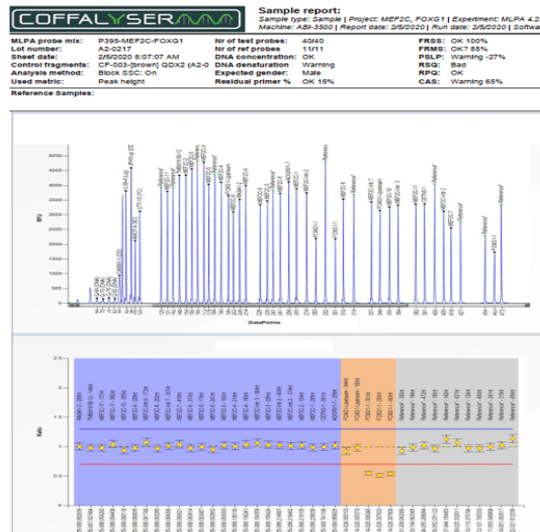
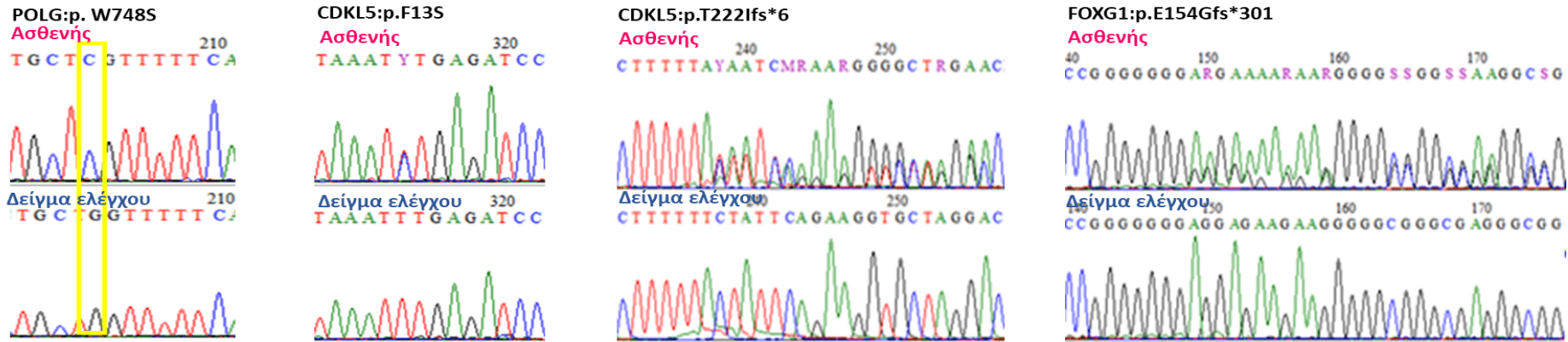
ΚΩΔΙΚΟΣ	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	ΓΟΝΙΔΙΟ ΠΑΡΑΛΛΑΓΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΥ	ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΠΑΡΑΛΛΑΓΗΣ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ACMG	ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	ΣΠΑΣΜΟΙ	ΗΕΓ	MRI	ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ
26	Θ	27 ετών	POLG: NM_001126131.2: c.2243G>C: p.W748S Ομόζυγη	Παθογόνος (PS3,PM1,PM2,PP3,PP5)	Επιληπτική εγκεφαλοπάθεια, αισθητική νευροπάθεια.	Ναι.	Δεν αναφέρεται.	Ισχαμία ινιακού λοβού.	Τοπιραμάτη, καρβαμαζεπίνη.
27	Θ	4 μηνών	CDKL5: NM_003159.2: c.38T>C: p.F13S Ετερόζυγη (<i>de novo</i>)	Παθογόνος (PS2,PM1,PM2,PP2,PP3)	Απύρετοι σπασμοί 3-4 επεισόδια ημερησίως.	Από ηλικίας 2 μηνών επεισόδια σπασμών με προήλωση βλέμματος, κλονικές συσπάσεις αριστερού κάτω άκρου και δευτεροπαθή γενίκευση σε κορμό και άκρα διάρκειας 5-15 δευτερολέπτων που ακολουθούνται από κλάμα.	Αποδιοργανωμένο.	Κατά φύση.	Φαινοβαρβιτάλη, λακοσαμίδη, λεβετιρασετάμη.
28	Θ	8 ετών	CDKL5: NM_003159.2: c.665delC: p.T222lfs*6 Ετερόζυγη	Πιθανώς Παθογόνος (PVS1,PM2)	ΨΚΚ, στραβισμός.	Ναι από 6 μηνών με συχνότητα μία φορά την εβδομάδα, τονικοκλονικοί.	Μετρίως σοβαρή διαταραχή βασικού ρυθμού με διάσπαρτα αιχμιόμορφα κύματα.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.
29	Θ	5 ετών	FOXP1: NM_005249: c.460dupG: p.E154Gfs*301 Ετερόζυγη	Παθογόνος (PVS1,PM2,PP3,PP5)	Επιληπτική εγκεφαλοπάθεια, ΨΚΚ, στερεοτυπίες γλώσσας, μικροκεφαλία. Προηγηθείσα διάγνωση MCAD.	Ναι από τις πρώτες εβδομάδες ζωής.	Burst suppression.	Απλοποιημένος φλοιός.	Ρουφιναμίδη, λεβετιρασετάμη, κλοβαζάμη, καρνιτίνη.

ΚΩΔΙΚΟΣ	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	ΓΟΝΙΔΙΟ ΠΑΡΑΛΛΑΓΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΥ	ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΠΑΡΑΛΛΑΓΗΣ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ACMG	ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	ΣΠΑΣΜΟΙ	ΗΕΓ	MRI	ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ
30	A	4 ετών	Chr14:29,236,487- 29,238,139del (έλλειμμα που αφορά όλη την κωδική περιοχή του γονιδίου FOXP1) Ετερόζυγο (<i>de novo</i>)	Πιθανώς παθολόγος (0.9) 2B,2D	ΨΚΚ, προοδευτική μικροκεφαλία.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.
31	Θ‡	1 έτους	ARX : NM_139058: c.1430delT: p.I477Tfs*15 Ετερόζυγη	Παθολόγος (PVS1,PM2,PP3)	Επιληπτική εγκεφαλοπάθεια, αυτιστική συμπεριφορά.¥	Ναι τονικοί με βολβοστροφή και κυάνωση με ηλικίας έναρξης 3 εβδομάδων.	Υψαρρυθμικό.	Κατά φύση.	Βαλπροϊκό οξύ.

‡ Πραγματοποιήθηκε και μελέτη απενεργοποίησης Χ χρωμοσώματος αλλά καθότι δεν προσήλθαν οι γονείς δεν είναι εφικτή η γονεϊκή προέλευση του αλληλομόρφου που επιλεκτικά απενεργοποιείται σε ποσοστό 70%.

¥ Από το οικογενειακό ιστορικό αναφέρεται θάνατος του άρρενος αδελφού σε ηλικία 3 μηνών.

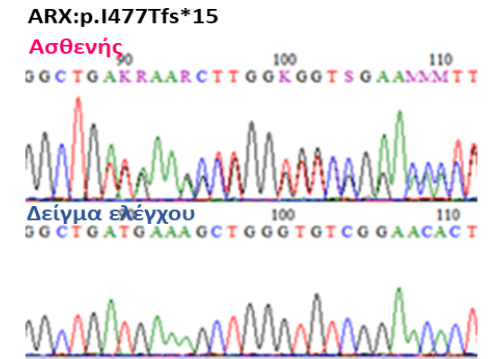
Εικόνα 41: Εικόνες από τα δεδομένα της αλληλούχησης κατά Sanger ή MLPA σε ασθενείς με μοριακή βλάβη των γονιδίων *POLG*, *CDKL5*, *FOXG1*, *ARX*.



Sample report:
 Sample type: Control | Project: MEFC2, FOXG1 | Experiment: MLPA 4.2.20 | Dye: 5-FAM | Performed by: Asim
 Machine: ABI-3500 | Report date: 25/02/20 | Run date: 25/02/20 | Software Version: v.40721.1258 | Normal range: 0.7 - 1.3

D [nt]	Gene-Exon	Chr-band	Hg19 loc.	Height	Area	Ratio	Sidev	[REF]	[Sam]	Width	d[nt]
148	POLG-2	05c14.3	05-088.692939	3522	18143	1.01	0.03	F	38	38	0.1
149	TRIM11B-12	05c14.3	05-087.527454	4341	18155	0.98	0.03	F	38	38	0.1
157	MEP-11	05c14.3	05-085.95262	3745	18159	0.98	0.03	F	39	39	0.1
162	MEP-13	05c14.3	05-085.054408	3370	18026	1.04	0.03	F	51	51	0.1
165	MEP-16	05c14.3	05-084.051118	3317	18211	0.84	0.03	F	41	41	0.1
168	MEP-19	05c14.3	05-084.050819	3337	18433	0.98	0.03	F	46	46	0.1
172	MEP-20	05c14.3	05-084.051748	4749	18811	1.08	0.03	F	30	30	0.0
202	MEP-8	05c14.3	05-084.053289	3105	18342	0.97	0.03	F	36	36	0.1
237	MEP-7	05c14.3	05-084.050406	3411	17273	1.07	0.03	F	47	47	0.1
418	MEP-7	05c14.3	05-084.050406	2562	14169	1.04	0.03	F	41	41	0.0
510	MEP-6	05c14.3	05-083.051414	3511	17630	0.97	0.03	F	41	41	0.1
178	MEP-5	05c14.3	05-084.052487	2040	17833	1.01	0.03	F	40	40	0.1
180	MEP-5	05c14.3	05-084.052895	3748	17180	0.95	0.03	F	38	38	0.1
180	MEP-5	05c14.3	05-084.053093	2545	16810	1.02	0.03	F	38	38	0.0
114	MEP-5	05c14.3	05-084.051150	2055	17253	1.01	0.03	F	38	38	0.0
180	MEP-4	05c14.3	05-084.053241	2104	17398	1.04	0.03	F	43	43	0.0
185	MEP-3	05c14.3	05-084.051539	3335	17248	1.06	0.03	F	39	39	0.0
185	MEP-3	05c14.3	05-084.052424	3473	18674	1.03	0.03	F	39	39	0.0
185	MEP-3	05c14.3	05-084.051467	3541	17046	1.03	0.03	F	39	39	0.1
185	MEP-3	05c14.3	05-084.051802	3747	17182	1.01	0.03	F	43	43	0.0
185	MEP-3	05c14.3	05-084.051626	4341	18340	0.99	0.03	F	39	39	0.1
185	MEP-3	05c14.3	05-084.052039	3887	18340	0.99	0.03	F	39	39	0.1
185	MEP-3	05c14.3	05-084.051158	3374	17915	0.99	0.03	F	45	45	0.1
185	MEP-3	05c14.3	05-084.052825	4119	18648	1.02	0.03	F	43	43	0.0
185	MEP-3	05c14.3	05-084.052825	3153	18342	0.98	0.03	F	43	43	0.1
185	FOXG1-1	14d12	14-028.307603	3943	18422	0.98	0.03	F	47	47	0.0
185	FOXG1-1	14d12	14-028.307603	2183	10481	0.92	0.05	F	<<<	47	0.0
185	FOXG1-1	14d12	14-028.307603	1753	10218	0.94	0.05	F	<<<	38	0.0
188	Reference*	03a29	03-124.861345	2365	18768	0.98	0.03	F	41	41	0.1
188	Reference*	03a29	03-124.861345	3395	20103	1.02	0.03	F	41	41	0.1
190	Reference*	09p12.2	09-124.011124	1818	26695	0.93	0.03	F	39	39	0.0
190	Reference*	07p13	07-144.154445	3547	19170	1.03	0.03	F	47	47	0.0
427	Reference*	08p21.2	08-225.372811	1741	19170	0.97	0.03	F	47	47	0.0
427	Reference*	08p21.2	08-225.372811	1741	19170	0.97	0.03	F	47	47	0.0
400	Reference*	12p23.3	12-101.746333	4049	21783	0.97	0.03	F	49	49	0.1
419	Reference*	18q21	18-051.059149	3695	17720	1.03	0.03	F	38	38	0.1
454	Reference*	22q11.22	22-021.812539	12483	1144	0.03	0.03	F	41	41	0.0

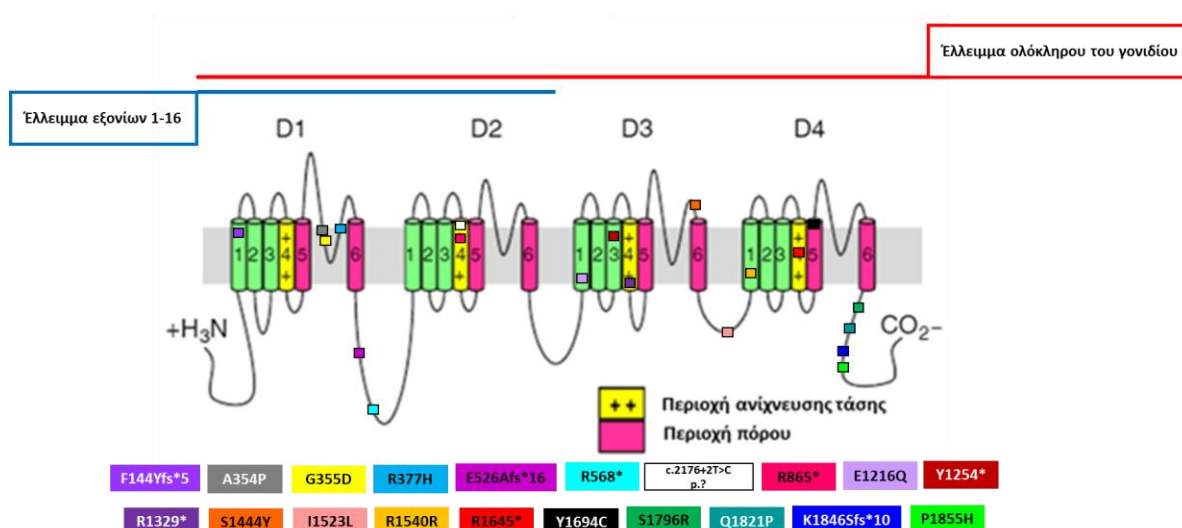
Median value all probe values:
 Chr14:29,236,487-29,238,139del
 Μέγεθος:1,7kb
 Εμπεριέχει ολόκληρη την κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου FOXG1.



4.3 Αποτελέσματα από την μελέτη του γονιδίου *SCN1A*

Από τους 270 ασθενείς που ελέγχθηκαν για σημειακές παραλλαγές εντός του γονιδίου *SCN1A* θετικοί προέκυψαν οι 18 (6,66%) και από τους 41 που ελέγχθηκαν για ελλείμματα ή διπλασιασμούς του γονιδίου θετική ήταν μία ασθενής (2,43%). Σε τρεις ασθενείς στους οποίους πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση επόμενης γενιάς δύο εμφάνιζαν σημειακές παραλλαγές και ένας μερικό έλλειμμα του γονιδίου (δεν συμπεριλήφθηκαν στα προηγούμενα ποσοστά). Η κατανομή μεταξύ των δύο φύλων ήταν ισόποση με 11 θήλεα και 11 άρρενα, ενώ σε 14 αναφέρονταν θετικό οικογενειακό ιστορικό για σπασμούς. Έλεγχος γονεϊκών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε 15 περιστατικά όπου αποκαλύφθηκε κληρονομηση από συμπτωματικό γονέα σε 4 (2 μητέρες, 2 πατέρες), από ασυμπτωματική μητέρα σε 1 και *de novo* εμφάνιση της παραλλαγής σε 10.

Από τις 23 ανευρεθείσες παραλλαγές οι 8 ήταν νέες χωρίς προηγούμενες αναφορές σε βάσεις δεδομένων ή στη διεθνή βιβλιογραφία. Το είδος των παραλλαγών που παρατηρήθηκαν είναι 11 παρανοηματικές, 5 αντινοηματικές, 3 πλαισιοτροπικές, 1 ματίσματος, 1 απαλοιφή ολόκληρου του γονιδίου, 1 απαλοιφή ορισμένων εξονίων του γονιδίου και 1 συνώνυμη. Η τοπολογία των παραλλαγών απεικονίζεται στην Εικόνα 42.



Εικόνα 42: Σχηματική απεικόνιση του εντοπισμού των παραλλαγών του γονιδίου *SCN1A* στο διάλυτο (αναπροσαρμογή από [91]).

Τα κλινικά στοιχεία και οι παραλλαγές που ταυτοποιήθηκαν στους ασθενείς συνοψίζονται στον Πίνακα 27. Εικόνες από τις αντιδράσεις αλληλούχησης και MLPA καθώς και τα γενεαλογικά δέντρα των ασθενών παραθέτονται στις Εικόνες 43 και 44 αντίστοιχα.

Πίνακας 27: Αποτελέσματα και κλινικά στοιχεία ασθενών με παραλλαγές του γονίδιου *SCN1A*. Όλες οι παραλλαγές ανιχνεύθηκαν σε ετεροζυγωτία και η ονοματολογία τους έγινε βάσει του μεταγράφου αναφοράς GRCh37:NM_001165963.4.

ΚΩΔΙΚΟΣ	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	ΠΑΡΑΛΛΑΓΗ	ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΠΑΡΑΛΛΑΓΗΣ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ACMG	ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ	ΚΛΙΝΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ	ΗΕΓ	MRI	ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ
32	Θ	1.5 ετών	c.4567A>T p.I1523L c.5564C>A p.P1855H	Πιθανώς παθογόνος (PM1,PM2,PP2,PP3) Παθογόνος (PS2,PM1,PM2,PM5,PP2,PP3)	Πατρικά ξαδέλφια με επιληψία.	Σπασμοί με έναρξη σε ηλικία 1 έτους.	Χωρίς σαφείς παροξυντικές εστίες.	Διάσπαρτες μικρής έντασης περιοχές με αυξημένη ένταση σε T2 και Flair αλληλουχίες εντός της υποφλοιώδους λευκής ουσίας σε μετωπιαίους λοβούς.	Λεβετιρασετάμη, βαλπροϊκό οξύ.
33	A	7 μηνών	c.1064G>A p.G355D	Παθογόνος (PM1,PM2,PP2,PP3,PP5)	Πατέρας με πυρετικούς στη βρεφική ηλικία και απύρετους σπασμούς (12-28 ετών) και αδελφή με πυρετικούς σπασμούς.	Πυρετικοί σπασμοί με έναρξη σε ηλικία 7 μηνών	Δεν αναφέρεται. <u>Διάγνωση στο 1ο επεισόδιο σπασμών</u>	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.
34	Θ	11 μηνών	c.2176+2T>C	Παθογόνος (PVS1,PP3,PM2)	Μητέρα με σπασμούς (6-15 ετών).	<ul style="list-style-type: none"> Πυρετικοί σπασμοί, το πρώτο επεισόδιο επί εδάφους λοίμωξης COVID-19 σε ηλικία 6 μηνών. Βάδιση με υποστήριξη. Καθυστέρηση λόγου. 	Κατά φύση.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.
35	A	8 ετών	c.5536_5539delAAAC p.K1846Sfs*10	Παθογόνος (PVS1,PP3,PP5,PM2)	Μητρική θεία και εξαδέλφη με επιληψία.	<ul style="list-style-type: none"> Πυρετική επιληπτική κατάσταση σε ηλικία 4.5 μηνών. Τώρα γενικευμένοι τονικοκλονικοί πυρετικοί και απύρετοι σπασμοί. Διαταραχές στο αυτιστικό φάσμα. Σύνδρομο πολλαπλών εξοστώσεων. 	Κατά φύση.	Κατά φύση.	Λεβετιρασετάμη, βαλπροϊκό οξύ, ρισπεριδόνη.

36	Θ	3 ετών	c.3646G>C p.E1216Q	Παθογόνος (PM1,PM2,PP2,PP3,PM5)	Μητέρα με σπασμούς (6-7 ετών).	Επιλεγμένοι πυρετικοί σπασμοί επί εδάφους λοιμώξεως ανώτερου αναπνευστικού.	Δεν αναφέρεται.	Κατά φύση.	Βαλπροϊκό οξύ.
37	A	1,5 ετών	c.5081A>G p.Y1694C	Πιθανώς Παθογόνος (PM1,PM2,PP2,PP3,PP5)	Πατέρας με πυρετικούς και απύρετους σπασμούς (έως 20 ετών) και πατρικός αδελφός με πυρετικούς σπασμούς (έως σήμερα).	<ul style="list-style-type: none"> • Πυρετική επιληπτική κατάσταση σε ηλικία 1,5 ετών. • Ήπια ψυχοκινητική καθυστέρηση υπό λογοθεραπεία και εργοθεραπεία. 	Δεν αναφέρεται. <u>Διάγνωση στο</u> <u>1ο επεισόδιο</u> <u>σπασμών.</u>	Δεν αναφέρεται.	Βαλπροϊκό οξύ.
38	Θ	9 μηνών	c.5081A>G p.Y1694C	Πιθανώς Παθογόνος (PM1,PM2,PP2,PP3,PP5)	Πατέρας με πυρετικούς σπασμούς (έως σήμερα) και πατρικός αδελφός και εξάδελφος με διάγνωση διαυλοπάθειας νατρίου (οικογένεια 37).	Πυρετικοί σπασμοί σε ηλικία 9 μηνών.	Δεν αναφέρεται. <u>Διάγνωση στο</u> <u>1ο επεισόδιο</u> <u>σπασμών.</u>	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.
39	Θ	1 έτους	c.429_430delGT p.F144Yfs*5	Παθογόνος (PVS1,PM1,PP3,PP5)	Μητρικός αδελφός με σπασμούς (έως 15 ετών).	Πολλαπλά επεισόδια πυρετικής επιληπτικής κατάστασης.	Κατά φύση.	Κατά φύση.	Λεβητρασετάμη, βαλπροϊκό οξύ.
40	A	6 ετών	c.1060G>C p.A354P	Παθογόνος (PS2,PM1,PM2,PP2,PP3)	Αρνητικό για νευρολογικά νοσήματα.	Αναπτυξιακή και επιληπτική εγκεφαλοπάθεια με ηλικία έναρξης σπασμών 6 μηνών.	Παθολογικό.	Δεν αναφέρεται.	Λεβητρασετάμη, βαλπροϊκό οξύ, κλοβαζάμη.
41	A	3 ετών	c.4331C>A p.S1444Y	Παθογόνος (PS2,PM2,PP2,PP3,PP5)	Μητρική αδελφή και ανηψιά με πυρετικούς σπασμούς.	<ul style="list-style-type: none"> • Πυρετικοί σπασμοί με έναρξη σε ηλικία 14 μηνών. • Διάσπαση προσοχής. 	Κατά φύση.	Κατά φύση.	Δεν αναφέρεται.

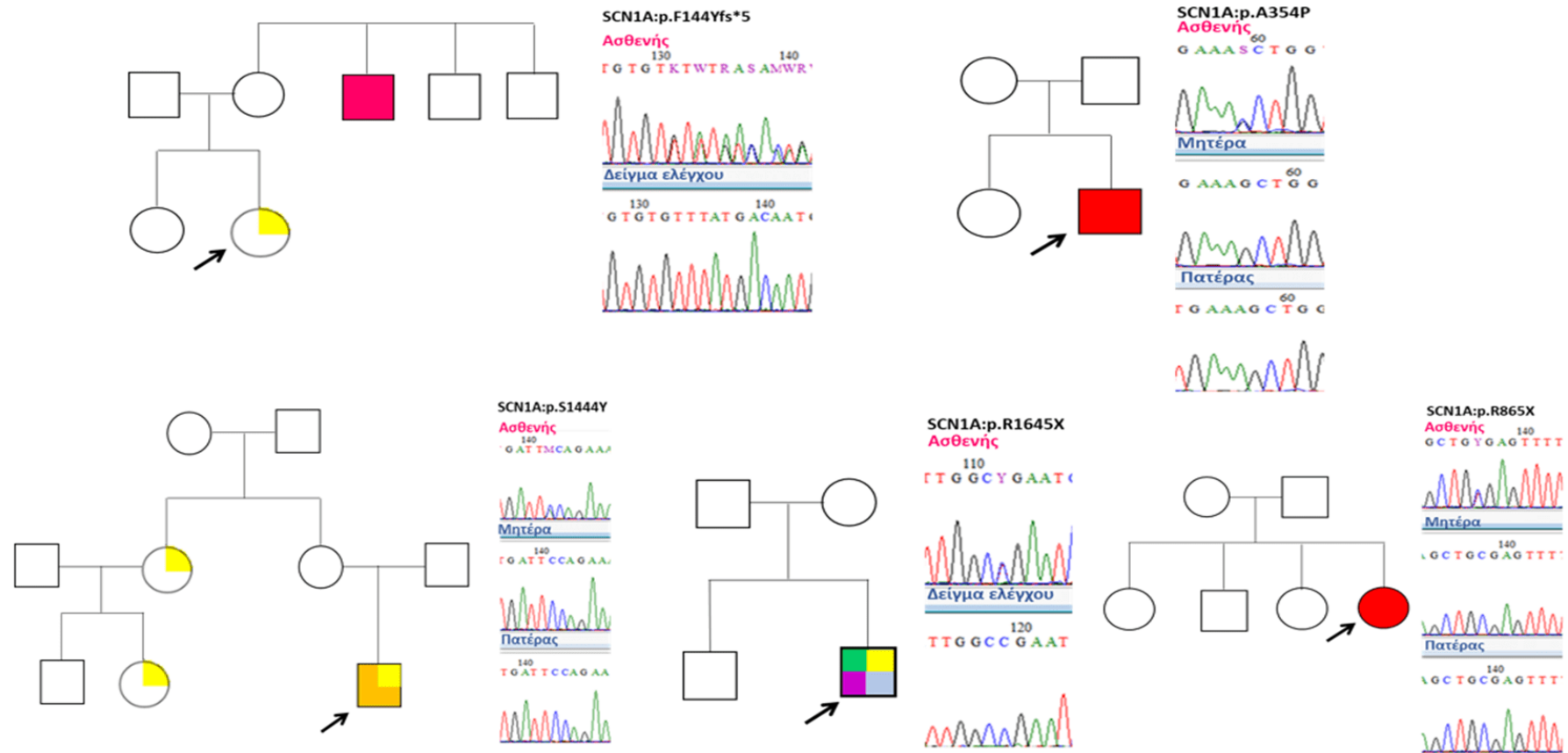
42	A	4 ετών	c.4933C>T p.R1645X	Παθογόνος (PVS1,PM2,PP3,PP5)	Αρνητικό για νευρολογικά νοσήματα.	<ul style="list-style-type: none"> • Πυρετικοί και απύρετοι σπασμοί από ηλικίας 7 μηνών. Τώρα εστιακοί με διάρκεια 3 λεπτών και συχνότητα μία φορά μηνιαίως. • Ήπια ψυχοκινητική καθυστέρηση υπό λογοθεραπεία και εργοθεραπεία. 	Δεν αναφέρεται.	Κατά φύση.	Βαλπροϊκό οξύ.
43	Θ	3,5 ετών	c.2593C>T p.R865X	Παθογόνος (PS2,PVS1,PP3,PP5,PM2)	Αρνητικό για νευρολογικά νοσήματα.	<ul style="list-style-type: none"> • Έναρξη σπασμών μετά τον εμβολιασμό (διφθερίτιδας/ κοκκύτη/ τετάνου). • Πολλαπλά ανά ημέρα επεισόδια αφαιρέσεων και μυοκλονιών. 	Μυοκλονίες και φωτοευαισθησία.	Κατά φύση.	Φαινοβαρβιτάλη, βαλπροϊκό οξύ, λαμοτριγίνη, κλοβαζάμη.
44	Θ	3 ετών	c.5388T>A p.S1796R	Παθογόνος (PS2,PM1,PM2,PP2,PP3,PP5)	Πατέρας με εγκεφαλικό επεισόδιο.	Επιλεγμένοι πυρετικοί και απύρετοι σπασμοί από ηλικίας 2 ετών.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.
45	Θ	2 ετών	c.1130_1131delG Ains AC p.R377H	Παθογόνος (PM1,PM2,PM5,PP2,PP3)	Μητρική ξαδέλφη με πυρετικούς σπασμούς.	Πολλαπλά επεισόδια πυρετικών σπασμών. Διάγνωση επί εδάφους Γρίπης Β.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.	Δεν αναφέρεται.
46	Θ	18 ετών	c.1574_1580delCTGA GGA p.E526Afs*16	Παθογόνος (PS2,PVS1,PM2,PP3,PP5)	Μητέρα με πυρετικούς σπασμούς	<ul style="list-style-type: none"> • Γενικευμένοι τονικοκλονικοί σπασμοί. • Έναρξη σε ηλικία 7 μηνών. • Διάσπαση προσοχής. • Υπερκινητικότητα. • Κινητική αδεξιότητα. • Υψηλό IQ. 	Αρχικά παθολογικό και με φωτοευαισθησία μετά κατά φύση.	Φλεβώδες αιμαγγείωμα υπόφυσης.	Πλέον χωρίς αγωγή, αναφέρεται επιδείνωση των σπασμών σε μικρή ηλικία με τη χορήγηση καρβαζεπίνης.

47	Θ	5 ετών	chr2:166,848,222-167,005,693del μέγεθος:157.5kb εμπεριέχει όλο το γονίδιο <i>SCN1A</i>	Παθογόνος (1) (2B,2C,4L)	Μητρική αδελφή με επιληψία στην ενήλικη ζωή και ξαδέλφη με πυρετικούς σπασμούς	<ul style="list-style-type: none"> • Πυρετικοί και απύρετοι σπασμοί, εστιακοί με γενίκευση, επεισόδια επιληπτικής κατάστασης, μυοκλονικές ατονικές κρίσεις. • Έναρξη σπασμών 6 μηνών. • Ημιπάρεση. 	Κατά φύση.	Κατά φύση.	Λεβετιρασετάμη, βαλπροϊκό οξύ. Αναφέρεται επιδείνωση των σπασμών με τη χορήγηση οξυκαρβαζεπίνης.
48	A	2,5 ετών	c.3762T>A p.Y1254X	Παθογόνος (PS2,PVS1,PM2,PP3,PP5)	Αρνητικό για νευρολογικά νοσήματα.	<ul style="list-style-type: none"> • Πολλαπλά επεισόδια πυρετικών και απύρετων σπασμών με έναρξη σε ηλικία 5 μηνών. • 3 επεισόδια επιληπτικής κατάστασης. • Τρόμος δράσης. 	Μη ειδικά ευρήματα.	Κατά φύση.	Λεβετιρασετάμη, βαλπροϊκό οξύ, τοπιραμάτη.
49	A	2 ετών	c.1702C>T p.R568X	Παθογόνος (PS2,PVS1,PM2,PP3,PP5)	Αρνητικό για νευρολογικά νοσήματα.	<ul style="list-style-type: none"> • Πυρετικοί και απύρετοι σπασμοί με ηλικία έναρξης 3,5 μηνών. • Επεισόδια εμπύρετης επιληπτικής κατάστασης. • Βλεφαροκλονίες. • ΨΚΚ. 	Παθολογικό	Ατροφία του αριστερού κροταφικού λοβού με προοδευτική ατροφία και γλοιώση του σύστοιχου υπόκαμπου (σκληρυνση).	Λεβετιρασετάμη, βαλπροϊκό οξύ, λακοσαμίδη.
50	Θ	2 ετών	c.4620A>G p.R1540R	Πιθανώς παθογόνος (PS2,PM2)	Αρνητικό για νευρολογικά νοσήματα.	<ul style="list-style-type: none"> • Πυρετικοί σπασμοί με έναρξη σε ηλικία 8 μηνών. • Σε ηλικία 1 έτους επεισόδια επιληπτικής κατάστασης. • Μετέπειτα επεισόδια απώλειας συνειδήσεως. 	Επικράτηση δ κυμάτων δεξιά οπίσθια.	Κατά φύση.	Λεβετιρασετάμη.

Εικόνα 43: Γενεαλογικά δέντρα και εικόνες από τα δεδομένα της αλληλούχησης κατά Sanger σε ασθενείς με μοριακή βλάβη του γονιδίου *SCN1A*. Με βέλος σημειώνεται σε κάθε οικογένεια ο ασθενής αναφοράς.

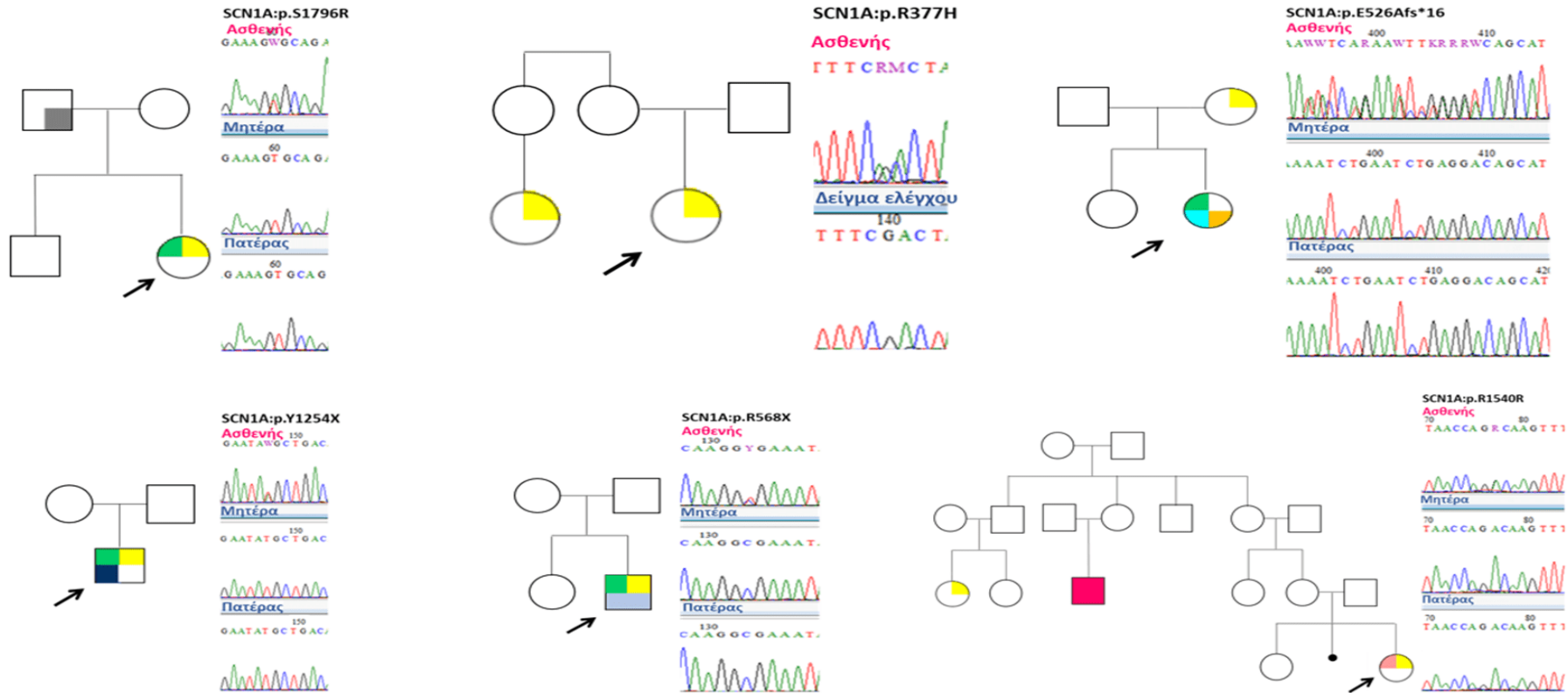


Εικόνα 43: Γενεαλογικά δέντρα και εικόνες από τα δεδομένα της αλληλούχησης κατά Sanger σε ασθενείς με μοριακή βλάβη του γονιδίου *SCN1A* (συνέχεια). Με βέλος σημειώνεται σε κάθε οικογένεια ο ασθενής αναφοράς.



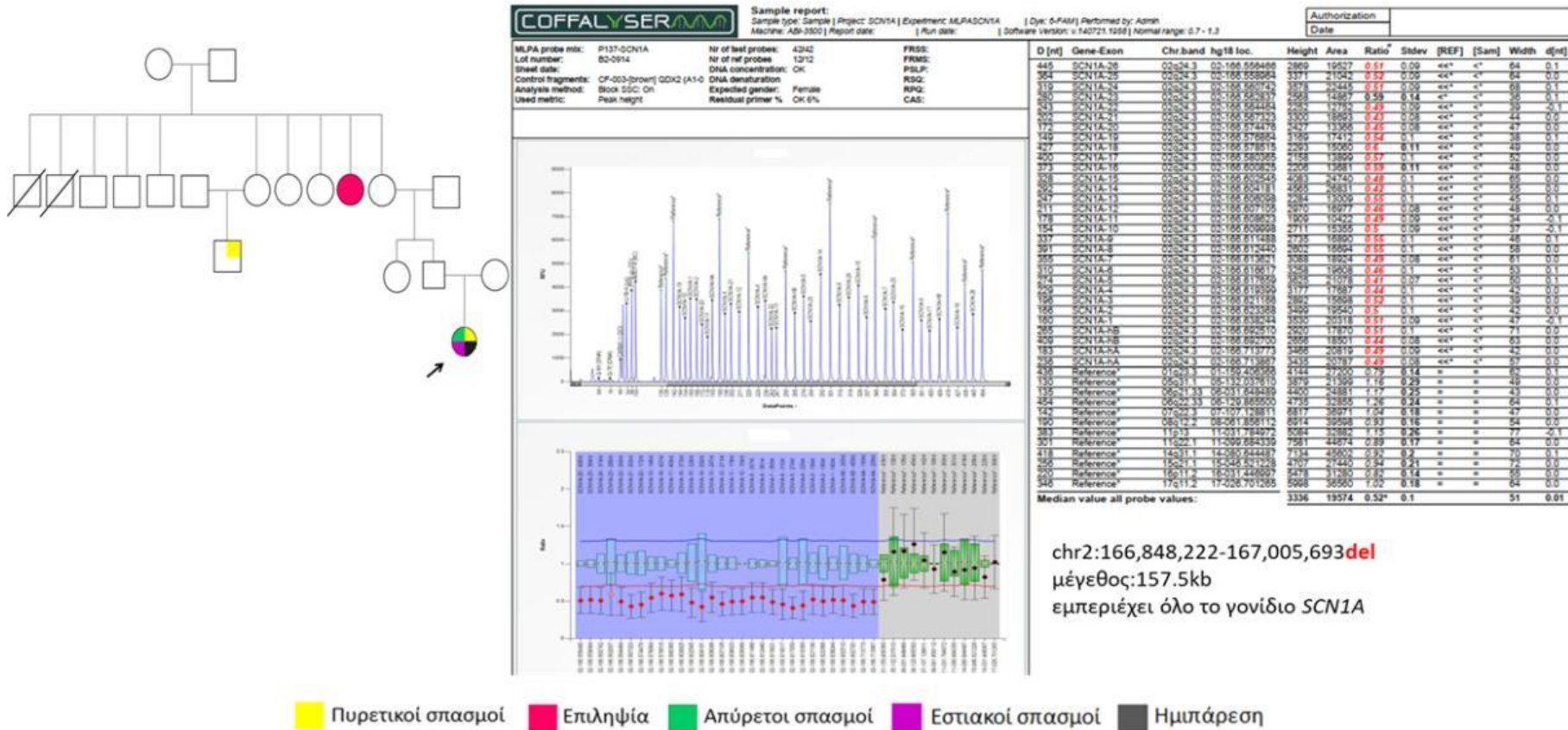
■ Επιληψία
 ■ Πυρετικοί σπασμοί
 ■ Αναπτυξιακή και επιληπτική εγκεφαλοπάθεια
 ■ Διάσπαση προσοχής
 ■ Απύρετοι σπασμοί
 ■ Εστιακοί σπασμοί
 ■ Ψυχοκινητική καθυστέρηση

Εικόνα 43: Γενεαλογικά δέντρα και εικόνες από τα δεδομένα της αλληλούχησης κατά Sanger σε ασθενείς με μοριακή βλάβη του γονιδίου *SCN1A* (συνέχεια). Με βέλος σημειώνεται σε κάθε οικογένεια ο ασθενής αναφοράς.



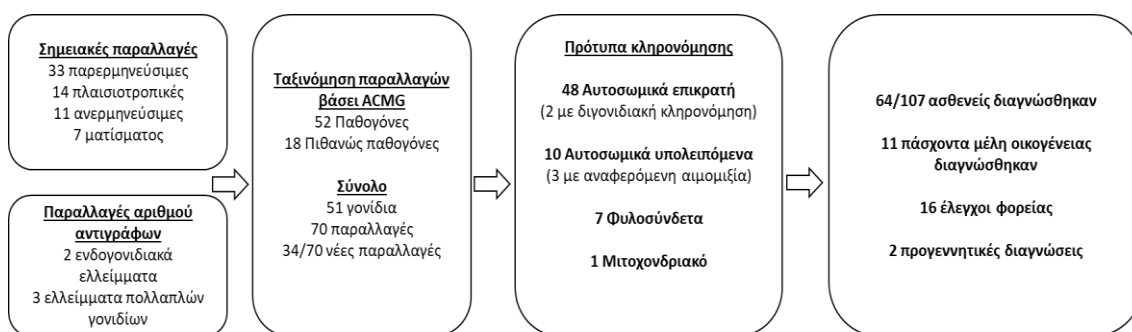
- Εγκεφαλικό επεισόδιο
- Απύρετοι σπασμοί
- Πυρετικοί σπασμοί
- Κινητική αδεξιότητα
- Διάσπαση προσοχής
- Τρόμος δράσης
- Ψυχοκινητική καθυστέρηση
- Επιληψία
- Απώλεια συνειδήσεως

Εικόνα 44: Γενεαλογικό δέντρο και εικόνα από τα δεδομένα του MLPA σε ασθενή με μοριακή βλάβη του γονιδίου *SCN1A*. Με βέλος σημειώνεται σε κάθε οικογένεια ο ασθενής αναφοράς.



4.4 Αποτελέσματα από την αλληλούχηση επόμενης γενιάς

Από τους 107 ασθενείς που μελετήθηκαν με αλληλούχηση επόμενης γενιάς διαγνώστηκαν οι 64 (59,81%) ενώ σε 7 (6,54%) προέκυψαν ευρήματα αβέβαιης κλινικής σημασίας για τα οποία με τα σημερινά δεδομένα δεν είναι ξεκάθαρη η συνεισφορά τους στην κλινική εικόνα των ασθενών. Επιπρόσθετα 11 πάσχοντα μέλη από τις οικογένειες των εξεταζόμενων διαγνώστηκαν αλλά δεν προσμετρήθηκαν στα ανωτέρω ποσοστά. Συνοπτικά τα είδος, η ταξινόμηση και τα πρότυπα κληρονόμησης των παραλλαγών αναφέρονται στην Εικόνα 45. Μελέτη του προτύπου κληρονόμησης πραγματοποιήθηκε σε 44 οικογένειες και *de novo* παραλλαγές διαπιστώθηκαν σε 23 ασθενείς. Αναλυτικά οι ανευρεθείσες παραλλαγές και τα συνδεδεμένα με αυτές νοσήματα συνοψίζονται στον Πίνακα 28. Τα κλινικά στοιχεία των ασθενών αναγράφονται στον Παράρτημα.



Εικόνα 45: Τύπος, ταξινόμηση και πρότυπο κληρονόμησης των παραλλαγών των ασθενών που διαγνώστηκαν με αλληλούχηση επόμενης γενιάς.

Πίνακας 28: Αποτελέσματα από εφαρμογή αλληλούχησης επόμενης γενιάς.

Κωδικός	Γονίδιο/α	Παραλλαγή/ές	Πρότυπο κληρονομιάς/Γονεϊκή προέλευση	Νέα παραλλαγή	Ταξινόμηση βάσει ACMG	Συνδεδεμένο νόσημα (OMIM/ClinVar/Βιβλιογραφία)	Αριθμός καταχώρησης παραλλαγής στη βάση δεδομένων ClinVar
Παθогόνες ή πιθανώς παθогόνες παραλλαγές							
51 CES	GLI3,	NM_000168.6:c.789delG:p.(Thr263fs*45)	AE/ Μητρική	Ναι	Παθогόνος (PVS1,PM2,PP3)	Πολυδακτυλία	VCV001299634.1
	SCN1A	Chr2:166,892,579-167,005,693del (εμπεριέχει τα εξόνια 1-16) †	AE/De νονο	Όχι	Πιθανώς Παθогόνος (0.9-1A,2B,2C,3A)	Σύνδρομο Dravet	-
52	ARX,	NM_139058.3:c.1472delT:p.(Leu491Argfs*10)	ΦΥ/ Μητρική	Ναι	Παθогόνος (PVS1,PM2,PP3)	ΑΕΕ τύπου 1	VCV001299655.1
	SCN1A	NM_001165963.4:c.5462A>C:p.(Gln1821Pro)	AE/ Μητρική	Ναι	Πιθανώς Παθогόνος (PM2,PP2,PP3)	Σύνδρομο Dravet	VCV001338770.1
53	SCN1A	NM_001165963.4:c.3985C>T:p.(Arg1329*)	AE/ Μ.Ε.	Όχι	Παθогόνος (PVS1,PM2,PP3,PP5)	Σύνδρομο Dravet	-
54	SCN2A	NM_001040143.2:c.2986G>A:p.(Asp996Asn)	AE/ Μητρική	Ναι	Πιθανώς Παθогόνος (PM1,PM2,PP1,PP2,PP3)	SLFNIE Βάσει των φαινοτύπων των μελών της οικογένειας	VCV001299578.1
55 CES	KCNQ2	NM_172107.3:c.196delA:p.(Lys66Serfs*67)	AE/ Μ.Ε.	Ναι	Παθогόνος (PVS1,PM2,PP3)	SLNE	VCV000929427.1
56 CES	KCNQ2	NM_172107.4:c.1080G>T:p.(Trp360Cys)	AE/ Μ.Ε.	Όχι	Πιθανώς Παθогόνος (PM1,PM2,PP2,PP3,PP5)	ΑΕΕ τύπου 7	-
57 CES	KCNQ2	NM_172107.4:c.1721G>A:p.(Gly574Asp)	AE/ Μ.Ε.	Όχι	Πιθανώς Παθогόνος (PM1,PM2,PP2,PP3,PP5)	<u>Ενδιάμεσος φαινότυπος</u> μεταξύ SLNIE και ΑΕΕ	-
58	KCNT1	NM_020822.3:c.1016T>G:p.(Leu339Arg)	AE/ De νονο	Ναι	Πιθανώς Παθогόνος (PS2,PM2,PP3)	ΑΕΕ τύπου 14	VCV000929407.1
59	KCNT1	NM_020822.3:c.1421G>A:p.(Arg474His)	AE/ De νονο	Όχι	Παθогόνος (PM1,PM2,PM5,PP3,PP5)	ΑΕΕ τύπου 14	-
60	KCNT1	NM_020822.3:c.1424_1485dup:p.(Asn496Profs*4)	AE/ Πατρική	Ναι	Παθогόνος (PVS1,PM2,PP3)	<u>Νέοι επιληπτικοί φαινότυποι</u> Ασθενής αναφοράς: GGE, Αδελφή: πυρετικοί σπασμοί και αφαιρέσεις	VCV001338769.1
61	KCNJ10	NM_002241.5:c.400C>A:p.(Arg134Ser) (σε ομοζυγωτία**)	AY/ Μητρική / Πατρική	Ναι	Πιθανώς Παθогόνος (PP1,PP2,PP3,PM2)	Σύνδρομο EAST/SeSaME	VCV001299582.1

62	CLCN4	NM_001830.4:c.2152C>T: p.(Arg718Trp)	Φ/ De novo	Όχι	Παθολόγος (PM1,PM2,PP2,PP3,PP5)	Σύνδρομο Raynaud-Claes	-
63	SYNGAP1	NM_006772.3:c.1676+1G>A	AE/ De novo	Ναι	Παθολόγος (PVS1, PS2, PM2, PP3)	Εγκεφαλοπάθεια συνδεδεμένη με το γονίδιο <i>SYNGAP1</i>	VCV001338772.4
64	SYNGAP1	NM_006772.3:c.1534G>T: p.(Glu512*)	AE/ M.E.	Όχι	Παθολόγος (PVS1, PM2, PP5)	Εγκεφαλοπάθεια συνδεδεμένη με το γονίδιο <i>SYNGAP1</i>	-
65	SYNGAP1	NM_006772.3):c.3718C>T: p.(Arg1240*)	AE/ M.E.	Όχι	Παθολόγος (PVS1,PM2,PP5)	Εγκεφαλοπάθεια συνδεδεμένη με το γονίδιο <i>SYNGAP1</i>	-
66	STXBP1	NM_003165.6:c.1217G>A: p.(Arg406His)	AE/ M.E.	Όχι	Παθολόγος (PM2, PM5, PP2, PP3, PP5)	ΑΕΕ τύπου 4	-
67	STXBP1	NM_003165.6:c.1651C>T: p.(Arg551Cys)	AE/ M.E.	Όχι	Παθολόγος (PS3,PM1,PM2,PM5,PP2, PP3,PP5)	ΑΕΕ τύπου 4	-
68	PCDH19	NM_001105243.2:c.95A>T: p.(Glu32Val)	Φ/ Μητρική	Ναι	Πιθανώς Παθολόγος (PM1, PM2, PP2, PP3)	ΑΕΕ τύπου 9	VCV001338771.1
69	PCDH19	NM_001105243.2:c.1153C>T: p.(Gln385*)	Φ/ M.E.	Ναι	Πιθανώς Παθολόγος (PM1,PM2,PP2,PP5)	ΑΕΕ τύπου 9	VCV001695337.1
70	PCDH19	NM_001184880.2:c.1019A>G: p.(Asn340Ser)	Φ/ Μητρική	Όχι	Παθολόγος (PM1,PM2,PM5,PP2,PP3,PP5)	ΑΕΕ τύπου 9	-
71	MECP2	NM_004992.4:c.378-3C>G	Φ/ De novo	Όχι	Παθολόγος (PS2, PM2, PP5)	Σύνδρομο Rett	-
72	NHLRC1	NM_198586.3:c.583delG: p.(Asp195Ilefs*37) (σε ομοζυγωτία**)	AY/ Μητρική / Πατρική	Ναι	Παθολόγος (PVS1,PM2,PP3)	Προοδευτική μυοκλονική επιληψία τύπου 2B (Νόσος Lafora)	VCV001299569.1
73	COL4A1	NM_001845.6:c.3761G>A: p.(Gly1254Glu)	AE/ De novo	Ναι	Παθολόγος (PS2,PM1,PM2,PM5,PP2,PP3)	Νόσος μικρών αγγείων του εγκεφάλου τύπου 1	VCV001299527.3
74	COL4A2	NM_001846.4:c.1011+1G>A	AE/ Μητρική	Ναι	Παθολόγος (PVS1, PM2, PP3)	Νέος επιληπτικός φαινότυπος DEE-SWAS	VCV001299561.1
75	CSNK2B	NM_001320.7:c.472delG: p.(Tyr158Thrfs*69)	AE/ De novo	Ναι	Παθολόγος (PVS1,PS2,PM2,PP3)	Νευροαναπτυξιακό σύνδρομο Poirier-Bienvenu	VCV001299532.1
76	CSNK2B	NM_001320.7:c.467G>A: p.(Gly156Asp)	AE/ De novo	Ναι	Παθολόγος (PS2,PM1,PM2,PP2,PP3)	Νευροαναπτυξιακό σύνδρομο Poirier-Bienvenu	VCV001342878.1
77 CES	IFIH1	NM_022168.4:c.2465G>A: p.(Arg822Gln)	AE/ Πατρική	Όχι	Παθολόγος (PM1,PP2,PP3,PP5)	Σύνδρομο Aicardi-Goutieres 7/ Singleton-Merten 1	-
78	DEPDC5	NM_001242896.3:c.147-2A>C	AE/ De novo	Ναι	Παθολόγος (PVS1,PS2,PM2,PP3)	Εστιακή επιληψία με ποικίλες εστίες τύπου 1	VCV001299564.1
79 CES	AFF3	NM_001025108.2: c.767_768delCGinsGA: p.(Pro256Arg)	AE/ De novo	Ναι	Παθολόγος (PM1,PM2,PM5,PP3,PS2)	Σύνδρομο KINSSHIP	VCV001338773.2
80	TCF4	NM_001243226.3:c.2147C>: p.(Ala716Val)	AE/ M.E.	Όχι	Παθολόγος (PS3,PM1,PM2,PM5,PP2,PP3, P5)	Σύνδρομο Pitt-Hopkins	-

81	PACS2	NM_001100913.3:c.625G>A: p.(Glu209Lys)	AE/ De novo	Όχι	Παθολόγος (PS3,PM1,PM2,PP3,PP5)	ΑΕΕ τύπου 66	-
82	PRRT2	NM_145239.3:c.880-1G>T	AE/ De novo	Όχι	Παθολόγος (PVS1,PM2,PS2,PP3,PP5)	SLIE τύπου 2	-
83	PRRT2	NM_145239.3:c.649dupC: p.(Arg217Profs*8)	AE/ Πατρική	Όχι	Παθολόγος (PVS1, PS3, PP5)	SLFIE τύπου 2	-
84	PRRT2	Chr16:29,495,011-30,206,548del (εμπριέχει 31 γονίδια και ανάμεσά τους το PRRT2)	AE/ Μ.Ε.	Μερική επικάλυψη με ήδη γνωστά ελλείμματ α	Παθολόγος (1-1A,2A,2H,3B,4O,4L)	Σύνδρομο ελλείμματος 16p11.2	-
85	SMARCA2	NM_003070.5:c.3479C>G: p.(Ala1160Gly)	AE/ De novo	Ναι	Παθολόγος (PM1,PM2,PP2,PP3,PS2)	Σύνδρομο Nicolaidis-Baraitser	VCV001320261.2
86	GALC	NM_000153.4:c.396G>A: p.(Trp132*)/ NM_000153.4:c.749T>C: p.(Ile250Thr)	AY/ Μητρική / Πατρική	Όχι/ Όχι	Παθολόγος (PVS1,PM2,PP3,PM3)/ Παθολόγος (PM2,PP2,PP3,PP5,PM3)	Νόσος Krabbe	- -
87	AP4S1	NM_001128126.3: c.138+3_138+6delAAGT (σε ομοζυγωτία)	AY/ Μ.Ε.	Όχι	Παθολόγος (PP3,PP5,PM2,PM4)	Σπαστική παραπληγία τύπου 52	-
88	HNRNPU	NM_031844.3:c.1060_1061del: p.(Ile354*)	AE/ Μ.Ε.	Όχι	Παθολόγος (PVS1, PM2, PP3, PP5)	ΑΕΕ τύπου 54	-
89	H3-3A	NM_002107.7:c.377A>G: p.(Gln126Arg)	AE/ De novo	Όχι	Παθολόγος (PM2,PP2,PP3,PP5)	Νευροαναπτυξιακό σύνδρομο Bryant-Li-Bhoj τύπου 1	-
90	NOTCH3	NM_000435.3:c.458G>A: p.(Arg153His)	AE/ Μητρική	Όχι	Πιθανώς Παθολόγος (PM1,PM2,PM5,PP2)	Νόσος CADASIL	-
91	CAPRIN1	NM_005898.5: c.1493_1496delGCAA: p.(Ser498Asnfs*10)	AE/ De novo	Ναι	Παθολόγος (PS2,PVS1,PM2)	Νευροαναπτυξιακές διαταραχές σχετιζόμενες με το γονίδιο CAPRIN1	VCV001338774.1
92	BRCA2	NM_000059.4:c.316G>A: p.(Gly106Arg)/ NM_000059.4:c.4515_4525del: p.(Phe1506Thrfs*4)	AY/ Μητρική / Πατρική	Όχι/ Όχι	Πιθανώς Παθολόγος (PVS1, PM2, PM3)/ Παθολόγος (PVS1, PP5, PM2)	Αναμία Fanconi & σχετιζόμενες παραλλαγές του εγκεφαλικού φλοιού	- -
93	FOXG1	NM_005249.5:c.500delA: p.(Glu167Glyfs*25)	AE/ Μ.Ε.	Όχι	Παθολόγος (PVS1, PM2, PP5)	FOXG1-εγκεφαλοπάθεια	-
94	DCX	NM_000555.3:c.427G>A: p.(Asp143Asn)	Φ/ Μ.Ε.	Όχι	Παθολόγος (PM1,PM2,PM5,PP2,PP3,PP5)	Φυλοσύνδετη υποφλοιώδης εστιακή ετεροτοπία	-

95	WDR73	NM_032856.5:c.525_565dup: p.(Asp189Valfs*6) Chr15: 84,908,070-85,681,134del (εμπεριέχει 9 γονίδια και ανάμεσά τους το <i>WDR73</i>)	AY/ Μ.Ε.	Ναι/	Πιθανώς Παθογόνος/ (PVS1,PM2)	Σύνδρομο Galloway-Mowat syndrome τύπου 1	VCV001697350.1
				Μερική επικάλυψη με ήδη γνωστά ελλείμματ α	Παθογόνος (1-1A,2A,2H,3A,4L,4N)		-
96	MT-ND5	ChrM:m.13513G>A MT-ND5:ENST00000361567.2: c.1177G>A: p.(Asp393Asn) <i>Σε ετεροπλάσμία υπέρ της παραλλαγής</i>	MT/ Μητρική	Όχι	Παθογόνος (PM2,PP3,PP5)	Σύνδρομο Leigh	-
97	MAP2K1	NM_002755.4:c.389A>G: p.(Tyr130Cys)	AE/ Μ.Ε.	Όχι	Παθογόνος (PM1,PM2,PM5,PP3,PP5)	Κάρδιο-πρόσωπο-δερματικό σύνδρομο τύπου 3	-
98	PAFAH1B1	NM_000430.4:c.425T>C: p.(Phe142Ser)	AE/ De νονο	Ναι	Παθογόνος (PS2,PM1,PM2, PP2,PP3)	Υποφλοιώδης εστιακή ετεροτοπία	VCV001697351.1
99	ABAT	NM_020686.6:c.1153G>T: p.(Asp385Tyr)/ Chr16:8,841,965_8,851,663del (εμπεριέχει τα εξόνια 4-6)****	AY/ Πατρική/ Μητρική	Ναι/ Ναι	Πιθανώς Παθογόνος (PM2,PP3,PM3)/ Αβέβαιης κλινικής σημασίας (0.45-1A,2B,2E,3A), <i>Παθογόνος μετά από μελέτη σε επίπεδο RNA</i>	Ανεπάρκεια GABA-τρανσαμινάσης	VCV001698380.1 VCV001698381.1
100	7q11.23 deletion syndrome	Chr7:72,717,395-74,173,168del (εμπεριέχει 25 γονίδια) [†]	AE/ Μ.Ε.	Όχι	Παθογόνος (1-1A,2A,2H,3A,4L)	Σύνδρομο Williams-Beuren	-
101	TSC1	NM_000368.5:c.2080C>T: p.(Gln694*)	AE/ Μ.Ε.	Όχι	Παθογόνος (PVS1,PM2)	Οζώδης Σκλήρυνση τύπου 1	-
102	KAT6A	NM_006766.5:c.376A>T: p.(Lys126*)	AE/ De νονο	Ναι	Παθογόνος (PS2,PVS1,PM2)	Σύνδρομο Arboleda-Tham	VCV001697352.1
103	KAT8	NM_182958.3:c.275A>G: p.(His92Arg)	AE/ De νονο	Ναι	Παθογόνος (PS2,PM1,PM2,PP3)	Σύνδρομο Li-Ghorbani-Weisz-Hubshman	VCV001684624.1
104	ATP1A2	NM_000702.4:c.2192T>C: p.(Met731Thr)	AE/ Μητρική	Όχι	Πιθανώς Παθογόνος (PM2,PM5,PP3,PP5)	Οικογενής ημιπληγική ημικρανία τύπου 2	-
105	ATP6V1B2	NM_001693.4:c.1121A>G: p.(Glu374Gly)	AE/ De νονο	Ναι	Παθογόνος (PS2,PM2,PM5,PP2,PP3)	ΑΕΕ σχετιζόμενη με παραλλαγές του γονιδίου <i>ATP6V1B2</i>	VCV001334193.1
106	ZNF142	NM_001105537.4:c.382_383delA A:p.(Lys128Gluufs*2) (σε ομοζυγωτία**)	AY/ Μητρική/ Πατρική	Ναι	Πιθανώς Παθογόνος (PVS1,PM2)	Νευροαναπτυξιακή διαταραχή με δυσχέρεια λόγου και σπασμούς	VCV001698427.1

107	ANK2	NM_001148.6: c.2968C>T: p.(Arg990*)	AE/ M.E.	Όχι	Πιθανώς Παθογόνος (PVS1,PM2)	Σύμπλοκη νευροαναπτυξιακή διαταραχή σχετιζόμενη με το γονίδιο ANK2 (από ClinGen)	-
108	CUX2	NM_015267.4: c.2502dupC: p.(Glu835Argfs*21)	AE/ Πατρική	Ναι	Πιθανώς Παθογόνος (PVS1,PM2)	ΑΕΕ τύπου 67	VCV001299609.2
109	GPT2	NM_133443.4:c.1441G>A: p.(Gly481Ser) (σε ομοζυγωτία)	AY/ Μητρική/ Πατρική	Ναι	Πιθανώς Παθογόνος (PM2,PP2,PP3)	Νευροαναπτυξιακή διαταραχή με μικροκεφαλία και σπαστική παραπληγία	VCV001701973.1
110 CES	NR2F1	NM_005654.6:c.907C>T: p.(Gln303*)	AE/ De novo	Ναι	Παθογόνος (PS2, PVS1, PM2)	Σύνδρομο οπτικής ατροφίας Bosch-Boonstra-Schaaf	SCV002584969
111	PURA	NM_005859.5:c.224T>G: p.(Leu75Arg)	AE/ De novo	Ναι	Παθογόνος (PS2,PM2,PM5,PP2,PP3,PP5)	Σύνδρομο PURA	VCV001299597.1
112	STXBP1	NM_001032221.6:c.993delG: p.(Lys332Argfs*24)	AE/ De novo	Ναι	Παθογόνος (PVS1,PM2,PP3)	ΑΕΕ τύπου 4	VCV001299648.1
113	TGM6	NM_198994.3:c.1336+1G>T	AE/ Paternal	Ναι	Παθογόνος (PVS1,PM2,PP5)	Νωτιαιοπαρεγκεφαλιδική αταξία τύπου 35	VCV001299628
114	TOR1A	NM_000113.3:c.862C>T: p.(Arg288*) (σε ομοζυγωτία)	AY/ Μητρική/ Πατρική	Όχι	Παθογόνος (PVS1, PM2, PP5)	Συγγενής αρθρογρύπωση τύπου 5	-
Παραλλαγές αβέβαιης κλινικής σημασίας							
115	MECP2	NM_004992.4:c.710G>T: p.(Gly237Val)	Φ/ M.E.	Όχι	Αβέβαιης κλινικής σημασίας (PM2,PP2)	Σύνδρομο Rett	-
	ALDH18A1	NM_001323418.2:c.907+1G>A	AE/AY M.E.	Όχι	Πιθανώς Παθογόνος (PVS1,PM2)	Cutis Laxa (AD/AY)/ Σπαστική παραπληγία (AD/AY)	-
116	PNPO	NM_018129.4:c.674G>T: p.(Arg255His)/ Chr17:44,949,883-46,507,482dup (εμπεριέχει 25 γονίδια και ανάμεσά τους το <i>PNPO</i>)	AY/ Μητρική/ Πατρική	Όχι	Παθογόνος (PM1,PM2,PM5,PP3,PP5)/ Αβέβαιης κλινικής σημασίας (0.4-1A,2H,2K,2L,3A,4O,4L)	Ανεπάρκεια οξειδάσης πυριδοξαμίνης 5'- φωσφορικού	- -
117	ODC1	Chr2:10,580,850-10,585,158dup (εμπεριέχει τα εξόνια 3-12)	AD/ M.E.	Ναι	Αβέβαιης κλινικής σημασίας (0 -1A,2H,3A)	Σύνδρομο Bachmann-Bupp	-
118 trio WES	ARMCX2	NM_014782.7:c.327dupT: p.(Gly110Trpfs*17)	Άγνωστο/ De novo (η παραλλα γή	Ναι	Παθογόνος (PS2,PVS1,PM2)	Άγνωστο	-

			ανιχνεύθ ηκε σε ετεροζυγ ωτία)				
119	ATP2C2	NM_014861.4:c.2312T>C: p.(Met771Thr)	Άγνωστο/ M.E. (η παραλλα γή ανιχνεύθ ηκε σε ετεροζυγ ωτία)	Όχι	Αβέβαιης κλινικής σημασίας (PM2,PP3)	Άγνωστο	-
120	MED13L	NM_015335.5:c.5057C>T: p.(Thr1686Met)	ΑΕ/ Μητέρα και αδελφή χωρίς την παραλλα γή	Όχι	Αβέβαιης κλινικής σημασίας (PM2,PP3)	NY με διακριτά δυσμορφικά στίγματα προσώπου με ή χωρίς καρδιακές διαταραχές	-
121	HUWE1	NM_031407.7:c.2210C>T: p.(Ala737Val)	Φ/ M.E.	Ναι	Αβέβαιης κλινικής σημασίας (PM2,PP3)	Φυλοσύνδετη NY τύπου Turner	-

ΑΕ: αυτοσωμικό επικρατητικό, ΑΥ: αυτοσωμικό υπολειπόμενο, Φ: φυλοσύνδετο, ΜΤ: μιτοχονδριακό, ΜΕ: μη εφαρμόσιμο, **αναφερόμενη συγγένεια γονέων, ****επιβεβαίωση με μελέτη σε επίπεδο RNA , †επιβεβαίωση με MLPA, ††επιβεβαίωση με STR.

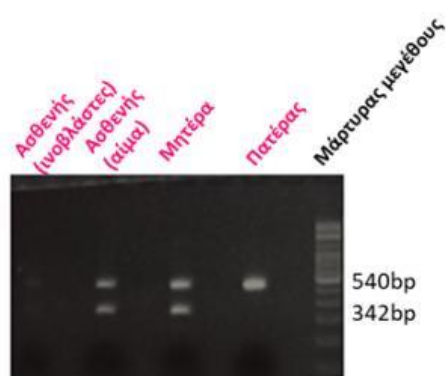
4.5 Αποτελέσματα από την μελέτη RNA για την οικογένεια 99

Τα αναμενόμενα προϊόντα από την RT-PCR (ενότητα 3.2.8) απεικονίζονται στην Εικόνα 46. Από τις διακριτές μπάντες φαίνεται ότι η ασθενής και η μητέρα της φέρουν το προϊόν 342 ζευγών βάσεων που αντιστοιχεί στο ετερόζυγο έλλειμμα ενώ και οι τρεις φέρουν το προϊόν 540 ζευγών βάσεων που αντιστοιχεί στη φυσιολογική αλληλουχία (Εικόνα 47). Σημειώνεται ότι το PCR προϊόν από το cDNA των ινοβλαστών της ασθενούς είναι μικρότερης έντασης σε σχέση με τα δείγματα αίματος καθότι ποσοτικά το ολικό RNA που απομονώθηκε ήταν λιγότερο.



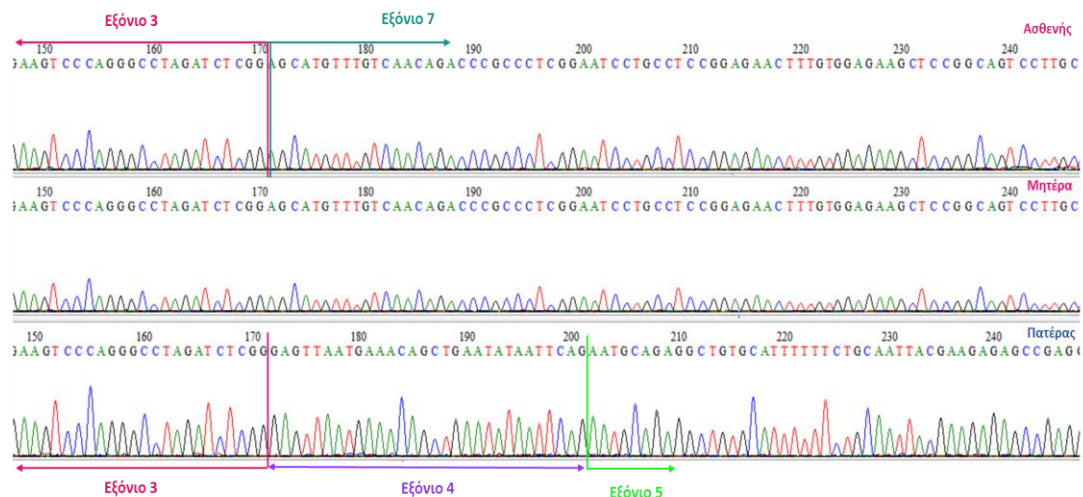
Προϊόν	Εξόνια	Μήκος (ζεύγη βάσεων)	Συνολικό μήκος
Φυσιολογικό προϊόν	Εξόνιο 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	111, 98, 30, 118, 50, 81, 93	540 ζεύγη βάσεων
Προϊόν αλληλίου με έλλειψη	Εξόνιο 2, 3, 7, 8	111, 98, 81, 93	342 ζεύγη βάσεων

Εικόνα 46: Απεικόνιση των αναμενόμενων αποτελεσμάτων μετά την RT-PCR για τα εξόνια 2-8 του γονιδίου *ABAT* σε αλληλία με φυσιολογική αλληλουχία ή φέροντα το έλλειμμα των εξονίων 4-6.



Εικόνα 47: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης μετά την εφαρμογή RT-PCR για τα εξόνια 2-8 του γονιδίου *ABAT* στην ασθενή και τους γονείς της.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης κατέδειξαν ότι το μητρικής προέλευσης έλλειμμα της ασθενούς αφορά αποκλειστικά τα εξόνια 4-6 με τις ακριβείς συντεταγμένες που προέκυψαν και από τα δεδομένα της αλληλούχησης επόμενης γενιάς και του ExomeDepth (Εικόνα 48).



Εικόνα 48: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης μετά την RT-PCR για τα εξόνια 2-8 του γονιδίου *ABAT*.

4.6 Αποτελέσματα από την μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης σε θήλεα με παραλλαγές σε φυλοσύνδετα γονίδια

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης ταυτοποιήθηκαν δύο θήλεα με παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου *ARX*, μία συμπτωματική (ασθενής 31) και μία ασυμπτωματική μητέρα δύο άρρενων ασθενών (οικογένεια WES 52) οπότε για την προσπάθεια κατανόησης του παθογενετικού μηχανισμού που δύναται να οδηγήσει στην εκδήλωση συμπτωμάτων πραγματοποιήθηκε μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης.

Από τα αποτελέσματα πρόκυψε για την ασθενή επιλεκτική μεθυλίωση και άρα απενεργοποίηση του ενός αλληλομόρφου της τάξης του 70% στην πολυμορφική επανάληψη του γονιδίου *AR* και 90% στο *PCSK1N* ενώ στο *FMR1* το πρότυπο μεθυλίωσης ήταν τυχαίο. Καθότι οι γονείς της ασθενούς δεν προσήλθαν για δειγματοληψία δεν καθίσταται εφικτή η αναγνώριση της γονεϊκής προέλευσης των αλληλίων που επιλεκτικά απενεργοποιούνται. Στην ασυμπτωματική μητέρα η μελέτη πραγματοποιήθηκε συγκριτικά με τον έναν εκ των δύο ασθενών γιών της για να ταυτοποιηθεί συγχρόνως και το X χρωμόσωμα που φέρει την παραλλαγή. Από τον συγκριτικό έλεγχο μη πληροφοριακή ήταν η μελέτη στο γονίδιο *FMR1*, ενώ στις επαναλήψεις των γονιδίων *PCSK1N* και *AR* παρατηρήθηκε επιλεκτική μεθυλίωση των αλληλίων που φέρουν την βλάβη σε ποσοστά 70% και 90% αντίστοιχα. Εικόνες από την ανάλυση του προτύπου μεθυλίωσης ανευρίσκονται στο παράρτημα.

Στις περιπτώσεις θήλεων ασθενών με παραλλαγές του γονιδίου *PCDH19* μελετήθηκαν τυχόν διαφορές στο πρότυπο μεθυλίωσης που θα μπορούσαν αντίστοιχα να εξηγήσουν τη διαφορά στη βαρύτητα της κλινικής εικόνας των ασθενών. Ειδικότερα η ασθενής 69 έχει διάγνωση ΑΕΕ, ενώ η 68 για GEFS+ όπως και η μητέρα της η οποία της φέρει επίσης την παραλλαγή.

Από τα αποτελέσματα για την ασθενή 69 προκύπτει επιλεκτική απενεργοποίηση της τάξης του 90% στο γονίδιο *FMR1*, τυχαίο πρότυπο στο *AR* ενώ δεν είναι πληροφοριακή στο *PCSK1N*. Καθότι οι γονείς της ασθενούς δεν προσήλθαν για δειγματοληψία δεν καθίσταται εφικτή η αναγνώριση της γονεϊκής προέλευσης του αλληλίου που επιλεκτικά απενεργοποιείται. Στην οικογένεια 68 παρατηρείται τυχαίο πρότυπο τόσο στην μητέρα όσο και στην κόρη στις πολυμορφικές επαναλήψεις των γονιδίων *FMR1* και *AR* και δεν είναι πληροφοριακή στο *PCSK1N*. Εικόνες από την ανάλυση του προτύπου μεθυλίωσης ανευρίσκονται στο παράρτημα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Σχολιασμός παραλλαγών που εντοπίστηκαν με αλληλούχηση κατά Sanger ή MLPA

5.1.1 Παραλλαγές γονιδίου *MECP2*

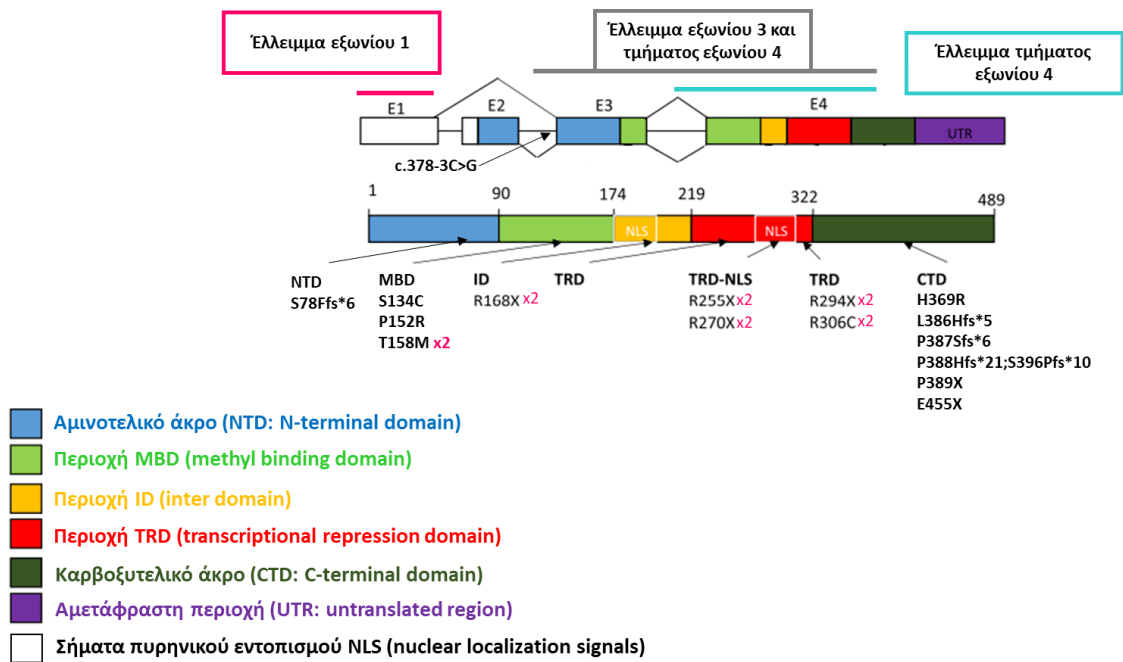
Οι οκτώ συχνότερες «hotspot» παραλλαγές του γονιδίου είναι οι p.R106W, p.R133C, p.T158M, p.R168X, p.R255X, p.R270X, p.R294X, p.R306C εκ των οποίων όλες εκτός των p.R106W και p.R133C ανιχνεύθηκαν στο 54,54% των εξεταζόμενων. Η ασθενής 16 έφερε δύο πλαισιοτροπικές παραλλαγές στο ένα της αλληλίου (όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.2.6) ενώ υπήρχε και μεμονωμένη περίπτωση κληρονόμησης νέας παραλλαγής αβέβαιης κλινικής σημασίας από ασυμπτωματική μητέρα (οικογένεια 11) (Εικόνα 49).

Ανάλογα με το σημείο εμφάνισής τους οι παραλλαγές του γονιδίου *MECP2* οδηγούν σε δυσλειτουργία της παραγόμενης πρωτεΐνης μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Οι παραλλαγές της δομικής περιοχής NTD οδηγούν σε μειωμένη ικανότητα της *MECP2* για αλληλεπίδραση με το DNA, αντίστοιχα παραλλαγές της περιοχής MBD επηρεάζουν την τεταρτοταγή της διαμόρφωση στον χώρο καθώς και την συγγένεια πρόσδεσής της σε μεθυλιωμένες κυτοσίνες. Παραλλαγές του καρβοξυτελικού άκρου επιδρούν αρνητικά στις αλληλεπιδράσεις της με διάφορους άλλους στόχους της όπως μόρια RNA ή χρωματίνη. Σε ότι αφορά το αμινοτελικό άκρο οι καταγεγραμμένοι με παραλλαγές του ασθενείς είναι λίγοι και δεν μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για τον ακριβή μηχανισμό που οδηγεί σε νόσο ωστόσο φαίνεται να εμφανίζουν ηπιότερη κλινική εικόνα. Σε ποσοστό >70% των ασθενών με παρερμηνεύσιμες παραλλαγές αυτές αφορούν την περιοχή MBD ενώ 10% των ασθενών έχει ανερμηνεύσιμες ή πλαισιοτροπικές παραλλαγές στο καρβοξυτελικό άκρο. Από την ομάδα ασθενών με ανερμηνεύσιμες ή πλαισιοτροπικές παραλλαγές το 90% φέρει τις p.R168X, p.R255X, p.R270X και p.R294X. Αξίζει να αναφερθεί ότι 5,1% των ασθενών φέρει την παραλλαγή p.R306C η οποία ενώ σύμφωνα με μελέτες καταστέλλει τη σύνδεση *MECP2*-*NCOR* φαίνεται να οδηγεί σε ηπιότερο φαινότυπο [166].

Σύμφωνα με τις διαθέσιμες μελέτες οι παραλλαγές p.P152R και p.S134C επηρεάζουν την ικανότητα αποδίπλωσης (unfolding) της MBD και μειώνουν τη

συγγένεια πρόσδεσης σε μεθυλιωμένες κυτοσίνες του DNA. Η παραλλαγή p.T158M δεν επηρεάζει τη δομή της MBD αλλά τη συγγένεια πρόσδεσης σε μεθυλιωμένες και μη κυτοσίνες ενώ η μελέτη της σε ζωικό μοντέλου ποντικού κατέδειξε μεγάλη μείωση των επιπέδων της στον πυρήνα, φαινότυπος που κατέστη δυνατό να διασωθεί όταν αυξήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της παραλλαγμένης πρωτεΐνης. Η μειωμένη ποσότητα που ανευρέθηκε θεωρείται ότι οφείλεται σε πρωτεοσωμική αποικοδόμηση. Η παραλλαγή p.R294X φαίνεται να καταργεί τις αλληλεπιδράσεις νουκλεοσώματος – νουκλεοσώματος και κατά συνέπεια την οργάνωση της ετεροχρωματίνης από την MECP2. Από τις λειτουργικές μελέτες των συχνών ανερμηνεύσιμων παραλλαγών του γονιδίου *MECP2* προκύπτει πως όσο πιο απομακρυσμένα από την κανονική θέση τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης είναι η παραλλαγή τόσο βαρύτερη είναι η κλινική εικόνα των ασθενών (πχ ασθενής με την p.R168X θα έχει βαρύτερη νόσο σε σχέση με ασθενή με την p.R294X) [166].

Όλοι οι ασθενείς της παρούσας μελέτης με μοριακή βλάβη του γονιδίου εμφάνιζαν ψυχοκινητική καθυστέρηση ενώ παλινδρόμηση των κεκτημένων ικανοτήτων αναφέρθηκε σε 8. Στερεοτυπίες είχαν 13, μικροκεφαλία 12 και σπασμούς 9 άτομα. Σε 5 ασθενείς το ηλεκτροεγκεφαλογράφημα είχε ευρήματα χωρίς να υπάρχει ιστορικό κλινικών σπασμών. Από τις υπόλοιπες κλινικές εκδηλώσεις αταξία σημειώθηκε σε 6, υποτονία σε 4, αυτοτραυματισμοί σε 2 και υπερκινητικότητα σε 2 ασθενείς. Όλα τα ανωτέρω χαρακτηριστικά αποτελούν κλινικές εκδηλώσεις συμβατές με σύνδρομο Rett.



Εικόνα 49: Σχηματική απεικόνιση της τοπολογίας των παραλλαγών που ταυτοποιήθηκαν στο γονίδιο *MECP2* στα πλαίσια της παρούσας μελέτης (αναπροσαρμογή από: Shovlin S. & Daniela Tropea D. (2018) "Transcriptome level analysis in Rett syndrome using human samples from different tissues." *Orphanet J Rare Dis*, Jul 11;13(1):113. doi: 10.1186/s13023-018-0857-8).

Στην πλειοψηφία τους οι παραλλαγές που ανευρέθηκαν (Εικόνα 49) είναι γνωστές στη διεθνή βιβλιογραφία και στη βάση δεδομένων του συνδρόμου και απαντώνται συχνά στους ασθενείς. Εξαίρεση αποτελεί το ετερόζυγο έλλειμμα του εξωνίου 1 του γονιδίου *MECP2* της ασθενούς 23 που αποτελεί σπάνιο εύρημα σχετιζόμενο με μη τυπική μορφή συνδρόμου Rett με βαρύτερη συμπτωματολογία στην οποία εμπεριέχονται και σπασμοί οι οποίοι εμφανίζονται πριν την περίοδο της αναπτυξιακής παλινδρόμησης [231].

Αναφορικά με τον ρόλο του προτύπου απενεργοποίησης του X χρωμοσώματος σε ασθενείς με σύνδρομο Rett, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, παρατηρείται επιλεκτική απενεργοποίηση του πατρικού X χρωμοσώματος το οποίο συνήθως φέρει και τη βλάβη (σε ποσοστό έως 96%) υποδηλώνοντας ότι ακόμα και αν ένας μικρός κυτταρικός πληθυσμός με την παραλλαγή εκφράζεται είναι επαρκής για να εκδηλωθεί το νόσημα [169]. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, παρά τον μικρό αριθμό ασθενών που μελετήθηκαν, δεν στοιχειοθετήθηκε επιλεκτική απενεργοποίηση του

πατρικού X χρωμοσώματος. Ειδικότερα, οι ασθενείς 5 και 15 είχαν τυχαία απενεργοποίηση, σε μία ο έλεγχος δεν ήταν πληροφοριακός (καθώς οι γονείς μοιράζονταν αλληλία ίδιου μεγέθους), σε 3 διαπιστώθηκε επιλεκτική απενεργοποίηση του μητρικού αλληλίου, σε ποσοστά 70% (ασθενείς 13 και 16) και 90% (ασθενής 23) αντίστοιχα, ενώ μόλις μια ασθενής είχε επιλεκτική απενεργοποίηση του πατρικού αλληλίου σε ποσοστό 70% (ασθενής 11). Στην ασθενή 11 που φέρει μία νέα παραλλαγή αβέβαιης κλινικής σημασίας μητρικής προέλευσης, η μητέρα της είχε τυχαίο πρότυπο απενεργοποίησης, οπότε περαιτέρω λειτουργικές μελέτες ή καταγραφή φαινοτύπου άλλων ατόμων που φέρουν την παραλλαγή πιθανώς να διαλευκάνουν την παθογνωμικότητά της καθότι τα μέχρι στιγμής δεδομένα είναι ασαφή.

5.1.2 Παραλλαγές γονιδίου *CDKL5*

Οι παραλλαγές που ανιχνεύθηκαν στο γονίδιο *CDKL5* εντοπίζονται εντός της καταλυτικής περιοχής. Στην ασθενή 27 επρόκειτο για γνωστή παρανοηματική παραλλαγή [232], η οποία ταυτοποιήθηκε ως εκ νέου εφόσον ο γονεϊκός έλεγχος ήταν αρνητικός. Η παραλλαγή της ασθενούς 28 χαρακτηρίστηκε ως νέα εφόσον δεν είχε καταγραφεί ξανά στις βάσεις δεδομένων ή στη διεθνή βιβλιογραφία και αναμένεται να οδηγήσει σε απλοανεπάρκεια καθότι είναι πλαισιοτροπική. Και οι δύο ασθενείς εμφάνισαν σπασμούς από τη βρεφική ηλικία και ψυχοκινητική καθυστέρηση ευρήματα συμβατά με μοριακή βλάβη του γονιδίου. Βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων του 2015 αναμένεται η κατάκτηση λιγότερων αναπτυξιακών οροσήμων στην ασθενή 28 σύμφωνα με το είδος και την θέση της παραλλαγής [232] χωρίς ωστόσο αυτό να είναι απόλυτο καθώς τα τελευταία χρόνια το πρότυπο απενεργοποίησης του X χρωμοσώματος αποτελεί παράγοντα που μπορεί να επηρεάσει την πορεία των ασθενών. Η έλλειψη γονεϊκών δειγμάτων σε αυτήν την περίπτωση κατέστησε μη εφικτή την περαιτέρω μελέτη.

5.1.3 Παραλλαγές γονιδίου *FOXG1*

Όλες οι παραλλαγές που ανιχνεύθηκαν ήταν ήδη γνωστές στη διεθνή βιβλιογραφία και η παραλλαγή NM_005249:c.460dupG:p.E154Gfs*301 της ασθενούς 29 αποτελεί μία εκ των δύο συχνότερων πλαισιοτροπικών παραλλαγών που

καταγράφονται στους ασθενείς. Η εν λόγω νουκλεοτιδική προσθήκη παρατηρείται σε γενωμική περιοχή με αλληλουχία διαδοχικών γουανινών (GGGGGG) με απόρροια να είναι επιρρεπής σε λάθη κατά την αντιγραφή και κατά συνέπεια στην εμφάνιση αυτής της παραλλαγής.

Η πρωτεΐνη του γονιδίου *FOXG1* έχει εξέχοντα ρόλο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου, με αποτέλεσμα την ύπαρξη δομικών παραλλαγών του εγκεφάλου στους ασθενείς. Ειδικότερα δομικές βλάβες του μεσολοβίου αποτελούν χαρακτηριστικό της *FOXG1*-σχετιζόμενης εγκεφαλοπάθειας και μπορεί να εκτείνονται από υποπλασία έως αγενεσία, ενώ συχνά επίσης καταγράφεται και απλοποιημένος φλοιός [75]. Οι ασθενείς με απλοανεπάρκεια του γονιδίου εμφανίζουν οριακή ή μειωμένη περίμετρο κεφαλής από τη γέννηση η οποία εξελίσσεται σε σοβαρή μικροκεφαλία. Παράλληλα παρατηρούνται υποτονία, σοβαρή ψυχοκινητική καθυστέρηση, απουσία βλεμματικής επαφής, ευερεθιστότητα και στερεοτυπίες εμφανείς στο πρώτο έτος ζωής. Σπασμοί εμφανίζονται σε όλους τους ασθενείς με έναρξη που κυμαίνεται από τη βρεφική ηλικία έως 14 ετών [75]. Όλοι οι ασθενείς της μελέτης με μοριακή βλάβη του γονιδίου *FOXG1* είχαν μικροκεφαλία και νευροαναπτυξιακή καθυστέρηση ενώ δύο εκ των τριών εμφάνιζαν σπασμούς και δομικές παραλλαγές στην μαγνητική εγκεφάλου τους. Σύμφωνα με τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα άτομα με πλαισιοτροπικές παραλλαγές, όπως φέρουν οι ασθενείς 29 & 93, εντός του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης εμφανίζουν βαρύτερη κλινική εικόνα με σοβαρότερες διαταραχές στην κίνηση και την ομιλία. Η απουσία σπασμών στον ασθενή 30, έως τη στιγμή της διάγνωσης στην ηλικία των 4 ετών, δεν αποκλείει την μεταγενέστερη έναρξή τους.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η ασθενής 29 είχε ήδη λάβει διάγνωση του αυτοσωμικού υπολειπόμενου μεταβολικού νοσήματος MCAD (medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency) όπου η δυσλειτουργία ενός βασικού ενζύμου στην μιτοχονδριακή β-οξειδωση των λιπαρών οξέων κατά τη διάρκεια νηστείας ή λοίμωξης οδηγεί στην εμφάνιση υπογλυκαιμιών που μπορεί να εξελιχθούν σε κωματώδη κατάσταση, ηπατική και εγκεφαλική δυσλειτουργία καθώς και άλλων δυνητικά επικίνδυνων για τη ζωή του ατόμου διαταραχών.

5.1.4. Παραλλαγές γονιδίου *ARX*

Δεδομένου του φυλοσύνδετου τρόπου κληρονομής η αποκάλυψη παθογόνων παραλλαγών σε θήλεα άτομα με ή χωρίς συμπτώματα έρχεται περαιτέρω ελέγχου με ανάλυση του προτύπου απενεργοποίησης του χρωμοσώματος X με στόχο την πιθανή εξήγηση της εκδήλωσης ή όχι συμπτωμάτων ανά περίπτωση. Για την ασθενή 31 προκύπτει επιλεκτική απενεργοποίηση του ενός αλληλίου χωρίς όμως να είναι εφικτή η ταυτοποίησή του ως φέροντα ή όχι την βλάβη, λόγω έλλειψης γονεϊκών δειγμάτων, ενώ ο έλεγχος ελλειμμάτων ή διπλασιασμών με MLPA εντός του γονιδίου δεν αποκάλυψε δεύτερη μοριακή βλάβη σε διάταξη *trans*. Στην οικογένεια 52 η βλάβη έχει κληρονομηθεί από την ασυμπτωματική μητέρα στην οποία και παρατηρείται επιλεκτική απενεργοποίηση (του αλληλομόρφου με τη βλάβη) στο δείγμα του περιφερικού αίματος. Σε κάθε περίπτωση η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της απενεργοποίησης του X χρωμοσώματος χρήζει ιδιαίτερης προσοχής διότι αφορούν ορισμένους ιστούς (στις εξεταζόμενες περιπτώσεις αίμα) και δεν λαμβάνουν υπόψη πιθανούς ανασυνδυασμούς μεταξύ των ομόλογων χρωμοσωμάτων. Με βάση δημοσιευμένες μελέτες του προτύπου απενεργοποίησης σε θήλεα φορείς παθογόνων παραλλαγών του γονιδίου τα ευρήματα είναι ασαφή και δεν φαίνεται να υπάρχει ισχυρή συσχέτιση βαρύτητας φαινοτύπου και ποσοστού απενεργοποίησης [233]. Ωστόσο η αδυναμία μελέτης και άλλων φορέων-μελών της οικογένειας ή της επιλογής του κατάλληλου ιστού θέτει περιορισμούς στην σαφή ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Σε ότι αφορά τη συσχέτιση γονοτύπου-φαινοτύπου των ασθενών, η παρουσία ενδογονιδιακών ελλειμμάτων, ανεμηνεύσιμων ή πλαισιοτροπικών (όπως οι NM_139058.3:c.1472delT & NM_139058.3:c.1430delT) παραλλαγών εντός του γονιδίου *ARX* σχετίζεται με την εμφάνιση δομικών παραλλαγών του εγκεφάλου στους ασθενείς. Και στις δύο οικογένειες οι παραγόμενες, μικρότερου του φυσιολογικού μεγέθους πρωτεΐνες, αναμένεται να εμφανίζουν έλλειψη της δομικής περιοχής *Aristaless* η οποία, όπως περιγράφεται στην ενότητα 1.2.1.2., εμφανίζει μεταγραφική ενεργοποιητική δράση σε άλλα γονίδια και σχετίζεται με βαρύτερη νόσο και συγκεκριμένα με το σύνδρομο Ohtahara.

5.1.5 Παραλλαγή γονιδίου *POLG*

Η παραλλαγή p.(Trp748Ser) που εντοπίστηκε σε ομοζυγωτία στην ασθενή 26 αποτελεί γνωστή παραλλαγή η οποία σύμφωνα με τη βάση δεδομένων του γονιδίου έχει ανευρεθεί σε ασθενείς με AHS, SANDO, MIRAS, PEO, MEMSA, MCHS καθώς και σε ασθενείς με κλινική εικόνα συμβατή με FXTAS αλλά χωρίς παθολογική επέκταση στο γονίδιο *FMR1*. Η παραλλαγή εντοπίζεται εντός της δομικής περιοχής σύνδεσης (linker) και επηρεάζει το ρυθμό έναρξης της αντιγραφής καθώς επίσης και τη σύνδεση της καρβοξυτελικής περιοχής (με δράση πολυμεράσης) με το υπόστρωμά της οδηγώντας σε ποσοτική μείωση του μιτοχονδριακού DNA [234].

5.1.6 Παραλλαγές γονιδίου *SCN1A*

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η οικογένεια 32 όπου η ασθενής αναφοράς έχει δύο ετερόζυγες παραλλαγές εντός του γονιδίου *SCN1A* την p.(Pro1855His) που εμφανίστηκε εκ νέου και θεωρείται αιτιοπαθογόνος και την p.(Ile1523Leu) που είναι μητρικής προέλευσης και δεν φαίνεται να σχετίζεται με την κλινική εικόνα. Σημειώνεται ότι δεν κατέστη εφικτή η ταυτοποίηση της διάταξης των παραλλαγών σε cis ή trans. Από το οικογενειακό ιστορικό η μητέρα δεν ανέφερε ιστορικό σπασμών ωστόσο επειδή δεν υπάρχουν δεδομένα από λειτουργικές μελέτες για την παραλλαγή p.(Ile1523Leu) δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανή επιβαρυντική επίδρασή της στον φαινότυπο.

Στην οικογένεια 52, όπου η μητέρα είναι ασυμπτωματική φορέας, η κύρια αιτία για την εμφάνιση AEE στα δύο άρρενα τέκνα της θεωρείται η παρουσία παθογόνου παραλλαγής στο γονίδιο *ARX*. Ωστόσο επειδή ένα ποσοστό έως και 10% των παθογόνων ή πιθανώς παθογόνων παραλλαγών του γονιδίου *SCN1A* μπορεί να κληρονομηθεί από ασυμπτωματικούς γονείς, είναι αδύνατη η εξακρίβωση της επίδρασης αυτής της παραλλαγής στην γενικότερη κλινική εικόνα των ασθενών.

Σύμφωνα με τα διαγνωστικά κριτήρια για το σύνδρομο Dravet 16/22 ασθενείς εμφάνισαν σπασμούς τον πρώτο χρόνο ζωής και 13/22 πυρετικούς σπασμούς επιπλεγμένους ή μη. Σε μεγαλύτερους ασθενείς καταγράφηκαν και άλλα είδη σπασμών καθώς και συμπεριφορικές και γνωσσιακές διαταραχές όπως αναμένεται

βάσει των βιβλιογραφικών δεδομένων. Επιπρόσθετα λοιμώδεις παράγοντες όπως Covid-19 ή Γρίπη Β καθώς και εμβολιασμός φαίνεται να πυροδότησαν το πρώτο επεισόδιο σπασμών σε 4 ασθενείς, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι γενετική διάγνωση τέθηκε σε 3 ασθενείς στο 1^ο τους επεισόδιο.

Οι ασθενείς στους οποίους ανευρέθηκαν παραλλαγές που οδηγούν σε απλοανεπάρκεια ή εντοπίζονται στις δομικές περιοχές που ευθύνονται για την ανίχνευση τάσης (S4) και το φίλτρο εκλεκτικότητας του διαύλου (S5, S6 και βρόχος S5-S6) εμφάνιζαν βαρύτερη κλινική εικόνα με πολλαπλά είδη φαρμακοανθεκτικών σπασμών και νευροαναπτυξιακή καθυστέρηση.

Ειδικότερα παραλλαγές που αφορούν την περιοχή S4 παρατηρήθηκαν στους ασθενείς 34, 43, 42 και 53 εκ των οποίων οι τρεις φέρουν διάγνωση συνοδής ψυχοκινητικής καθυστέρησης. Στην τέταρτη ασθενή που φέρει κληρονομούμενη, από την συμπτωματική μητέρα της, παραλλαγή ματίσματος καταγράφονται μέχρι στιγμής μόνο πυρετικοί σπασμοί ενώ η μητέρα της έχει ιστορικό απύρετων σπασμών. Οι παραλλαγές αυτής της ομάδας ασθενών έχουν προηγούμενες αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία και σύμφωνα με τη βάση δεδομένων του γονιδίου *SCN1A* σχετίζονται με την εμφάνιση SMEI ή AEE.

Οι ασθενείς με παραλλαγές εντός του βρόχου S5-S6 ήταν οι 33, 37 – 38, 40, 41, 45) εκ των οποίων σε δύο οικογένειες διαπιστώθηκε πατρική κληρονομία από συμπτωματικό γονέα, σε δύο εκ νέου εμφάνιση της παραλλαγής, ενώ στην περίπτωση του ασθενούς 45 δεν προσήλθαν οι γονείς για έλεγχο. Παράλληλα στις τέσσερις από τις πέντε οικογένειες αναφέρθηκε θετικό οικογενειακό ιστορικό για σπασμούς. Στην οικογένεια 33 ο πατέρας εμφάνιζε πυρετικούς σπασμούς στη βρεφική ηλικία και απύρετους σπασμούς στην εφηβική. Τα δύο τέκνα του εμφανίζουν, με τα μέχρι στιγμής διαθέσιμα δεδομένα, μόνο πυρετικούς σπασμούς. Στην οικογένεια 37 ο ασθενής αναφοράς παρουσίαζε ήπια ψυχοκινητική καθυστέρηση και επιπλεγμένους πυρετικούς σπασμούς ενώ ο πατέρας του πυρετικούς και απύρετους σπασμούς μέχρι την ηλικία των 20 ετών. Ο πατρικός αδελφός μέχρι σήμερα παρουσιάζει πυρετικούς σπασμούς (δεν προχώρησε σε γενετικό έλεγχο) όπως και η κόρη του (ασθενής 38) η οποία διαγνώσθηκε στο πρώτο επεισόδιο σπασμών εξαιτίας του οικογενειακού

ιστορικού. Στη βάση δεδομένων του γονιδίου οι παραλλαγές που ανευρέθηκαν στις ανωτέρω οικογένειες συνδέονται με SMEI. Οι παραλλαγές των ασθενών 41 και 45 ήταν νέες, ενώ η παραλλαγή του ασθενούς 40 είχε μόνο μία προηγούμενη αναφορά στη βάση δεδομένων ClinVar ως αβέβαιης κλινικής σημασίας. Η εκ νέου εμφάνιση των παραλλαγών στους ασθενείς 40 και 41 συνέβαλε στην τελική ταξινόμηση τους ως παθογόνες και σχετιζόμενες με AEE και GEFS+ αντίστοιχα.

Παραλλαγές απλοανεπάρκειας λόγω πλήρους ή τμηματικής έλλειψης του ενός αντιγράφου του γονιδίου *SCN1A* ταυτοποιήθηκαν στους ασθενείς 47 και 51CES. Τα ανωτέρω ελλείμματα έχουν καταγραφεί στη βάση δεδομένων του γονιδίου σχετιζόμενα με SMEI. Σε αυτούς ασθενείς ο φαινότυπος που καταγράφηκε ήταν AEE με πολλαπλά είδη φαρμακοανθεκτικών σπασμών. Στις οικογένειες αναφερόταν θετικό οικογενειακό ιστορικό σπασμών. Στον ασθενή 51CES ο πρώτος έλεγχος που αφορούσε αλληλούχηση του γονιδίου *SCN1A* για ανεύρεση σημειακών παραλλαγών ήταν αρνητικός και εξαιτίας της συνύπαρξης πολυδακτυλίας και συνδακτυλίας (φαινοτυπικά χαρακτηριστικά παρόντα και στην μητέρα) συστήθηκε έλεγχος με αλληλούχηση επόμενης γενιάς. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν ετερόζυγη παθογόνο σημειακή παραλλαγή του γονιδίου *GLI3* που δικαιολογεί την πολυσυνδακτυλία και ετερόζυγο έλλειμμα των εξονίων 1-16 του γονιδίου *SCN1A*. Από τον στοχευμένο έλεγχο των γονεϊκών δειγμάτων η παραλλαγή του γονιδίου *GLI3* ήταν μητρικής προέλευσης, ενώ το έλλειμμα του γονιδίου *SCN1A* είχε εμφανισθεί εκ νέου στον ασθενή.

Από τις υπόλοιπες αιτιοπαθολογικές νέες παραλλαγές που ταυτοποιήθηκαν στις οικογένειες 32, 36, 44, 46 και 50 στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, εκ νέου εμφανίσθηκαν σε τέσσερις ασθενείς ενώ στην οικογένεια 36 παρατηρήθηκε κληρονόμηση από τη συμπτωματική μητέρα. Οι παραλλαγές των ασθενών 32 και 44 αφορούν το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης μοριακές βλάβες του οποίου μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση όλου του φάσματος της διαυλοπάθειας νατρίου (από GEFS+ έως AEE) χωρίς σαφή συσχέτιση της τοπολογίας της παραλλαγής με τον εμφανιζόμενο φαινότυπο. Η παραλλαγή της ασθενούς 46 οδηγεί σε απλοανεπάρκεια και βρίσκεται στον μεγάλο ενδοκυττάριο βρόχο που συνδέει τις ομόλογες περιοχές D1-D2. Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων του γονιδίου,

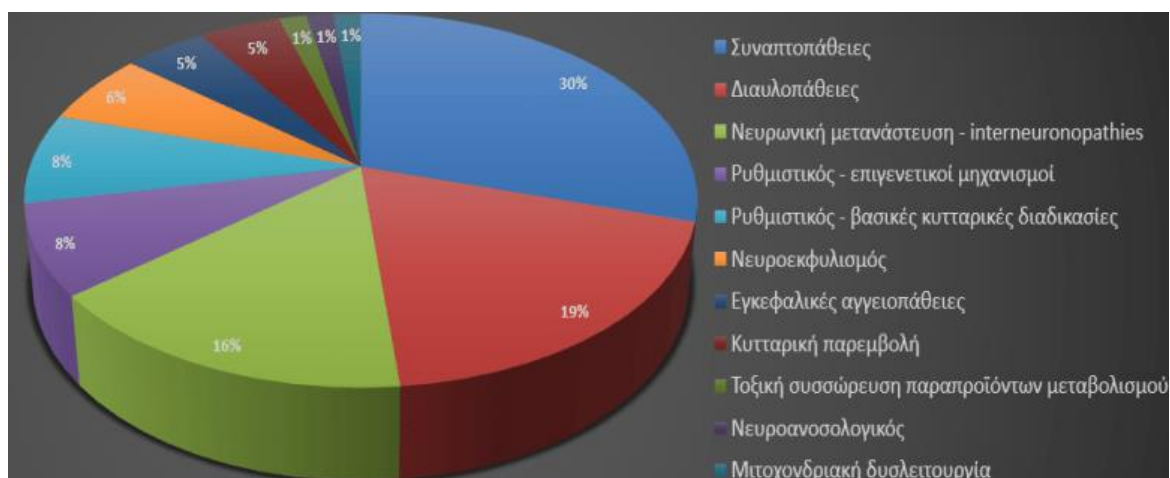
πλαισιοτροπικές παραλλαγές στην περιοχή σχετίζονται με εμφάνιση AEE ή SMEI. Οι παραλλαγές των ασθενών 36 και 50 αφορούν τις α-έλικες S1 των ομόλογων περιοχών D3 και D4 αντίστοιχα όπου βλάβες τους σχετίζονται με SMEI. Στην περίπτωση της οικογένειας 36 καταγράφηκαν επιπλεγμένοι πυρετικοί και απύρετοι σπασμοί στην ασθενή αναφοράς όπως και στην μητέρα της σε μεταγενέστερη παιδική ηλικία υποδεικνύοντας πιθανή ποικίλη εκφραστικότητα στο είδος και την έναρξη των σπασμών στα μέλη της οικογένειας. Σε ότι αφορά την συνώνυμη εκ νέου παραλλαγή στην ασθενή 50, που όπως υποδεικνύεται από το *in silico* πρόγραμμα Human Splicing Finder 3 επηρεάζει τις εσωτερικές εξονικές θέσεις ενίσχυσης και αποσιώπησης του ματίσματος (ESE: Exonic Splicing Enhancer και ESS: Exonic Splicing Silencer), περαιτέρω μελέτες σε επίπεδο RNA θα μπορούσαν να πιστοποιήσουν τον παθογόνο χαρακτήρα της παραλλαγής. Σημειώνεται ότι περιγράφονται και άλλες περιπτώσεις ασθενών στη διεθνή βιβλιογραφία με άτυπη εικόνα συνδρόμου Dravet που φέρουν εκ νέου συνώνυμες παραλλαγές του γονιδίου [235].

Τέλος, στους τέσσερις ασθενείς 35, 39, 48 και 49 οι παραλλαγές που ανιχνεύθηκαν είναι γνωστές και εκτός των κρίσιμων για τη λειτουργία του διαύλου περιοχών S4-S6 αλλά λόγω του πλαισιοτροπικού και ανερμηνεύσιμου χαρακτήρα τους φαίνεται να οδηγούν στην εμφάνιση AEE λόγω απλοανεπάρκειας.

5.2 Σχολιασμός παραλλαγών που ανιχνεύθηκαν μέσω αλληλούχησης επόμενης γενιάς

Από τους 107 ασθενείς, στους οποίους εφαρμόστηκε έλεγχος με αλληλούχηση επόμενης γενιάς, διαγνώστηκαν οι 64. Σε αυτούς τους ασθενείς η συχνότερη αιτία που οδήγησε σε επιληπτογένεση ήταν οι συναπτοπάθειες, ακολουθούμενη από διαυλοπάθειες, διαταραχές στη νευρωνική μετανάστευση-interneuronopathies καθώς και διαταραχές σε διάφορους επιγενετικούς – ρυθμιστικούς μηχανισμούς. Αναλυτικότερα στο Γράφημα 9 απεικονίζονται όλοι οι αιτιοπαθογόνοι μηχανισμοί που οδήγησαν σε επιληπτογένεση.

Γράφημα 9: Μηχανισμοί που οδήγησαν σε επιληπτογένεση στους ασθενείς που διαγνώστηκαν με αλληλούχηση επόμενης γενιάς.



5.2.1 Διαυλοπάθειες

Από τους ασθενείς που μελετήθηκαν με αλληλούχηση επόμενης γενιάς σε 13 αποκαλύφθηκαν παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές σε γονίδια που κωδικοποιούν για διαύλους.

Παραλλαγές σε γονίδια που κωδικοποιούν για τασεοελεγχόμενους διαύλους νατρίου εντοπίστηκαν σε 4 ασθενείς με τους 3 να έχουν παραλλαγή του γονιδίου *SCN1A* (ασθενείς 51 - 53) και έναν του γονιδίου *SCN2A* (ασθενής 54). Η νέα ετερόζυγη παραλλαγή *SCN2A:c.2986G>A*, ανιχνεύθηκε σε πολλαπλά πάσχοντα μέλη της οικογένειας του ασθενούς 54, και εντοπίζεται μεταξύ του βρόχου που ενώνει τις περιοχές D2-D3 και στην οποία παραλλαγές περιγράφονται σε ασθενείς με ΑΕΕ ή SLFNIE [28]. Από το οικογενειακό ιστορικό του εξεταζόμενου αναφέρονται μητρικός παππούς με βρεφικούς σπασμούς, μητέρα με επεισόδια απύρετων τονικών σπασμών από 2,5 έως 16 μηνών και μητρική αδελφή με πυρετικούς σπασμούς (δεν προσήλθε για γενετικό έλεγχο). Βάσει του οικογενειακού ιστορικού και του γεγονότος ότι όλοι οι ενήλικες ήταν ελεύθεροι σπασμών η ανωτέρω παραλλαγή φαίνεται να συσχετίζεται με SLFNIE.

Παραλλαγές σε γονίδια που κωδικοποιούν για διαύλους καλίου εντοπίστηκαν σε 7 ασθενείς εκ των οποίων 3 αφορούσαν τασεοελεγχόμενο δίαυλο (γονίδιο *KCNQ2*),

3 δίαυλο καλίου ευαίσθητο σε εξωκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου (γονίδιο *KCNT1*) και 1 δίαυλο ανορθωτή καλίου (γονίδιο *KCNJ10*).

Στο γονίδιο *KCNQ2* εντοπίστηκαν μία πλαισιοτροπική παραλλαγή (ασθενής 55) στο αμινοτελικό άκρο και δύο παρερμηνεύσιμες (ασθενείς 56 - 57) στην καρβοξυτελική περιοχή. Οι παραλλαγές του γονιδίου που οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας (LOF) σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα οδηγούν στην εμφάνιση SLFNE όπως παρατηρήθηκε και στον ασθενή του οποίου οι σπασμοί ξεκίνησαν από τη γέννηση αλλά σταμάτησαν σε ηλικία 6 μηνών. Αντίθετα παρερμηνεύσιμες παραλλαγές που οδηγούν σε ενίσχυση της λειτουργίας (GOF) του γονιδίου εντοπίζονται συχνότερα σε ασθενείς με κλινική εικόνα AEE όπως αυτή αποδίδεται στον ασθενή 56. Παράλληλα καταγράφονται και ενδιάμεσοι φαινότυποι που δεν χαρακτηρίζονται ως SLFNE ή AEE καθώς η μείωση της συχνότητας των σπασμών συνοδεύεται από ανάδειξη νευροαναπτυξιακών διαταραχών (ανωριμότητα ή μετρίου βαθμού καθυστέρηση της λεπτής κινητικότητας) όπως περιγράφεται και για την παραλλαγή του ασθενούς 57 [236].

Στο γονίδιο *KCNT1* εντοπίστηκαν δύο εκ νέου παρερμηνεύσιμες παραλλαγές καθώς και μία κληρονομούμενη πλαισιοτροπική στις δομικές περιοχές S6 και RCK1. Η παραλλαγή *KCNT1:c.1421G>A*, του ασθενούς 59, είναι γνωστή στη διεθνή βιβλιογραφία και η επίδρασή της στο δίαυλο αφορά την ενίσχυση της λειτουργίας του. Οι ασθενείς 58 και 59 εμφάνιζαν κλινική εικόνα συμβατή με AEE, ενώ ο ασθενής 60 είχε κλινική διάγνωση ιδιοπαθούς γενικευμένης επιληψίας με συνοδές διαταραχές του αυτιστικού φάσματος. Από το οικογενειακό του ιστορικό αναφέρεται μεγαλύτερη αδελφή με επεισόδια απώλειας συνειδήσεως και πυρετικών σπασμών και πατέρας με παρκινσονισμό. Από τον στοχευμένο έλεγχο της οικογένειας η πλαισιοτροπική παραλλαγή ήταν πατρικής προέλευσης και είχε κληρονομηθεί και στα δύο τέκνα. Η μεγάλη φαινοτυπική ετερογένεια και η ατελής διεισδυτικότητα με αναφορά ακόμα και ασυμπτωματικών φορέων [106] για παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου φαίνεται να παρατηρείται και στην ανωτέρω οικογένεια ενώ δεν αποκλείεται η συνεισφορά της παραλλαγής και στην κλινική εικόνα του πατέρα, καθώς παραλλαγές του γονιδίου *KCNT1* σε πρόσφατες μελέτες σχετίζονται με κινητικές διαταραχές [105]. Σημειώνεται

ότι οι ασθενείς με παρερμηνεύσιμες παραλλαγές εμφάνιζαν πολύ σοβαρή κλινική εικόνα και δυστυχώς ο ασθενής 58 απεβίωσε.

Στο γονίδιο *KCNJ10* ανευρέθηκε μία νέα ομόζυγη (γονείς με αναφερόμενη συγγένεια: ξαδέλφια 5^{ου} βαθμού) παρερμηνεύσιμη παραλλαγή στην ασθενή 61 η οποία καθότι ενήλικας την στιγμή της γενετικής διερεύνησης είχε σχεδόν πλήρη εκδήλωση των χαρακτηριστικών του συνδρόμου EAST/SeSaME. Αναλυτικότερα το ιστορικό της ξεκινά από τη βρεφική ηλικία με σπασμούς (που ακόμα εμφανίζονται παρά την τριπλή αγωγή) ενώ παράλληλα καταγράφονται νοητική υστέρηση, υποκαλιαίμια, αυξημένη ρενίνη αίματος, προοδευτική αταξία και αυξημένο T2 σήμα σε γέφυρα και παρεγκεφαλίδα. Όλα τα ανωτέρω κλινικά χαρακτηριστικά είναι συμβατά με τη διάγνωση του συνδρόμου. Η παραλλαγή που ταυτοποιήθηκε εντοπίζεται στον εξωκυττάριο βρόχο ο οποίος μαζί με τις διαμεμβρανικές έλικες είναι υπεύθυνος για το σχηματισμό του πόρου του διαύλου.

Στο γονίδιο *CLCN4* ανευρέθηκε η γνωστή παραλλαγή *CLCN4:c.2152C>T* σε ετεροζυγωτία στην ασθενή 62 η οποία ταυτοποιήθηκε ως εκ νέου κατόπιν ελέγχου των γονεϊκών δειγμάτων. Το ανωτέρω εύρημα έχει αναφερθεί ήδη στη διεθνή βιβλιογραφία και λειτουργικές μελέτες υποδεικνύουν ότι οδηγεί σε απώλεια λειτουργίας του διαύλου καθότι εντοπίζεται στη δομική περιοχή CBS2 [112].

Στο γονίδιο *ATP1A2* ανευρέθηκε η γνωστή ετερόζυγη παραλλαγή *ATP1A2:c.2192T>C* στην ασθενή 104. Το γονίδιο *ATP1A2* εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 1q23.2 και κωδικοποιεί για την α2 υπομονάδα της Na⁺/K⁺ ΑΤΡάσης που εμπλέκεται στη διαμεμβρανική μεταφορά ιόντων νατρίου και καλίου. Παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου *ATP1A2* όταν κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατητικό τρόπο σχετίζονται με την εμφάνιση οικογενούς ημιπληγικής ημικρανίας τύπου 2 ή εναλλασσόμενης ημιπληγίας της παιδικής ηλικίας τύπου 1 ή ΑΕΕ τύπου 98 ενώ όταν κληρονομούνται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο σχετίζονται με εμβρυϊκή ακινησία, αναπνευστική ανεπάρκεια, μικροκεφαλία, πολυμικρογυρία και δυσμορφικά στίγματα. Η παραλλαγή *ATP1A2:c.2192T>C*, η οποία αναμένεται να οδηγεί στην αμινοξική αντικατάσταση p.(Met731Thr), έχει περιγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία [237, 238] και τη βάση δεδομένων ClinVar ως Παθογόνος και

σχετιζόμενη με την οικογενή ημιπληγική ημικρανία. Επιπρόσθετα λειτουργικές μελέτες σε ζωικά μοντέλα υποδεικνύουν ότι η συγκεκριμένη παραλλαγή οδηγεί σε απώλεια λειτουργίας του γονιδίου [239]. Κλινικά η ασθενής παρουσιάζει επανειλημμένα επεισόδια εγκεφαλοπάθειας και επιληπτικής αφασίας με βραδέα κύματα στο ηλεκτροεγκεφαλογράφημα, επεισόδια ημικρανιών με συνοδή φωτοευαισθησία και πυρετικούς σπασμούς από την παιδική της ηλικία. Η μητέρα της ασθενούς, η οποία φέρει επίσης την παραλλαγή, αναφέρει ιστορικό ημικρανιών και αιμωδιών άκρων. Η ασθενής, η οποία είναι ενήλικη, έχει αποκτήσει άρρεν τέκνο με διαταραχές στο αυτιστικό φάσμα το οποίο δεν φέρει την παραλλαγή.

5.2.2 Συναπτοπάθειες

Από τους ασθενείς που μελετήθηκαν με αλληλούχηση επόμενης γενιάς σε 17 αποκαλύφθηκαν παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές σε γονίδια απαραίτητα για τη συναπτογένεση. Ειδικότερα ανιχνεύθηκαν 3 ασθενείς σε καθένα από τα γονίδια *SYNGAP1*, *STXBP1*, *PRRT2*, δύο ασθενείς στο γονίδιο *CSNK2B*, και από ένας ασθενής στα γονίδια *AP4S1*, *GPT2*, *TOR1A*, *MAP2K1*, *CUX2* και *ATP6V1B2*.

Στο γονίδιο *SYNGAP1* αποκαλύφθηκαν μία παραλλαγή ματίσματος (ασθενής 63) και δύο ανερμηνεύσιμες (ασθενείς 64 - 65). Η ασθενής 63 είχε κλινική διάγνωση γενικευμένης γενετικής επιληψίας ενώ οι υπόλοιποι ΑΕΕ. Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα 60% των ασθενών φέρει ανερμηνεύσιμες ή πλαισιοτροπικές παραλλαγές και 30% ματίσματος, αν και μικρός ο αριθμός των ασθενών της μελέτης τα ανωτέρω ευρήματα συμβαδίζουν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Επιπρόσθετα καθότι οι παραλλαγές δεν ανευρέθηκαν εντός των εξονίων 1-4 η κλινική εικόνα των ασθενών δεν αναμένεται να είναι ηπιότερη [22].

Στο γονίδιο *STXBP1* αποκαλύφθηκαν δύο γνωστές «hot spot» παρερμηνεύσιμες παραλλαγές (ασθενείς 66-67) και μία πλαισιοτροπική (ασθενής 112). Το είδος των παραλλαγών, από διαθέσιμες μελέτες σε μεγάλο αριθμό ασθενών, δεν φαίνεται να επηρεάζει τη βαρύτητα της νόσου ωστόσο για την παραλλαγή *STXBP1:c.1217G>A* της ασθενούς 66 έχει καταγραφεί πρώιμη έναρξη των σπασμών και σοβαρού βαθμού νοητική υστέρηση [61]. Λειτουργικές μελέτες για την παραλλαγή *STXBP1:c.1651C>T* κατέδειξαν ότι καταργεί μία γέφυρα άλατος και οδηγεί

σε μειωμένη σταθερότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης [59]. Η ίδια επίδραση στην πρωτεΐνη παρατηρήθηκε και για την παραλλαγή STXBP1:c.1217G>A [240]. Όλοι οι ασθενείς είχαν κλινική εικόνα συμβατή με ΑΕΕ.

Στο γονίδιο *PRRT2* ανιχνεύθηκαν μία εκ νέου παραλλαγή ματίσματος (ασθενής 82), μία κληρονομούμενη «hot spot» πλαισιοτροπική (ασθενής 83) καθώς και ένα μικροέλλειμμα της περιοχής 16p11.2 που εμπεριέχει ολόκληρο το γονίδιο (ασθενής 84).

Η παραλλαγή *PRRT2*:c.649dupC που ταυτοποιήθηκε ως πατρικής προέλευσης στην ασθενή 83 συμβαδίζει με το οικογενειακό ιστορικό που αναφέρει ότι ο πατέρας είχε επεισόδια απώλειας συνειδήσεως και κλονικών σπασμών στη βρεφική ηλικία και ο πατρικός παππούς (δεν προσήλθε για γενετικό έλεγχο) επεισόδια απώλειας συνειδήσεως στην ίδια ηλικία. Η συγκεκριμένη παραλλαγή καταγράφεται στη βιβλιογραφία ως σχετιζόμενη με SLFIE ή παροξυσμική κινησιογενή δυσκινησία ή πυρετικούς σπασμούς ή μυοκλονική επιληψία της παιδικής ηλικίας με ποικίλη διεισδυτικότητα και μεγάλη φαινοτυπική ετερογένεια η οποία περιλαμβάνει ακόμα και ασυμπτωματικούς φορείς στην ίδια οικογένεια [32]. Το οικογενειακό και ατομικό ιστορικό της ασθενούς μέχρι στιγμής υποδεικνύουν ότι πρόκειται για SLFIE χωρίς αυτό ωστόσο να εξασφαλίζει την απουσία κινητικών διαταραχών μελλοντικά.

Συγκριτικά με τους υπόλοιπους ασθενείς με μοριακή βλάβη του γονιδίου *PRRT2* η ασθενής 84 αναμένεται σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα να εμφανίζει βαρύτερη κλινική εικόνα με εμφανείς νευροαναπτυξιακές διαταραχές και επιληψία ως μόνιμη διαταραχή. Η ανωτέρω παρατήρηση επιβεβαιώνεται από την κλινική της εκτίμηση καθώς ήταν η μοναδική ασθενής αυτού της ομάδας που έφερε κλινική διάγνωση συμβατή με ΑΕΕ.

Το γονίδιο *AP4S1* (adaptor-related protein complex 4, sigma 1 subunit) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 14q12 και κωδικοποιεί για την υπομονάδα σ του συμπλόκου προσαρμογής 4 που έχει ρυθμιστικό ρόλο στη διακίνηση των συναπτικών κυστιδίων κατά την ενδοκυττάρωση. Η δυσλειτουργία του γονιδίου οδηγεί σε διαταραχές της συναπτικής μεταβίβασης στον εγκέφαλο [241]. Αν και η παρουσία παραλλαγών του γονιδίου σχετίζεται με την εμφάνιση αυτοσωμικής υπολειπόμενης

σπαστικής παραπληγίας τύπου 52, εύρημα μη αναμενόμενο για μελέτη ασθενών με επιληπτικά σύνδρομα, στη βιβλιογραφία αναφέρονται ασθενείς με βρεφικούς σπασμούς, σοβαρή αναπτυξιακή καθυστέρηση και σπαστική παραπληγία [241]. Η ασθενής 87 φέρει την ήδη γνωστή παραλλαγή ματίσματος NM_001128126.3:c.138+3_138+6delAAGT με εικόνα ομοζυγωτίας. Η αδυναμία μελέτης της οικογένειας λόγω μη επιθυμίας των γονέων να προσέλθουν για έλεγχο δεν επιτρέπει την περαιτέρω διερεύνηση μιας πιθανής σύνθετης ετεροζυγωτίας για την παραλλαγή και έλλειμμα της περιοχής. Η κλινική εικόνα της ασθενούς με πρώιμης έναρξης ΑΕΕ, αταξικό βάδισμα, δυστονία και μικροκεφαλία συνάδει με τα ήδη γνωστά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του νοσήματος [241, 242].

Το γονίδιο *GPT2* (glutamate pyruvate transaminase 2) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 16q11.2 και κωδικοποιεί για το ένζυμο τρανσαμινάση γλουταμικού-πυροσταφυλικού 2 που εκφράζεται στα μιτοχόνδρια και παρέχει ενέργεια για τη συναπτογένεση. Παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου σχετίζονται με αυτοσωμική υπολειπόμενη νευροαναπτυξιακή νόσο με συμπτωματολογία που περιλαμβάνει μικροκεφαλία, κινητικές διαταραχές (υπερτονία, αταξία, υποτονία), διαταραχές του αυτιστικού φάσματος και επιληψία [243]. Η νέα ομόζυγη παρερμηνεύσιμη παραλλαγή NM_133443.4:c.1441G>A:p.Gly481Ser που ανιχνεύθηκε στην ασθενή 109 φαίνεται να σχετίζεται με την κλινική της εικόνα που περιέχει σπασμούς από ηλικίας 1,5 ετών (καταγράφηκαν γενικευμένοι τονικοκλονικοί, επεισόδια προσήλωσης, βολβοστροφή και βλεφαροκλονίες), ΨΚΚ, αδρά χαρακτηριστικά προσώπου και μικροκεφαλία. Σημειώνεται ότι ο έλεγχος των γονεϊκών δειγμάτων κατέδειξε ότι οι γονείς ήταν φορείς της ίδιας παραλλαγής πιθανά λόγω κοινής γεωγραφικής καταγωγής.

Το γονίδιο *TOR1A* (Torsin 1A) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 9q34.11 και κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη torsinA με ρόλο σε κυτταρικές διαδικασίες όπως η βιογένεση οργανιδίων, η δραστηριότητα των πρωτεϊνών συνοδών καθώς και η κυτταρική μεταφορά. Μελέτες του παθογενετικού μηχανισμού υποδεικνύουν πιθανή διαταραχή στο επίπεδο της συναπτικής μεταβίβασης [244]. Παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου σχετίζονται με την εμφάνιση αυτοσωμικής επικρατητικής δυστονίας τύπου 1 ή αυτοσωμικής υπολειπόμενης αρθρογρύπωσης η

οποία μπορεί να οδηγήσει σε πρώιμο θάνατο [245, 246]. Η ανερμηνεύσιμη γνωστή παραλλαγή NM_000113:c.862C>T:p.Arg288* η οποία ανιχνεύθηκε σε ομοζυγωτία στον ασθενή 114 σχετίζεται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο πρότυπο κληρονομησης. Κλινικά ο εξεταζόμενος εμφάνιζε βρεφικούς σπασμούς από τη γέννηση, αρθρογρύπωση και δυσμορφίες προσώπου και κατέληξε την 8^η ημέρα ζωής. Ο γονεϊκών έλεγχος αποκάλυψε ότι οι γονείς ήταν φορείς της ίδιας παραλλαγής πιθανά λόγω κοινής γεωγραφικής καταγωγής.

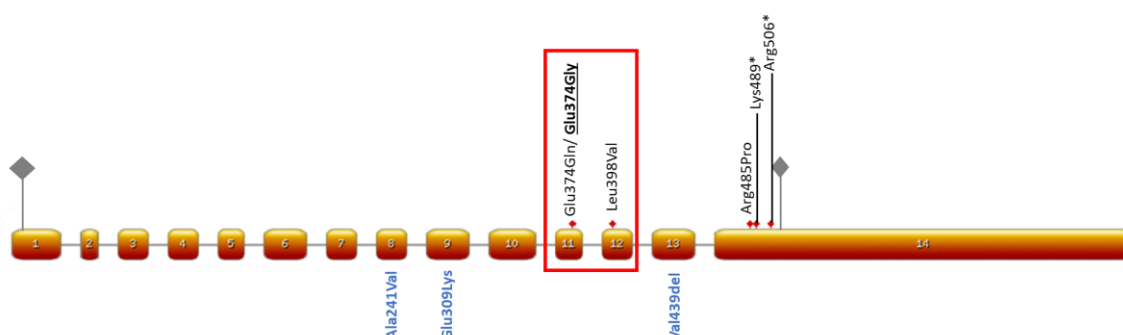
Το γονίδιο *MAP2K1* (mitogen-activated protein kinase kinase 1) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 15q22.31 και κωδικοποιεί για μια κινάση θρεονίνης/τυροσίνης που εμπλέκεται στο σηματοδοτικό μονοπάτι RAS-MAPK (RAS-mitogen-activated protein kinase pathway). Παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου *MAP2K1* κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατητικό τρόπο και σχετίζονται με την εμφάνιση ρασοπαθειών και ειδικότερα με το κάρδιο-πρόσωπο-δερματικό σύνδρομο τύπου 3 η κλινική εικόνα του οποίου περιλαμβάνει νευροαναπτυξιακή καθυστέρηση, σπασμούς και ποικίλες συγγενείς διαμαρτίες [247]. Οι πρωτεΐνες που προσδέουν RNA (RBP:RNA-binding proteins) είναι υπεύθυνες για τον εντοπισμό και την μετάφραση των μορίων mRNA ασκώντας με τον τρόπο αυτό τοπικό έλεγχο της έκφρασής τους. Αυτή η δράση μπορεί να επηρεαστεί και από τη δράση των μονοπατιών mTOR και MAPK. Σύμφωνα με νεότερα βιβλιογραφικά δεδομένα η συνεχής ενεργοποίηση των δύο μονοπατιών μπορεί να επηρεάσει την δράση των RBP στις συνάψεις με αποτέλεσμα την αυξημένη τοπική έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για διαύλους και υποδοχείς και τελικά αύξηση του ρυθμού της συναπτικής μεταβίβασης. Επιπρόσθετα η συνεχόμενη συναπτική διέγερση φαίνεται να ασκεί και ενεργοποιητική δράση στα ανωτέρω μονοπάτια οδηγώντας σε επιτάχυνση της σύγχρονης νευρωνικής πυροδότησης και τελικά σε επιληπτογένεση [248]. Η παρερμηνεύσιμη γνωστή παραλλαγή NM_002755.4:c.389A>G:p.Tyr130Cys [247] η οποία ανιχνεύθηκε σε ετεροζυγωτία στην ασθενή 97 φαίνεται να σχετίζεται με την κλινική της εικόνα που περιέχει ψυχοκινητική καθυστέρηση, σπαστική τετραπληγία και γενικευμένους τονικοκλονικούς σπασμούς. Από το ηλεκτροεγκεφαλογράφημα δεν προέκυψε σαφής επιληπτογόνος δραστηριότητα, ενώ η μαγνητική εγκεφάλου ανέδειξε παθολογικά ευρήματα στη λευκή ουσία και

αιμορραγικές εναποθέσεις περικολιακά ευρήματα συμβατά, σύμφωνα με τους θεράποντες ιατρούς, με εγκεφαλοπάθεια.

Το γονίδιο *CUX2* (CUT-like homeobox 2) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 12q24.11-q24.12 και κωδικοποιεί για έναν μεταγραφικό παράγοντα με ρυθμιστικό ρόλο στη δημιουργία των συνάψεων και στη διαμόρφωση των δενδριτών [249]. Μελέτες σε ζωικά μοντέλα υποδεικνύουν πιθανή συναπτοπάθεια ως τον μηχανισμό που οδηγεί σε επιληπτογένεση [250]. Παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου, με συχνότερη την p.Glu590Lys, που εμφανίζονται *de novo* στους ασθενείς σχετίζονται με την εμφάνιση ΑΕΕ τύπου 67 ενώ παράλληλα δεν υπάρχουν άλλα βιβλιογραφικά δεδομένα για ασθενείς με διαφορετικό είδος παραλλαγών. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης στον ασθενή 108 ταυτοποιήθηκε η νέα πλαισιοτροπική παραλλαγή NM_015267.4:c.2502dupC:p.Glu835Argfs*21 την οποία έφερε και ο συμπτωματικός πατέρας του. Ο ασθενής εμφανίζει γενικευμένη γενετική επιληψία, μαθησιακές δυσκολίες και μαρφανοειδή στοιχεία και ο πατέρας του είχε διαγνωσθεί με επιληψία από νεαρή ηλικία για την οποία λάμβανε αγωγή έως την ενήλικη ζωή. Δεν υπάρχουν καταγραφές άλλων ασθενών με πλαισιοτροπικές παραλλαγές όμως σύμφωνα με τη βάση δεδομένων GnomAD η ίση με 1 τιμή του pLI (probability of being loss-of-function intolerant) υποδεικνύει ότι οι παραλλαγές που οδηγούν σε απλοανεπάρκεια, όπως η c.2502dupC, δεν είναι ανεκτές και πιθανώς δικαιολογεί τον φαινότυπο.

Στον ασθενή 105 εμφανίσθηκε εκ νέου η νέα παραλλαγή NM_001693.4:c.1121A>G:p.Glu374Gly στο γονίδιο *ATP6V1B2* που συνήθως σχετίζεται με τους μη επιληπτικούς φαινοτύπους DDOD, DOORS και ZLS2. Μόλις το 2017 υπήρξαν οι πρώτες αναφορές σε ασθενείς με ΑΕΕ χωρίς τα χαρακτηριστικά στίγματα των ανωτέρω συνδρόμων. Όπως αποδείχθηκε σε ζωικά μοντέλα ο μηχανισμός που οδηγεί σε επιληπτογένεση είναι συναπτοπάθεια [201]. Ο εξεταζόμενος εμφάνιζε σπασμούς αρχικά πυρετικούς και απύρετους, τονικοκλονικούς και επεισόδια αφαιρέσεων ενώ τώρα έχει μυοκλονική ατονική επιληψία με καθημερινά επεισόδια. Συνοδά καταγράφονται ΝΥ, ΨΚΚ, αυτισμός και επιθετικότητα. Το συγκεκριμένο αμινοξύ στην θέση 374 πιθανά αποτελεί «hot spot» σημείο (Εικόνα 50) για την ύπαρξη παραλλαγών που σχετίζονται με νευροαναπτυξιακούς και επιληπτικούς

φαινοτύπους καθότι έχει περιγραφεί και άλλος ασθενής με παραλλαγή που αφορά το ίδιο αμινοξύ (p.Glu374Gln) με επιληψία και ΝΥ [199]. Το γλουταμινικό οξύ είναι υδρόφιλο με αρνητικά φορτισμένη πλευρική αλυσίδα και προτίμηση για εντοπισμό στην επιφάνεια. Στην παραγόμενη πρωτεΐνη είναι εξαιρετικά συντηρημένο στην θέση 374. Τόσο η γλυκίνη που δεν έχει πλευρική αλυσίδα και εξαιτίας της ευελιξίας της παρουσιάζει συνήθως εσωτερικό εντοπισμό στην πρωτεΐνη, όσο και η γλουταμίνη έχουν μοναδικά χαρακτηριστικά τα οποία σύμφωνα με το *in silico* πρόγραμμα πρόβλεψης της παθογνωμικότητας των παραλλαγών Varmap [251] αναμένεται να επηρεάζουν τη λειτουργία της αντλίας [252].



Εικόνα 50: Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου *ATP6V1B2* και των γνωστών παραλλαγών του. Οι παραλλαγές που σχετίζονται κυρίως με επιληπτικούς φαινοτύπους βρίσκονται σε κόκκινο πλαίσιο. Η παραλλαγή p.Arg506* αποτελεί «hotspot» παραλλαγή που ανευρίσκεται σε ασθενείς με DDOD και DOORS, ενώ για τις παραλλαγές με μπλε χρώμα παρόλο ότι είναι καταχωρημένες ως Πιθανώς παθογόνες στη βάση δεδομένων ClinVar δεν υπάρχουν δεδομένα για τους φαινοτύπους με τους οποίους σχετίζονται. Αναπροσαρμογή από Veltra D. et al. (2022) "A novel pathogenic *ATP6V1B2* variant: Widening the genotypic spectrum of the epileptic neurodevelopmental phenotype." *Am J Med Genet A*, Sep 22. doi: 10.1002/ajmg.a.62971.

5.2.3 Εγκεφαλικές αγγειοπάθειες

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης σε δύο ασθενείς ταυτοποιήθηκε ως αιτία της ΑΕΕ η ύπαρξη κολλαγονοπάθειας των μικρών αγγείων του εγκεφάλου και σε έναν ασθενή με Γενικευμένη γενετική επιληψία αποκαλύφθηκε νόσος CADASIL.

Ειδικότερα στον ασθενή 73 εμφανίσθηκε εκ νέου η νέα παραλλαγή COL4A1:c.3761G>A η οποία αναμένεται να οδηγεί στην αμινοξική αντικατάσταση p.(Gly1254Glu). Η συγκεκριμένη παραλλαγή αλλοιώνει το μοτίβο Gly-X-Y που απαντάται στην τριπλή έλικα του κολλαγόνου και αποτελεί το συχνότερο είδος παραλλαγής που ανιχνεύεται στους ασθενείς. Στην ασθενή 74 ανευρέθηκε η νέα μητρικής προέλευσης παραλλαγή COL4A2:c.1011+1G>A ενώ για πρώτη φορά καταγράφεται συσχέτιση παραλλαγών του γονιδίου με τον φαινότυπο D/EE-SWAS. Η μητέρα της ασθενούς είναι ασυμπτωματική φαινόμενο όχι σπάνιο καθώς παραλλαγές και των δύο γονιδίων σε μελέτες μεγάλων οικογενειών φαίνεται να εμφανίζουν μεγάλη φαινοτυπική ετερογένεια. Στους ασυμπτωματικούς φορείς ωστόσο, συστήνεται νευρολογική εκτίμηση και απεικονιστικός έλεγχος λόγω αυξημένης πιθανότητας εμφάνισης εγκεφαλικής αιμορραγίας ή αγγειακού ισχαιμικού εγκεφαλικού ιδιαίτερα εάν λαμβάνουν αντιπηκτική αγωγή [183, 253].

Οι δύο παραλλαγές COL4A1:c.3761G>A και COL4A2:c.1011+1G>A αφορούν την δομική περιοχή της τριπλής έλικας (THR) στην οποία και εντοπίζεται η πλειοψηφία των παθογόνων παραλλαγών. Σημειώνεται ότι ο ασθενής 73 είχε αδελφό πάσχοντα με την ίδια συμπτωματολογία ο οποίος κατέληξε προ της διάγνωσης. Η απουσία της παραλλαγής στα γονεϊκά δείγματα υποδεικνύει πιθανό γαμετικού μωσαϊκισμού που θα εξηγούσε την παρουσία της παραλλαγής και στους δύο ασθενείς υπό την προϋπόθεση ότι όντως μοιράζονταν τον ίδιο γονότυπο.

Στον ασθενή 90 ταυτοποιήθηκε η νέα μητρικής προέλευσης παραλλαγή NM_000435:c.458G>A στο γονίδιο *NOTCH3* (homolog of the *Drosophila* Notch 3) το οποίο εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 19p13.12 και κωδικοποιεί για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία έχει ενεργοποιητική δράση σε μεταγραφικούς παράγοντες. Η πλειοψηφία των παραλλαγών που απαντώνται στους ασθενείς αφορούν αμινοξικές αντικαταστάσεις και εντοπίζονται κυρίως στα εξόνια 2-24. Η παραλλαγή c.458G>A οδηγεί στην αμινοξική αντικατάσταση p.(Arg153His) και εντοπίζεται στο εξόνιο 4 του γονιδίου, ενώ καταγράφεται και διαφορετική νουκλεοτιδική αντικατάσταση που αφορά το ίδιο αμινοξύ ως Παθογόνος στη βάση δεδομένων ClinVar. Η παραγόμενη πρωτεΐνη έχει μέγιστα επίπεδα έκφρασης στις μικρές αρτηρίες [254]. Παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου

NOTCH3 κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατητικό χαρακτήρα και σχετίζονται με την εμφάνιση εγκεφαλικής αρτηριοπάθειας με υποφλοϊώδη έμφρακτα και λευκοεγκεφαλοπάθεια (νόσος CADASIL) η οποία μπορεί να εκδηλώνεται σε ποσοστό έως και 40% των ασθενών με ημικρανίες με αύρα [254] καθώς και με επεισόδια σπασμών [255] σε άτομα νεαρής ηλικίας πριν ακόμα αναδειχθούν οι χαρακτηριστικές του νοσήματος δομικές βλάβες. Κλινικά ο ασθενής 90 εμφανίζει αιμωδίες άνω - κάτω άκρων και στόματος συνοδευόμενες από ημικρανίες ενώ αναφέρονται και επεισόδια σπασμών με κινητική συμμετοχή και γενικευμένες αιχμές – πολυαιχμές και βραδέα κύματα στο ηλεκτροεγκεφαλογράφημα. Η μαγνητική τομογραφία του εγκεφάλου αναφέρεται φυσιολογική. Από το οικογενειακό ιστορικό η μητέρα έχει ιστορικό επιπλεγμένων ημικρανιών και ευρήματα συμβατά με ατροφικού τύπου αλλοιώσεις στην μαγνητική εγκεφάλου της.

5.2.4 Φυλοσύνδετη - φυλοπεριοριζόμενη κληρονόμηση

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι παραλλαγές που ανιχνεύθηκαν στις ασθενείς 70, 68 και 69 που περιλαμβάνουν δύο παρανοσηματικές και μία ανερμηνεύσιμη παραλλαγή στο γονίδιο *PCDH19*. Οι παρανοσηματικές παραλλαγές στο εξόνιο 1 και συγκεκριμένα στις επαναλήψεις καδερίνης (EC1-6) αποτελούν τις πιο κοινές βλάβες του γονιδίου και η παραλλαγή p.(Asn340Ser) της ασθενούς 70 χαρακτηρίζεται ως «hotspot». Αντίστοιχα οι p.(Glu32Val) και p.(Gln385*) είναι νέες παραλλαγές που εντοπίστηκαν στις επαναλήψεις καδερίνης 1 και 4. Το γονίδιο *PCDH19* εμφανίζει το ιδιαίτερο πρότυπο της κυτταρικής παρεμβολής και παραδοσιακά θεωρείτο ως φυλοπεριοριζόμενο με αποκλειστική εμφάνιση νόσου μόνο σε θήλεα άτομα. Από τον έλεγχο των γονέων της ασθενούς 68 αποκαλύφθηκε ότι η παραλλαγή ήταν μητρικής προέλευσης εύρημα συμβατό με το οικογενειακό ιστορικό εφόσον η μητέρα είχε πυρετικούς σπασμούς έως την ηλικία των 9 ετών. Αντιθέτως στην ασθενή 70 στην οποία η παραλλαγή ήταν και πάλι μητρικής προέλευσης η μητέρα ήταν ασυμπτωματική σε συμφωνία με βιβλιογραφικά δεδομένα όπου αναφέρεται η συγκεκριμένη παραλλαγή να κληρονομείται συνήθως από ασυμπτωματικές μητέρες σε θήλεα με τη νόσο [256].

Κλινικά οι ασθενείς 70, 68 είχαν διάγνωση GEFS+ ενώ η ασθενής 69 για ΑΕΕ. Η μεγάλη φαινοτυπική ετερογένεια θα μπορούσε να αποδίδεται στο διαφορετικό είδος των παραλλαγών (με την ανερμηνεύσιμη παραλλαγή να οδηγεί πιθανώς σε απλοανεπάρκεια), ή σε μη τυχαίο πρότυπο απενεργοποίησης του χρωμοσώματος Χ, ή και να αποτελεί ανακριβές εύρημα λόγω των διαφορετικών ηλικιών των ασθενών και την μη ολοκληρωμένη ανάπτυξη των συμπτωμάτων (η ασθενής 69 είναι μεγαλύτερη και φαίνεται να εμφανίζει την πλήρη εικόνα του νοσήματος).

5.2.5 Νόσος Lafora

Στον ασθενή 72 ηλικίας 13 ετών με κλινική διάγνωση προοδευτικά επιδεινούμενης ΑΕΕ με φαρμακοανθεκτική επιληψία από διέτιας (παρά την τετραπλή αγωγή), διαταραχές συμπεριφοράς και λόγου καθώς και οπτικές και ακουστικές ψευδαισθήσεις ανευρέθηκε η νέα ομόζυγη πλαισιοτροπική παραλλαγή NM_198586.3:c.583delG:p.Asp195Ilefs*37 στο γονίδιο *NHLRC1* η οποία αναμένεται να οδηγεί σε απώλεια της λειτουργίας του. Παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές στο γονίδιο *NHLRC1* σε ομοζυγωτία ή σύνθετη ετεροζυγωτία σχετίζονται με την εμφάνιση Προοδευτικής Μυοκλονικής Επιληψίας τύπου 2B (Νόσος Lafora). Ο έλεγχος των γονεϊκών δειγμάτων αποκάλυψε ότι και οι δύο είναι φορείς της ίδιας παθογόνου παραλλαγής γεγονός που εξηγείται από το ότι είναι πρώτα εξαδέλφια.

5.2.6 Σύνδρομο Leigh

Στον ασθενή 96, με κλινική διάγνωση βρεφικών σπασμών και διαταραχές της λευκής ουσίας του εγκεφάλου στην μαγνητική, ανευρέθηκε η γνωστή παραλλαγή m.13513G>A στο γονίδιο *MT-ND5*. Το γονίδιο *MT-ND5* κωδικοποιείται από το μιτοχονδριακό DNA (βάσεις 12337 έως 14148) και το τελικό προϊόν του είναι η υπομονάδα 5 η οποία είναι απαραίτητη για την διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και την εύρυθμη λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος [257]. Σύμφωνα με τις βάσεις δεδομένων ClinVar και Mitomap καθώς και τη βιβλιογραφία η συγκεκριμένη παραλλαγή έχει ανευρεθεί σε ασθενείς με σύνδρομο Leigh ή MELAS (Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes). Περαιτέρω κλινικοεργαστηριακός έλεγχος, που διεξήχθη στον ασθενή, υπέδειξε ότι η κλινική του εικόνα είναι συμβατή με σύνδρομο Leigh. Αξίζει να

σημειωθεί ότι η ανίχνευση μιτοχονδριακών παραλλαγών δεν αποτελεί πάγια δυνατότητα του WES καθότι οι αναγνώσεις που προκύπτουν είναι εκτός στόχου (off-target) και συνήθως μικρού αριθμού και κακής ποιότητας και για τον λόγο αυτό χρήζει επιβεβαίωσης με δεύτερη τεχνική. Στην περίπτωση του ασθενούς 96 τόσο στο WES όσο και στον στοχευμένο έλεγχο με αλληλούχηση κατά Sanger η παραλλαγή διαπιστώθηκε σε ετεροπλασμία υπερ της παραλλαγής.

5.2.7 Σύνδρομο Poirier-Bienvenu

Παρά την πρόσφατη ανακάλυψη του συνδρόμου το 2017, δυο ασθενείς ταυτοποιήθηκαν με εκ νέου νέες παραλλαγές του γονιδίου *CSNK2B*. Ειδικότερα οι ασθενείς 75 και 76 με κλινική διάγνωση ΑΕΕ και βρεφικών σπασμών αντίστοιχα έφεραν τις παραλλαγές p.(Tyr158Thrfs*69) και p.(Gly156Asp). Και οι δύο είχαν έναρξη σπασμών από τη βρεφική ηλικία ωστόσο για την ασθενή 76 ηλικίας 9 μηνών η απουσία καταγραφής άλλων ασθενών με την ίδια παραλλαγή δεν επιτρέπει την πρόγνωση της αναπτυξιακής της εξέλιξης. Στον μεγαλύτερο ηλικίας ασθενή 75 που έχει κλινική διάγνωση ΑΕΕ σημειώνεται ότι εμφανίζει παράλληλα και νόσο Hirschsprung και ότι η πλαισιοτροπική παραλλαγή του οδηγεί παραδόξως σε επιμήκυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Τα χαρακτηριστικά αυτής της παραλλαγής πιθανώς να οδηγούν σε βαρύτερη κλινική εικόνα, υπόθεση που χρειάζεται μελέτες λειτουργικότητας για να αποδειχθεί. Σύμφωνα με τα διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα όλοι οι ασθενείς με βλάβες του γονιδίου *CSNK2B* εμφανίζουν επιληψία ενώ νοητική υστέρηση και καθυστέρηση της κατάκτησης των αναπτυξιακών οροσήμων παρατηρείται έως και στο 80% των ασθενών [258].

5.2.8 Σύνδρομο Pitt-Hopkins

Στον ασθενή 80 αναφέρεται έναρξη φαρμακοανθεκτικών σπασμών από ηλικίας 3 μηνών οι οποίοι εμφανίζονται ακόμα σε καθημερινή βάση υπό τη μορφή επεισοδίων απώλειας συνειδήσεως. Ο ασθενής παρουσιάζει επίσης ιδιάζοντα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του προσώπου, φτωχή οργάνωση του ΗΕΓ και σοβαρή ψυχοκινητική καθυστέρηση. Η εφαρμογή του WES επέτρεψε την αποκάλυψη της ετερόζυγης γνωστής παραλλαγής c.2147C>T στο γονίδιο *TCF4* που σχετίζεται με το σύνδρομο Pitt-Hopkins. Η συγκεκριμένη παραλλαγή εντοπίζεται στη δομική περιοχή

HLH (περιοχή απαραίτητη για τον όμο-/έτερο- διμερισμό με ρόλο στη σύνδεση με το DNA και στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων) και σύμφωνα με δημοσιευμένες μελέτες λειτουργικότητας (όπου αναφέρεται ως c.1841C>T λόγω χρήσης διαφορετικού μετάγραφου αναφοράς) φαίνεται να έχει την μεγαλύτερη αρνητική επίπτωση στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών και στην ικανότητα ομοδιμερισμού της πρωτεΐνης [259].

5.2.9 Παραλλαγές σε γονίδια που συσχετίστηκαν πρόσφατα με κλινική εικόνα ΑΕΕ

Οι ραγδαίες εξελίξεις στον τομέα της αλληλούχησης επόμενης γενιάς οδήγησαν στην αποκάλυψη νέων δεδομένων για την γενετική βάση της επιληψίας. Ακόμα και σε καθημερινή βάση είναι δυνατόν να αναγνωρίζονται νέοι γενετικοί τόποι ή γονίδια γνωστά για τα οποία δεν υπήρχαν προηγούμενα ευρήματα εμπλοκής στην επιληπτογένεση. Η δυνατότητα επανάληψης της βιοπληροφορικής ανάλυσης των δεδομένων από NGS επιτρέπει την αναθεώρηση ευρημάτων επί νέων κλινικών στοιχείων ή επί νέων βιβλιογραφικών αποκαλύψεων όπως καταγράφηκε στην ασθενή 79CES όπου η τελική διάγνωση τέθηκε πολύ μετά την πρώτη εφαρμογή NGS.

Αναλυτικότερα στην περίπτωση της ασθενούς 79CES η οποία δεν είχε λάβει διάγνωση το 2017 που πραγματοποιήθηκε ο γενετικός έλεγχος, το 2021 και μετά από επανάλυση των δεδομένων του CES αποκαλύφθηκε η ετερόζυγη παραλλαγή AFF3:c.767_768delCGinsGA που οδηγεί στην αμινοξική αντικατάσταση p.(Pro256Arg). Η παραλλαγή χαρακτηρίστηκε ως εκ νέου κατόπιν ελέγχου των γονεϊκών δειγμάτων. Η πρώτη αναφορά συσχέτισης παραλλαγών του γονιδίου με νόσο καταγράφεται το 2019 ενώ ο εξέχων ρόλος της προλίνης στην θέση 256 της παραγόμενης πρωτεΐνης καθώς και η επιρρέπειά της σε εμφάνιση νέων παραλλαγών αναδύθηκε το 2021 με την ταυτοποίηση δύο ασθενών με γενετικές βλάβες που αφορούν το ίδιο αμινοξύ. Η παραλλαγή εντοπίζεται στην δομική περιοχή ALF η οποία αλληλεπιδρώντας με λιγάσες ουβικουϊτίνης ενέχεται στην πρωτεϊνική αποικοδόμηση [214]. Η ασθενής με διάγνωση ΑΕΕ είχε το πρώτο επεισόδιο σπασμών σε ηλικία 11 μηνών και εμφανίζει και άλλα χαρακτηριστικά του νοσήματος όπως αταξία, δυσμορφικά στίγματα προσώπου και ελλείμματα μεταταρσίων.

Στην περίπτωση της ασθενούς 81 ανιχνεύθηκε εκ νέου η «hotspot» παραλλαγή PACS2:c.625G>A:p.Glu209Lys που ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά το 2018 σε 14 ασθενείς με ΑΕΕ [189]. Η θέση της παραλλαγής και η επίδρασή της στην παραγόμενη πρωτεΐνη συνοψίζονται στην ενότητα 1.7.2.2. Στην ασθενή αναφέρονται εστιακοί τονικοί σπασμοί του δεξιού άνω άκρου καθώς και επεισόδια προσήλωσης βλέμματος από την έκτη μέρα ζωής ενώ δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα από τον απεικονιστικό ή ηλεκτροεγκεφαλογραφικό έλεγχο. Το είδος σπασμών που καταγράφηκε είναι συμβατό με μοριακή βλάβη του γονιδίου PACS2 ενώ η μικρή της ηλικία, μόλις 14 ημερών τη στιγμή της γενετικής διάγνωσης, δεν επιτρέπουν την ταυτοποίηση άλλων χαρακτηριστικών που περιγράφονται σε μεγαλύτερους ασθενείς της βιβλιογραφίας όπως η νοητική υστέρηση, η ψυχοκινητική καθυστέρηση ή οι στερεοτυπίες.

5.2.10 Παραλλαγές σε γονίδια με ρυθμιστική δράση σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες

5.2.10.1 Γονίδια που εμπλέκονται σε επιγενετικούς μηχανισμούς

Επιγενετικές αλλοιώσεις που περιλαμβάνουν τις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις ιστονών εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και τη γονιδιακή ρύθμιση. Οι βλάβες αφορούν συνήθως γονίδια που συμμετέχουν στην ρύθμιση της χρωματίνης (CMGs - chromatin modifying genes) και συχνά σχετίζονται με την εμφάνιση νευροαναπτυξιακών νοσημάτων στο φάσμα των οποίων ανήκουν και οι ΑΕΕ. Βλάβες σε γονίδια όπως τα *KAT6A* και *KAT8* που κωδικοποιούν για ακετυλοτρανσφεράσες λυσίνης ή το *H3-3A* που κωδικοποιεί για την ιστόνη H3.3 (συνδυαστικά με το γονίδιο *H3-3B*) αποτελούν τυπικά παραδείγματα γενετικών αλλοιώσεων που οδηγούν σε επιγενετικές διαταραχές.

Στην παρούσα εργασία αναγνωρίστηκαν πέντε ασθενείς με παραλλαγές της κατηγορίας αυτής και περιλαμβάνουν:

1. τη νέα *de novo* παραλλαγή NM_006766.5:c.376A>T:p.Lys126* που ανιχνεύθηκε στο γονίδιο *KAT6A* στον ασθενή 102 και εντοπίζεται εντός της δομικής περιοχής NEMM (αμινοξέα 1-206) η οποία είναι υπεύθυνη για τον πυρηνικό

εντοπισμό της πρωτεΐνης. Το σχετιζόμενο σύνδρομο Arboleda-Tham περιγράφηκε το 2015 σε εννέα ασθενείς με εκ νέου παραλλαγές πρώιμου τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης του γονιδίου *KAT6A* και κλινική εικόνα που χαρακτηρίζεται υποτονία, μικροκεφαλία, ψυχοκινητική καθυστέρηση και ποικίλα δυσμορφικά στίγματα [260, 261]. Σε πρόσφατη μελέτη του 2019 με 76 ασθενείς με το σύνδρομο όλοι εμφάνιζαν ψυχοκινητική καθυστέρηση ενώ σπασμούς το 4-17% ανάλογα με την θέση εντοπισμού της παραλλαγής. Στο σύνολο των ασθενών που εμφάνιζαν επιληψία δεν καταγράφηκαν κοινά στοιχεία σε σχέση με το είδος των σπασμών ή άλλα εγκεφαλογραφικά ή απεικονιστικά, ειδικά για το σύνδρομο ευρήματα [262]. Από τη βιβλιογραφία αναδεικνύεται ότι παραλλαγές πρώιμου τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης που εντοπίζονται στα εξόνια 17-18 οδηγούν σε μετάγραφα που δεν αποδομούνται μέσω NMD (Nonsense Mediated Decay) και καταλήγουν να είναι τοξικά (toxic gain of function) οδηγώντας σε σοβαρότερους φαινοτύπους. Αντιθέτως παραλλαγές που επηρεάζουν αμινοξέα πολύ νωρίτερα στην πρωτεΐνη έχουν ως αποτέλεσμα την καταστροφή των μεταγράφων και παρά την απλοανεπάρκεια που προκύπτει αποφεύγεται η τοξικότητα και καταγράφονται ηπιότερες κλινικές εικόνες.

2. την νέα *de novo* παραλλαγή NM_182958.3:c.275A>G:p.His92Arg στο γονίδιο *KAT8* που το 2020 συσχετίσθηκε με την εμφάνιση του νευροαναπτυξιακού συνδρόμου Li-Ghorgani-Weisz-Hubshman με κύρια χαρακτηριστικά ψυχοκινητική καθυστέρηση, επιληψία, νοητική υστέρηση, δομικές παραλλαγές στη μαγνητικές εγκεφάλου των ασθενών και δυσμορφικά στίγματα. Η νέα παρερμηνεύσιμη παραλλαγή που ανιχνεύθηκε στον ασθενή 103 βρίσκεται εντός της δομικής περιοχής chromobarrel του γονιδίου και παρότι δεν έχει ακόμα αποσαφηνισθεί ο ακριβής της ρόλος, λόγω της ομοιότητας της με άλλες γνωστές δομές εικάζεται ότι συμμετέχει στην αναγνώριση και ακετυλίωση των ιστονών στα νουκλεοσώματα [263]. Ο ασθενής, αν και σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία μόλις ο δέκατος παγκοσμίως, φαίνεται να φέρει πολλές ομοιότητες με τους εννέα ασθενείς στην πρώτη περιγραφή του συνδρόμου [263]. Ειδικότερα παρουσιάζει ΨΚΚ, πυρετικούς και απύρετους σπασμούς και η μαγνητική εγκεφάλου αποκάλυψε ασυμμετρία των εγκεφαλικών ημισφαιρίων και των ινιακών λοβών. Η χορήγηση βαλπροϊκού οξέος ως αγωγή για την επιληψία είχε αποδοτικά αποτελέσματα για την μείωση της συχνότητας των κρίσεων όπως

αναφέρεται και στο άρθρο του 2020 και πιθανώς εξηγείται με βάση ότι το βαλπροϊκό είναι γνωστός αναστολέας απακετυλίωσης και προάγει την ακετυλίωση των ιστονών.

3. την *de novo* παραλλαγή NM_002107.7:c.377A>G:p.Gln126Arg στο γονίδιο *H3-3A*. Ο ρόλος του γονιδίου *H3-3A* στην παθογένεια νευροαναπτυξιακών νοσημάτων καταγράφηκε για πρώτη φορά το 2020 σε ασθενείς με διάγνωση συνδρόμου Bryant-Li-Bhoj τύπου 1 με κύρια κλινικά χαρακτηριστικά, ψυχοκινητική καθυστέρηση προοδευτικά επιδεινούμενη, επιληψία, ελάσσονα δυσμορφικά στίγματα, ατροφία εγκεφαλικού φλοιού, νευροεκφυλισμό και οπτική ατροφία [264]. Η παραλλαγή p.Gln126Arg που ανιχνεύθηκε στην ασθενή 89 είναι πιθανά η γνωστή παραλλαγή p.Gln125Arg, όπως αναφέρεται στην μελέτη του 2020 (λόγω διαφορετικής ονοματολογίας), και η ασθενής εμφανίζει όλα τα προαναφερθέντα κλινικά ευρήματα με εξαίρεση την ατροφία του εγκεφαλικού φλοιού και την εμφάνιση συγκάμψεων και σκολίωσης.

4. τη νέα *de novo* παραλλαγή NM_003070.5:c.3479C>G:p.Ala1160Gly στο γονίδιο *SMARCA2* του οποίου παθογόνες παραλλαγές σχετίζονται με το σύνδρομο Nicolaidis-Baraitser. Η παραλλαγή εντοπίζεται στην περιοχή της ΑΤΡάσης στο μοτίβο VI όπως και η πλειοψηφία των παραλλαγών που εντοπίζονται στους ασθενείς. Η ασθενής 85 που φέρει την παραλλαγή εμφανίζει την τυπική εικόνα του συνδρόμου με πυρετικούς και απύρετους σπασμούς από τη βρεφική ηλικία και δυσμορφικά στίγματα που εμπεριέχουν ιδιάζων προσωπίο, αυξημένη τριχοφυΐα μετώπου, πυκνά φρύδια, χαμηλή πρόσφυση ώτων και εντυπώματα άμφω.

5. την ήδη γνωστή στη βάση δεδομένων ClinVar, παθογόνο παραλλαγή NM_0045013:c.1003_1004delAT:p.Ile335* στο γονίδιο *HNRNPU* που ανιχνεύθηκε στην ασθενή 88. Σε κυτταρικό επίπεδο η πρωτεΐνη HNRNPU φαίνεται να έχει επιγενετική δράση καθότι συμμετέχει σε λειτουργίες όπως η απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X και η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης [208] και παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου σχετίζονται με ΑΕΕ τύπου 54. Η παραλλαγή εντοπίζεται εντός της περιοχής SPRY (Εικόνα 28), είναι πλαισιοτροπική και αναμένεται να οδηγεί σε πρώιμο τερματισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης και απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου (LOF), όπως παρατηρείται για την πλειοψηφία των παραλλαγών των ασθενών [208]. Σε ότι αφορά την κλινική εικόνα αναφέρεται ψυχοκινητική καθυστέρηση και φαρμακοανθεκτική επιληψία από ηλικίας 6 μηνών έως και σήμερα,

ενώ παρατηρήθηκε καλύτερος έλεγχος των κρίσεων μετά την ηλικία των 30 ετών (παρούσα ηλικία 40 ετών). Οι σπασμοί είναι πυρετικοί και απύρετοι και η μαγνητική εγκεφάλου κατά την παιδική ηλικία ήταν φυσιολογική.

5.2.10.2 Γονίδια που εμπλέκονται σε βασικές κυτταρικές διαδικασίες (μεταγραφή, αντιγραφή, μετάφραση)

Σε αντιστοιχία με την επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης πληθώρα παραγόντων εμπλέκονται σε βασικές διεργασίες του κυττάρου και επί μοριακών διαταραχών επηρεάζουν την αναμενόμενη φυσιολογική λειτουργία. Ανάμεσα στους παράγοντες αυτούς είναι οι πρωτεΐνες PURA, NR2F1, αγκυρίνη β και ZNF142 όπου παραλλαγές των αντίστοιχων γονιδίων καταγράφηκαν σε ασθενείς με επιληψία.

Αναλυτικότερα αναφέρονται:

1. η νέα *de novo* παραλλαγή NM_005859.5:c.224T>G:p.Leu75Arg στο γονίδιο *PURA* στην ασθενή 111. Το γονίδιο *PURA* έχει κρίσιμο ρόλο στην αντιγραφή και μεταγραφή του DNA καθώς και στην μεταφορά μορίων mRNA [205]. Η παραλλαγή εντοπίζεται στην πρώτη επανάληψη PUR (Εικόνα 27). Η αρχική αιτία παραπομπής ήταν γενικευμένη υποτονία εμφανής αμέσως μετά τη γέννηση με ανάγκη οξυγόνωσης, ωστόσο σε ηλικία 11 μηνών τέθηκε κλινική διάγνωση βρεφικών σπασμών με κινήσεις εναγκαλισμού και επεισόδια προσήλωσης βλέμματος. Παράλληλα ήταν εμφανής η ψυχοκινητική καθυστέρηση και ηλεκτροεγκεφαλογραφικά εντοπίστηκε υψαρρυθμία. Τώρα η ασθενής εμφανίζει τονικούς σπασμούς με συνοδή βολβοστροφή. Σημειώνεται ότι η μυϊκή υποτονία είναι συνήθως το πρώτο σύμπτωμα που καταγράφεται στους ασθενείς [203].
2. η νέα *de novo* παραλλαγή NM_005654.6:c.907C>T:p.Gln303* στο γονίδιο *NR2F1* (nuclear receptor subfamily 2, group F, member) στον ασθενή 110. Η παραλλαγή εντοπίζεται στην περιοχή LBD και αναμένεται να οδηγεί σε απλοανεπάρκεια. Η πρώτη αναφορά σε ασθενείς με μοριακές βλάβες του γονιδίου *NR2F1* που εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 5q15 και κωδικοποιεί για έναν πυρηνικό υποδοχέα με ρυθμιστική δράση κατά την μεταγραφή, πραγματοποιήθηκε το 2014 σε ασθενείς με ήπια ή μέτρια NY και οπτική ατροφία [265]. Έκτοτε στο φάσμα του συνδρόμου, το οποίο πήρε το όνομα Bosch-Boonstra-Schaaf από τους ερευνητές

που το περιέγραψαν, προστέθηκαν και άλλα κλινικά χαρακτηριστικά όπως επιληψία, διαταραχές στο αυτιστικό φάσμα, ψυχοκινητική καθυστέρηση, υποτονία και αυξημένη αντοχή στον πόνο [266]. Η πρωτεΐνη NR2F1 αποτελείται από τις δομικές περιοχές DBD και LBD με ρόλο την σύνδεση με το DNA και άλλα μόρια πρόσδεσης (ligands) αντίστοιχα. Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα παραλλαγές που οδηγούν σε απλοανεπάρκεια εκτός της δομικής περιοχής DBD σχετίζονται με ηπιότερο φαινότυπο [266]. Κλινικά ο ασθενής 110 (ηλικίας 1,5 ετών κατά την μοριακή διερεύνηση) εμφάνιζε μυοκλονική επιληψία με έναρξη σε ηλικία 10 μηνών ενώ δεν υπήρχαν πληροφορίες για οφθαλμολογικές διαταραχές από το ιστορικό του. Μυοκλονική επιληψία από την βρεφική ηλικία σχετιζόμενη με το γονίδιο *NR2F1* έχει αναφερθεί σε ζεύγος μονοζυγωτικών διδύμων με συνοδά ευρήματα ΨΚΚ, απώλεια όρασης και νυσταγμό [267]. Η μη ύπαρξη οφθαλμολογικής συμπτωματολογίας στον εξεταζόμενο δεν αποκλείει την ανάπτυξή της μελλοντικά καθότι περιγράφονται περιπτώσεις, όπως και στα μονοζυγωτικά δίδυμα, όπου η οπτική ατροφία διαγνώσθηκε σε ηλικία 3 ετών.

3. η ετερόζυγη παραλλαγή NM_001148.6:c.2968C>T:p.Arg990* στο γονίδιο *ANK2* (ankyrin 2) στην ασθενή 107. Το γονίδιο *ANK2* εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 4q25-q26 και κωδικοποιεί την αγκυρίνη β. Η παραγόμενη πρωτεΐνη δρα ως διαμεσολαβητής για την σύνδεση μεμβρανικών πρωτεϊνών στον κυτταροσκελετό της σπεκτρίνης και έχει εξέχοντα ρόλο σε βασικές κυτταρικές διεργασίες όπως η μεμβρανική μεταφορά, η κυτταρική προσκόλληση και σηματοδότηση καθώς και η διατήρηση του σχήματος του κυτταροσκελετού [268]. Στον άνθρωπο υπάρχουν δύο διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα και η διαφορά τους είναι το εξόνιο 37 το οποίο εμπεριέχεται μόνο στην «*giant ankyrin-B*» και απουσιάζει από την αγκυρίνη β. Παρά την, από το 2012, συσχέτιση της με σύμπλοκες νευροαναπτυξιακές διαταραχές το φάσμα των οποίων περιλαμβάνει επιληψία, αυτισμό και μικροκεφαλία στη βάση δεδομένων OMIM αναφέρονται μόνο οι καρδιολογικοί φαινότυποι με τους οποίους σχετίζεται. Μόνο στη βάση ClinGen περιγράφεται η συσχέτιση παραλλαγών απλοανεπάρκειας του γονιδίου με την ανάπτυξη των νευροαναπτυξιακών φαινοτύπων ενώ και μελέτες σε ζωικά μοντέλα για την επίδραση LOF παραλλαγών του γονιδίου επιβεβαιώνουν την ύπαρξη νευρολογικών διαταραχών που πιθανά σχετίζονται με ενίσχυση της λειτουργίας των

νευραξόνων [269]. Η απουσία βιβλιογραφικών δεδομένων για την κλινική οντότητα που περιλαμβάνει τους επιληπτικούς φαινοτύπους δεν επιτρέπει την εξαγωγή σαφών συμπερασμάτων για τη σχέση γονοτύπου-φαινοτύπου.

4. τη νέα ομόζυγη παραλλαγή NM_001379661.1:c.982_983delAA:p.Lys328Glufs*2 στο γονίδιο *ZNF142* (zinc finger protein 142) που ανιχνεύθηκε στον ασθενή 106. Παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου *ZNF142*, που εδράζεται στη χρωμοσωμική θέση 2q35 και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη με καίριο ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής, σχετίζονται με αυτοσωμική υπολειπόμενη νευροαναπτυξιακή διαταραχή. Στα κλινικά στοιχεία περιλαμβάνονται ΝΥ, διαταραχές λόγου, επιληψία και δυστονία [270] συμβατά και με τα συμπτώματα του ασθενούς που εμφανίζει σπασμούς από την βρεφική ηλικία και συνοδή ψυχοκινητική καθυστέρηση.

5.2.11 Παραλλαγές σε γονίδια που επηρεάζουν τη νευρωνική μετανάστευση - Interneuronopathies

Σε έντεκα ασθενείς που μελετήθηκαν με αλληλούχηση επόμενης γενιάς εντοπίστηκαν μοριακές βλάβες σε γονίδια που έχουν κρίσιμο ρόλο στη νευρωνική μετανάστευση και η δυσλειτουργία τους οδηγεί σε διαταραχές των GABA-νεργικών διανευρώνων. Οι παραλλαγές των ασθενών 79, 80, 52, 71 και 93 (που αφορούν τα γονίδια *AFF3*, *TCF4*, *ARX*, *MECP2* και *FOXP1* αντίστοιχα) αναλύονται στις προηγούμενες ενότητες.

Στην ασθενή 98 αποκαλύφθηκε η *de novo* νέα παραλλαγή NM_000430.4:c.425T>C:p.Phe142Ser στο γονίδιο *PAFAH1B1* (platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1B, alpha subunit) που εδράζεται στη χρωμοσωμική θέση 17p13.3 και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη με εξέχοντα ρόλο στην ανάπτυξη του εγκεφαλικού φλοιού [271]. Παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου σχετίζονται με εμφάνιση αυτοσωμικής επικρατητικής υποφλοιώδους εστιακής ετεροτοπίας ή λισσεγκεφαλίας τύπου 1 και οι ασθενείς εμφανίζουν φαρμακοανθεκτικούς σπασμούς, ψυχοκινητική καθυστέρηση και δομικές παραλλαγές στην μαγνητική εγκεφάλου [272]. Η ασθενής 98 έχει φαρμακοανθεκτική επιληψία, ψυχοκινητική καθυστέρηση, ηλεκτροεγκεφαλογράφημα με φτωχή οργάνωση και

τρόμο. Μία μαγνητική εγκεφάλου σε βρεφική ηλικία αναφέρεται φυσιολογική ενώ λόγω μη επιθυμίας των γονέων δεν πραγματοποιήθηκε νεότερος απεικονιστικός έλεγχος.

Στην ασθενή 94 εντοπίσθηκε η ήδη γνωστή στη βιβλιογραφία και στη βάση δεδομένων ClinVar παραλλαγή NM_000555.3:c.427G>A:p.Asp143Asn στο γονίδιο *DCX* (doublecortin) που εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση Χq23. Η παραγόμενη πρωτεΐνη όπως και η πρωτεΐνη του γονιδίου *PAFAH1B1*, με την οποία συνδέεται, ενέχεται στην ανάπτυξη του εγκεφαλικού φλοιού. Παθολόγες ή πιθανώς παθολόγες παραλλαγές του γονιδίου σχετίζονται με εμφάνιση φυλοσύνδετης υποφλοιώδους εστιακής ετεροτοπίας σε θήλεα και φυλοσύνδετης λισσεγκεφαλίας σε άρρενα ενώ καταγράφονται και ασυμπτωματικά θήλεα φορείς παθολόγων παραλλαγών λόγω επιλεκτικής απενεργοποίησης του Χ χρωμοσώματος [273]. Η κλινική εικόνα της ασθενούς περιλαμβάνει φαρμακοανθεκτική επιληψία, σφαιρική αναπτυξιακή καθυστέρηση, ηλεκτροεγκεφαλογράφημα με πολυεστιακές εκφορτίσεις και από τον απεικονιστικό έλεγχο εντοπίζεται ετεροτοπία συμπτώματα που αποτελούν κύρια χαρακτηριστικά του νοσήματος.

Στον ασθενή 100 ανευρέθηκε ετερόζυγο έλλειμμα μεγέθους 1,5Mb στην περιοχή 7q11.23 (chr7:72,717,395-74,173,168del) που περιλαμβάνει 35 γονίδια και είναι συμβατό με διάγνωση συνδρόμου Williams-Beuren. Αν και το σύνδρομο περιγράφηκε πρώτη φορά το 1961, μόλις το 2010 αναφέρθηκαν ασθενείς με ελλείμματα της περιοχής και επιληπτικούς φαινοτύπους. Σε μεταγενέστερη μελέτη του 2015 παρατηρήθηκε έναρξη σπασμών σε ηλικίες 1 μηνός έως 8 ετών με τα πιο συχνά είδη να είναι εστιακοί ή γενικευμένοι τονικοκλονικοί ή συνδυασμός μυοκλονικών, ατονικών και τονικών σπασμών καθώς και βρεφικοί σπασμοί. Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά καταγράφηκαν αιχμές, πολυαιχμές, συμπλέγματα αιχμής-κύματος και υψαρρυθμία. Στο 37,5% των ασθενών εντοπίσθηκαν εστιακές φλοιϊκές δυσπλασίες. Παρά το ότι δεν έχει εντοπισθεί ακόμα ποιο είναι το δοσοευαίσθητο γονίδιο του ελλείμματος που οδηγεί στην εμφάνιση επιληψίας η καταγραφή ασθενών με σύνδρομο Williams-Beuren, φαρμακοανθεκτική επιληψία και δομικές παραλλαγές του εγκεφάλου υποδεικνύει την πιθανή συνεισφορά ενός γονιδίου απαραίτητου για τη νευρωνική μετανάστευση εντός του ελλείμματος [274]. Ο ασθενής 100, ηλικίας 3

μηνών, παρουσίαζε ΨΚΚ, σπασμούς (προσηλώσεις), υποτονία κορμού και υπερτονία άκρων, οπισθότονο, οφθαλμικό αλφισμό, δυσμορφικά στίγματα και μαγνητική εγκεφάλου με διεύρυνση των γεφυροπαρεγκεφαλιδικών δεξαμενών.

Στην ασθενή 99 εντοπίσθηκαν δύο νέες παραλλαγές στο γονίδιο *ABAT* (4-aminobutyrate aminotransferase) το οποίο κωδικοποιεί για την GABA-τρανσφεράση και εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 16p13.2. Η αυτοσωμική υπολειπόμενη κλινική οντότητα που συνδέεται με το νόσημα είναι εξαιρετικά σπάνια με μόλις 10 ασθενείς στη βιβλιογραφία. Ανήκει στις ΑΕΕ που χαρακτηρίζονται από θάνατο στην πρώιμη παιδική ηλικία καθώς ο ρόλος της παραγόμενης πρωτεΐνης είναι ο μεταβολισμός του GABA που αποτελεί τον σημαντικότερο ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή στα θηλαστικά. Η κλινική εικόνα των ασθενών περιλαμβάνει σοβαρή ΨΚΚ, φαρμακοανθεκτικούς σπασμούς καθώς και κινητικές διαταραχές [275]. Οι βλάβες που ανιχνεύθηκαν στην ασθενή ήταν η παρερμηνεύσιμη παραλλαγή NM_020686.6:c.1153G>T:p.Asp385Tyr πατρικής προέλευσης και το μητρικής προέλευσης μικροέλλειμμα chr16:8,841,965-8,851,663, μεγέθους 9,7kb που περιλαμβάνει τα εξόνια 4-6 του γονιδίου. Η παρουσία και η προέλευση του μικροελλείμματος επιβεβαιώθηκε με μελέτη σε επίπεδο RNA και παρότι αρχικά οι δύο παραλλαγές χαρακτηρίζονταν ως αβέβαιης κλινικής σημασίας η μελέτη αυτή επιτρέπει τον χαρακτηρισμό του ελλείμματος ως παθογόνο και της σημειακής παραλλαγής ως πιθανώς παθογόνου δεδομένου ότι βρίσκεται σε διάταξη trans με παθογόνο παραλλαγή. Κλινικά η ασθενής εμφανίζει ΑΕΕ με σπασμούς από την 1^η μέρα ζωής, υποτονία, δυσχέρεια θηλασμού, ληθαργικότητα και ηλεκτροεγκεφαλογραφικά έχει πρότυπο burst suppression. Ο απεικονιστικός έλεγχος έδειξε αυξημένο σήμα στις ωχρές σφαίρες και στην περικοιλιακή λευκή ουσία ενώ αναμένονται και αποτελέσματα από μέτρηση επιπέδων GABA-τρανσαμινάσης σε εγκεφαλονωτιαίο υγρό καθώς και μαγνητική φασματοσκοπία εγκεφάλου που θα επιβεβαιώσουν την μοριακή διάγνωση.

Στον ασθενή 78 ανιχνεύθηκε η νέα *de novo* παραλλαγή NM_001242896.3:c.147-2A>C στο γονίδιο *DEPDC5* το οποίο σχετίζεται με εμφάνιση διαφόρων ειδών επιληψίας. Κλινικά ο ασθενής εμφανίζει σπασμούς από ηλικίας 23 μηνών με επεισόδια προσηλώσεων, βλεφαροκλονίες και γενικευμένους τονικοκλονικούς. Παράλληλα καταγράφονται τρόμος, παλινδρόμηση λόγου και μη

ικανοποιητική βλεμματική επαφή. Ηλεκτροεγκεφαλογραφικά εντοπίσθηκαν αιχμές δεξιά μετωποκροταφικά. Συνήθως οι παραλλαγές που καταγράφονται, συμπεριλαμβανομένης και της c.147-2A>C, οδηγούν σε απλοανεπάρκεια του γονιδίου με τελικό αποτέλεσμα την αδυναμία καταστολής του συμπλόκου mTORC1. Μελέτες ζωικών μοντέλων ανέδειξαν ότι επιπλέον του εμπλεκόμενου μονοπατιού mTOR ο μηχανισμός επιληπτογένεσης αφορά και τους GABA-νεργικούς νευρώνες [276].

Στην ασθενή 92 ανιχνεύθηκαν σε σύνθετη ετεροζυγωτία οι γνωστές παραλλαγές NM_000059.4:c.316G>A (μητρικής προέλευσης) και NM_000059.4:c.4515_4525del (πατρικής προέλευσης) στο γονίδιο *BRCA2* το οποίο σχετίζεται με την εμφάνιση της αυτοσωμικής υπολειπόμενης αναιμίας Fanconi. Το γονίδιο *BRCA2* εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 13q13.1 και έχει εξέχοντα ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA, καθώς και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση. Ωστόσο νεότερα βιβλιογραφικά δεδομένα κατατάσσουν το γονίδιο ως σχετιζόμενο με εμφάνιση επιληψίας [277] και αποκαλύπτουν πιθανή εμπλοκή του στην εμφάνιση εστιακής φλοιϊκής δυσπλασίας τύπου II [278]. Αν και ο ακριβής μηχανισμός που οδηγεί σε επιληπτογένεση δεν έχει εξακριβωθεί θεωρείται ότι αφορά την απουσία ή λανθασμένη έκφραση πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού με αποτέλεσμα διαταραχές στη νευρωνική μετανάστευση [278]. Κλινικά η ασθενής εμφανίζει ΑΕΕ με σπασμούς από ηλικίας 5 μηνών, μικροκεφαλία, υπερ- και υπό-χρωμες κηλίδες δέρματος, υπερτελωρισμό, επίκανθο, στραβισμό και δύο φλοιούποφλοιώδεις κυστικές βλάβες στο δεξιό μετωπιαίο λοβό για τις οποίες πραγματοποιήθηκε χειρουργική παρέμβαση. Παράλληλα από τον λοιπό εργαστηριακό έλεγχο παρατηρήθηκε χρωμοσωμική ευθραυστότητα εύρημα συμβατό με αναιμία Fanconi.

5.2.12 Παραλλαγή σε γονίδιο με νευροανοσολογικές εκδηλώσεις

Στον ασθενή 77 ανιχνεύθηκε η πατρικής προέλευσης παραλλαγή NM_022168.4:c.2465G>A:p.Arg822Gln στο γονίδιο *IFIH1*. Παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου οδηγούν στα σύνδρομα Singleton-Merten (τύπου 1) ή Aicardi-Goutieres (τύπου 7). Η παραλλαγή p.Arg822Gln είναι GOF [279], βρίσκεται στην περιοχή Hel2 και σύμφωνα με τη βάση δεδομένων ClinVar σχετίζεται

με την εμφάνιση και των δύο συνδρόμων. Η παρουσία παθογόνων παραλλαγών και σε ασυμπτωματικούς φορείς στην ίδια οικογένεια, εξηγείται λόγω της ατελούς διεισδυτικότητας [218]. Η κλινική εικόνα του παιδιού με βρεφικούς σπασμούς, ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης, μικροσωμία, μικροκεφαλία, πολλαπλά αιμαγγειώματα και ατοπική δερματίτιδα είναι συμβατή με σύνδρομο Aicardi-Goutieres τύπου 7.

5.2.13 Παραλλαγή γονιδίου *TSC1*

Συχνά αναφέρεται η εμφάνιση συνδρόμου βρεφικών σπασμών στα πλαίσια γνωστών διακριτών κλινικών φαινοτύπων όπως η αυτοσωμική επικρατητική Οζώδης σκλήρυνση τύπου 1 που αποτελεί Νευροδερματικό νόσημα και σχετίζεται με παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου *TSC1*. Το γονίδιο *TSC1* (hamartin) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 9q34.13 και κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη αμαρτίνη που μαζί με την τουμπερίνη (κωδικοποιείται από το γονίδιο *TSC2*) σχηματίζουν ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο με κατασταλτική δράση στο σηματοδοτικό μονοπάτι mTOR (Εικόνα 15). Στην ασθενή 101 ανιχνεύθηκε η γνωστή παραλλαγή NM_000368.5:c.2080C>T:p.Gln694* στο γονίδιο *TSC1* [280]. Η ασθενής, 47 ετών κατά τη διάγνωση, είχε εμφανίσει το πλήρες φάσμα του νοσήματος με βρεφικούς σπασμούς που συνέχισαν έως την ενήλικη ζωή, λιποαδενώματα στήθους, νευροενδοκρινή όγκο παγκρέατος, κακοήθεια αδενοσιγμοειδούς, διηθήματα δίκην θάμβης υαλού, αιμωδίες άκρων, παραισθήσεις, πολλαπλές σκληρυντικές αλλοιώσεις και αμαρτώματα και αποτιτανώσεις στην μαγνητική εγκεφάλου.

5.2.14 Παραλλαγές σε γονίδια με νευροεκφυλιστική δράση

Το γονίδιο *WDR73* (WD repeat domain 73) που εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 15q25.2 κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη σημαντική στη διατήρηση της δομής και επιβίωσης κυττάρων καθώς και στην ανάπτυξη και στην ωρίμανση των νευρωνικών κυττάρων [281]. Παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου *WDR73* σε ομοζυγωτία ή σύνθετη ετεροζυγωτία σχετίζονται με την εμφάνιση του αυτοσωμικού υπολειπόμενου συνδρόμου Galloway-Mowat τύπου 1 το φάσμα του οποίου περιέχει νευροεκφυλισμό από τη βρεφική ηλικία, εγκεφαλική ατροφία, μικροκεφαλία, σπασμούς καθώς και οφθαλμολογικές και νεφρολογικές διαταραχές.

Στην ασθενή 95 ανιχνεύθηκε σε εικόνα ομοζυγωτίας η νέα παραλλαγή NM_032856.5:c.525_565dup:p.Asp189Valfs*6 στο γονίδιο *WDR73*. Από τον έλεγχο για παραλλαγές αριθμού αντιγράφων μέσω του ExomeDepth διαπιστώθηκε ότι είναι σύνθετος ετεροζυγώτης που φέρει και έλλειμμα μεγέθους 773.1kb (με συντεταγμένες Chr15:84,908,070-85,681,134) το οποίο περιλαμβάνει τουλάχιστον 12 γονίδια μεταξύ των οποίων και το *WDR73*. Από το ιστορικό της ασθενούς αναφέρονται σπασμοί από ηλικίας 9 μηνών με ηλεκτροεγκεφαλογραφικό πρότυπο burst suppression, τετραπληγία, ΨΚΚ, μικροκεφαλία, ατροφία σπληνίου μεσολοβίου και παρεγκεφαλίδας, μειωμένη λευκή ουσία εγκεφάλου, καταρράκτης και εξάρθρημα ισχίων όλα συμβατά με το φαινοτυπικό φάσμα του συνδρόμου Galloway-Mowat τύπου 1. Σημειώνεται ότι η εξεταζόμενη είχε μεγαλύτερη αδελφή με όμοια κλινική εικόνα η οποία καθότι είχε αποβιώσει τη στιγμή της διάγνωσης δεν υποβλήθει σε γενετικό έλεγχο.

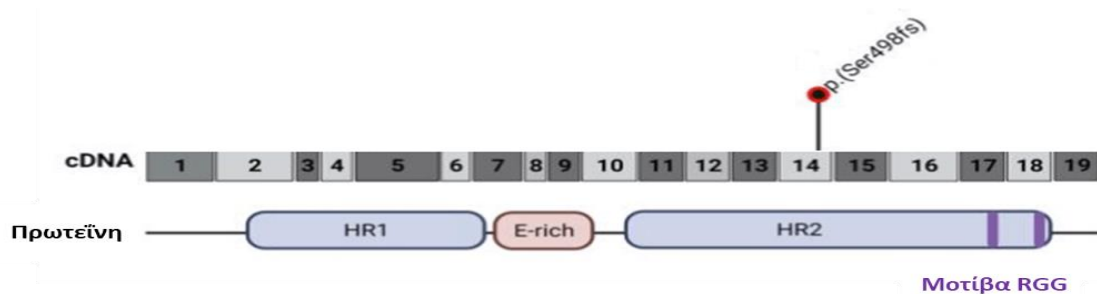
Το γονίδιο *TGM6* (transglutaminase 6), εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 20p13 και κωδικοποιεί για την τρανσγλουταμινάση 6, μια πρωτεΐνη που εκφράζεται κυρίως στην παρεγκεφαλίδα και τροποποιεί κατάλοιπα γλουταμίνης. Παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές στο γονίδιο *TGM6* κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα και σχετίζονται με εμφάνιση νωτιαιοπαρεγκεφαλιδικής αταξίας 35 [282]. Στην ασθενή 113 και στον πατέρα της ανιχνεύθηκε σε ετεροζυγωτία η νέα παραλλαγή NM_198994.3:c.1336+1G>T. Η κλινική τους εικόνα περιλαμβάνει αστάθεια βάδισης, αταξία και σπασμούς (στην ασθενή αναφοράς έναρξη σε ηλικία 15 μηνών με πυρετικούς και απύρετους φαρμακοανθεκτικούς). Σημειώνεται ότι στη βιβλιογραφία αναφέρεται φαινοτυπική ετερογένεια ακόμα και μεταξύ μελών της ίδιας οικογένειας [283].

Στην ασθενή 86 εντοπίσθηκαν οι δύο γνωστές παραλλαγές NM_000153.4:c.749T>C:p.Ile250Thr και NM_000153.4:c.396G>A:p.Trp132* [221] σε διάταξη trans στο γονίδιο *GALC* το οποίο, όπως περιγράφεται στην ενότητα 1.9, σχετίζεται με την εμφάνιση της αυτοσωμικής υπολειπόμενης νόσου Krabbe. Κλινικά η εξεταζόμενη παρουσίασε παλινδρόμηση της ανάπτυξης από ηλικίας 6 μηνών με ταυτόχρονη έναρξη επεισοδίων προσήλωσης, τα οποία αποτελούν και συχνό χαρακτηριστικό της νόσου όταν αφορά τον πρώιμο βρεφικό τύπο. Στην μαγνητική

εγκεφάλου αποκαλύφθηκε λευκοδυστροφία ενώ και ο ενζυμικός έλεγχος επιβεβαίωσε τη γενετική διάγνωση.

5.2.15 Νέα συσχέτιση γονοτύπου-φαινοτύπου, γονίδιο *CAPRIN1*

Στον ασθενή 91 ανιχνεύθηκε η *de novo* νέα ετερόζυγη παραλλαγή NM_005898.5:c.1493_1496del:p.Ser498Asnfs*10 (Εικόνα 51) στο γονίδιο *CAPRIN1* (Cell cycle Associated PRoteIN 1) που εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 11p13. Κατά τη χρονική περίοδο της ανάλυσης κανένας φαινότυπος δεν είχε συσχετισθεί με παραλλαγές του γονιδίου και το μόνο στοιχείο που ήταν γνωστό ήταν ότι επρόκειτο για γονίδιο που πιθανά εμπλέκεται σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αυτισμού. Μετά από επικοινωνία με ερευνητική ομάδα του πανεπιστημίου του Τορίνου που ερευνούσε πιθανές συσχετίσεις γονοτύπου-φαινοτύπου αποκαλύφθηκε ότι παραλλαγές που οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας του γονιδίου σχετίζονται με την εμφάνιση νευροαναπτυξιακών διαταραχών που περιλαμβάνουν ΝΥ, διαταραχές λόγου, αυτισμό και επιληψία. Η παραγόμενη πρωτεΐνη έχει ρυθμιστικό ρόλο στη μεταφορά και μετάφραση νευρωνικών mRNAs που είναι καίριας σημασίας για τη συναπτική πλαστικότητα καθώς και άλλων mRNAs που μετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μετανάστευση. Μελέτες σε πολυδύναμα βλαστοκύτταρα *CAPRIN1*+/- έδειξαν διαταραχές στην οργάνωση των νευρώνων, μεταφραστική καταστολή και νευροεκφυλισμό. Δομικά η πρωτεΐνη αποτελείται από δύο ομόλογες συντηρημένες περιοχές τις HR1 και HR2, την περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα γλουταμινικού οξέος (E-rich) και την καρβοξυτελική με επαναλαμβανόμενα μοτίβα αργινίνης-γλυκίνης-γλυκίνης (Arg-Gly-Gly, RGG) τα οποία είναι χαρακτηριστικά πρωτεϊνών που προσδένουν RNA [284].



Εικόνα 51: Σχηματική απεικόνιση της τοπολογίας της παραλλαγής του γονιδίου *CAPRIN1*. Αναπροσαρμογή από: Pavinato L. et al. (2022) "CAPRIN1 haploinsufficiency

causes a neurodevelopmental disorder with language impairment, ADHD and ASD.", Brain, Jul 27;awac278.

5.2.16 Παραλλαγές αβέβαιης κλινικής σημασίας που αποκαλύφθηκαν από αλληλούχηση επόμενης γενιάς

Από τους 107 ασθενείς της παρούσας μελέτης σε 7 προέκυψαν ευρήματα αβέβαιης κλινικής σημασίας τα οποία είτε λόγω αδυναμίας διερεύνησης του προτύπου κληρονόμησης, είτε λόγω ελλিপών αναφορών στη διεθνή βιβλιογραφία δεν κατέστη εφικτό να αποσαφηνιστεί ο ρόλος τους στην κλινική εικόνα των ασθενών.

Ειδικότερα στην ασθενή 121 με κλινική εικόνα ΑΕΕ βρεφικής έναρξης, μικροκεφαλία, σπαστική τετραπληγία και σκολίωση ανευρέθηκε η νέα αβέβαιης κλινικής σημασίας παραλλαγή NM_031407.7:c.2210C>T:p.Ala737Val στο γονίδιο *HUWE1*. Παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου σχετίζονται με την εμφάνιση φυλοσύνδετης συνδρομικής διαταραχής της νοητικής ανάπτυξης τύπου Turner. Η μη επιθυμία των γονέων για περαιτέρω έλεγχο δεν επιτρέπει τη διερεύνηση του προτύπου κληρονόμησης και τη συσχέτιση της παραλλαγής με την συμπτωματολογία της ασθενούς. Στον ασθενή 120 με κλινική εικόνα συνδρόμου βρεφικών σπασμών, υδροκέφαλου με διάταση των πλαγίων κοιλιών, υπερμετρωπία, μεσοκολπική επικοινωνία, βαρηκοΐα, υπέρταση άκρων και υποτονία κορμού ανευρέθηκε η νέα αβέβαιης κλινικής σημασίας παραλλαγή NM_015335.5:c.5057C>T:p.Thr1686Met στο γονίδιο *MED13L*. Παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου σχετίζονται με αυτοσωμική επικρατητική διαταραχής της νοητικής ανάπτυξης με συνοδά δυσμορφικά στίγματα προσώπου με ή χωρίς καρδιολογικές διαταραχές. Ο στοχευμένος έλεγχος της μητέρας και της ασυμπτωματικής δίδυμης αδελφής του ασθενούς ήταν αρνητικός ωστόσο απουσία δείγματος του πατέρα δεν δύναται να εφαρμοσθεί το κριτήριο PS2 (που αφορά *de novo* παραλλαγές) του ACMG ώστε να αναταξινομηθεί η παραλλαγή ως Πιθανώς παθογόνος.

Στην ασθενή 115 με γενικευμένη γενετική επιληψία, χορεία και αθետωσικές κινήσεις αυχένα ανευρέθηκαν σε ετεροζυγωτία οι παραλλαγές NM_001323418.2:c.907+1G>A και NM_004992.4:c.710G>T:p.Gly237Val στα γονίδια *ALDH18A1* και *MECP2*. Σύμφωνα με τα κριτήρια του ACMG οι παραλλαγές

χαρακτηρίζονται ως πιθανώς παθογόνος και αβέβαιης κλινικής σημασίας αντίστοιχα. Παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες του γονιδίου *ALDH18A1* σχετίζονται με την εμφάνιση σπαστικής παραπληγίας ή με διαταραχές του συνδετικού ιστού (*Cutis laxa*) και ακολουθούν αυτοσωμικό επικρατητικό ή υπολειπόμενο τρόπο κληρονόμησης. Καθότι οι γονείς δεν προσήλθαν για έλεγχο δεν μπορεί να εξακριβωθεί εάν πρόκειται για παραλλαγή που σχετίζεται με φορεία ή νόσο (εάν εμφανίσθηκε *de novo* στην ασθενή) στο γονίδιο *ALDH18A1*. Όσον αφορά την παραλλαγή του γονιδίου *MECP2* η έλλειψη των γονεϊκών δειγμάτων δεν καθιστά δυνατή τη διερεύνηση του προτύπου κληρονόμησης και την συνεισφορά της παραλλαγής στην κλινική εικόνα της ασθενούς.

Στην ασθενή 116 με κλινική εικόνα ΑΕΕ με σπασμούς από την πρώτη μέρα ζωής ταυτοποιήθηκαν η γνωστή παθογόνος παραλλαγή NM_018129.4:c.674G>T:p.Arg255His στο γονίδιο *PNPO* και ο αγνώστου κλινικής σημασίας διπλασιασμός Chr17:44,949,883-46,507,482 που εμπεριέχει 25 γονίδια και μεταξύ αυτών και το γονίδιο *PNPO*. Η παρερμηνεύσιμη παραλλαγή ταυτοποιήθηκε ως μητρικής προέλευσης και σύμφωνα με τη βάση δεδομένων ClinVar, τη διεθνή βιβλιογραφία και τα κριτήρια του ACMG χαρακτηρίζεται ως Παθογόνος. Ο διπλασιασμός μετά από διερεύνηση με χρήση πολυμορφικών επαναλαμβανόμενων μικροδορυφορικών αλληλουχιών προέκυψε πως ήταν πατρικής προέλευσης και δεν έχει καταγραφεί ξανά στις βάσεις δεδομένων. Παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου *PNPO* σε ομοζυγωτία ή σύνθετη ετεροζυγωτία σχετίζονται με την εμφάνιση αυτοσωμικής υπολειπόμενης ανεπάρκεια οξειδάσης πυριδοξίνης-5-φωσφορικού ΑΕΕ. Καθότι η μία από τις δύο παραλλαγές είναι αβέβαιης κλινικής σημασίας συστήθηκε μέτρηση των επιπέδων γλυκίνης, ταυρίνης θρεονίνης, ιστιδίνης, αργινίνης, πυριδοξάλης-5-φωσφορικού καθώς και άλλων μεταβολιτών σε εγκεφαλονωτιαίο υγρό τα οποία θα επιβεβαιώσουν τη διάγνωση [285]. Στην ασθενή 117 με κλινική εικόνα D/EE-SWAS (ESES), φλεβώδες αιμαγγείωμα δεξιά βρεγματικά και συμμετρικές αλλοιώσεις υψηλού σήματος περικολιακά - περιτριγωνικά ανευρέθηκε ο αβέβαιης κλινικής σημασίας διπλασιασμός Chr2:10,580,850-10,585,158 που εμπεριέχει τα εξόνια 3-12 του γονιδίου *ODC1*. *De novo* παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου *ODC1* σχετίζονται με την εμφάνιση του

αυτοσωμικού επικρατητικού συνδρόμου Bachmann-Burr με συμπτωματολογία που εμπεριέχει νευροαναπτυξιακές διαταραχές, δομικές παραλλαγές του εγκεφάλου και ESES [286]. Καθότι δεν υπάρχει διαθέσιμο MLPA kit ή μικροδορυφορικές αλληλουχίες στην περιοχή για να διενεργηθεί διερεύνηση του προτύπου κληρονόμησης μελλοντικά η χρήση του Optical genome mapping πιθανώς να βοηθήσει στη διάγνωση της ασθενούς.

Στον ασθενή 119 με κλινική εικόνα ΑΕΕ και δυσαρθρία ανευρέθηκε η νέα αβέβαιης κλινικής σημασίας παραλλαγή NM_014861.4:c.2312T>C:p.Met771Thr σε ετεροζυγωτία στο γονίδιο *ATP2C2*. Με τα μέχρι στιγμής διαθέσιμα δεδομένα στις βάσεις δεδομένων OMIM ή ClinGen δεν καταγράφεται κλινική εικόνα που να σχετίζεται με παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου ωστόσο από τη βιβλιογραφία πιθανώς συνδέεται με διαταραχές λόγου. Καταγραφή και άλλων ασθενών με παραλλαγές του γονιδίου μελλοντικά μπορεί να οδηγήσει σε αποκάλυψη φαινοτύπου - γονοτύπου. Στην ασθενή 118, στην οποία πραγματοποιήθηκε έλεγχος με trio-WES, αποκαλύφθηκε η νέα *de novo* παθογόνος παραλλαγή NM_014782.7:c.327dupT:p.Gly110Trpfs*17 σε ετεροζυγωτία στο γονίδιο *ARMCX2*. Στις βάσεις δεδομένων προς το παρόν δεν καταγράφεται συσχέτιση με συγκεκριμένο νόσημα, ωστόσο το γονίδιο φαίνεται να έχει ρυθμιστικό ρόλο στην μεταφορά των μιτοχονδρίων στο νευρικό σύστημα [287]. Για την τελική αξιολόγηση της παραλλαγής στην κλινική εικόνα της ασθενούς που αφορά μιτοχονδριακής αιτιολογίας ΑΕΕ χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση με λειτουργικές μελέτες καθώς και καταγραφή φαινοτύπων άλλων ασθενών με παραλλαγές του γονιδίου.

5.3 Συμπεράσματα

5.3.1 Επιλογή κατάλληλης διαγνωστικής προσέγγισης ασθενών με ΑΕΕ: σύγχρονες κατευθυντήριες οδηγίες και συμπεράσματα από την παρούσα μελέτη

Σύμφωνα με τα διεθνή βιβλιογραφικά δεδομένα στον αλγόριθμο της διαγνωστικής προσέγγισης των Αναπτυξιακών και Επιληπτικών Εγκεφαλοπαθειών στο πρώτο στάδιο καταγράφονται το είδος των σπασμών, τα ηλεκτροεγκεφαλογραφικά και απεικονιστικά ευρήματα, τα μεταβολικά ευρήματα μέσω μέτρησης αμινοξέων, οργανικών οξέων και άλλων μεταβολιτών στο αίμα και στο ΕΝΥ καθώς και η ύπαρξη

δυσμορφικών στιγμάτων ή/ και συνοδών ευρημάτων εάν υπάρχουν. Εάν όλα τα ανωτέρω οδηγούν σε ένα γνωστό φαινότυπο τότε το πιθανώς εμπλεκόμενο γονίδιο μπορεί να μελετηθεί μεμονωμένα. Αντίθετα αν τα αποτελέσματα της ανωτέρω καταγραφής δεν είναι απολύτως διαφοροδιαγνωστικά συστήνεται Whole Exome Sequencing (WES) ή και μοριακός καρυότυπος για την εύρεση της πιθανής βλάβης [288, 289].

Η αλληλούχηση όλων των εξονικών περιοχών του γονιδιώματος WES αφορά την μαζική αλληλούχηση μόνο των εξονίων των γονιδίων που όπως είναι γνωστό αφορούν μόνο το 1-1.5% του ανθρώπινου γονιδιώματος και δεν παρέχονται πληροφορίες για μη κωδικοποιούσες ιντρονικές ή ρυθμιστικές περιοχές. Από το WES αποκαλύπτονται κυρίως παραλλαγές στο επίπεδο του ενός ή λίγων νουκλεοτιδίων ενώ έμμεσες πληροφορίες μπορούν να εξαχθούν για παραλλαγές αριθμού αντιγράφων (CNVs) καθώς και βλάβες του μιτοχονδριακού DNA.

Τα CNVs είναι ελλείψεις ή διπλασιασμοί τμημάτων DNA μεγέθους συνήθως >1kb και αποδίδονται σε μη ομόλογο ανασυνδυασμό ή σε λάθος κατά την αντιγραφή του DNA [290]. Η αξιολόγηση ενός CNV ως προς την παθογνωμικότητά του αφορά τον έλεγχο της συχνότητας του στον γενικό πληθυσμό, τη λειτουργία των γονιδίων που περιλαμβάνει, το μέγεθός του (συνήθως CNV με μέγεθος >1Mb είναι πιθανότερο να είναι παθογόνο) καθώς και την ύπαρξή του σε άλλα μέλη στην οικογένεια [291]. Ο μοριακός καρυότυπος είχε εξέχοντα ρόλο στην αποκάλυψη γονιδίων που σχετίζονται με την εμφάνιση ΑΕΕ. Ειδικότερα με την μελέτη μη επαναλαμβανόμενων CNVs και τη χρήση μεθοδολογιών αλληλούχησης ταυτοποιήθηκαν γονίδια εντός της περιοχής των CNVs όπου *de novo* παραλλαγές οδηγούν σε φαινότυπο όπως τα γονίδια *CHD2* και *SYNGAP1* [65].

Ο καρυότυπος είναι απαραίτητος σε περιπτώσεις που δεν υπάρχει απώλεια γενετικού υλικού και το αποτέλεσμα του μοριακού καρυότυπου μπορεί να είναι φυσιολογικό όπως παρατηρείται σε ισοζυγισμένες μεταθέσεις και δακτυλιοειδή χρωμοσώματα [290]. Ειδικότερα χρησιμοποιείται και για τη διάγνωση δακτυλιοειδούς χρωμοσώματος 20 το οποίο συσχετίζεται με εμφάνιση εστιακών κρίσεων διάρκειας 10-20 λεπτών με μειωμένο επίπεδο συνειδήσεως, ηλεκτροεγκεφαλογράφημα με υψηλής

τάσης ρυθμική βραδεία δραστηριότητα [3] και ταυτόχρονη συνύπαρξη νοητικής υστέρησης, μικροκεφαλίας και δυσμορφιών προσώπου [96].

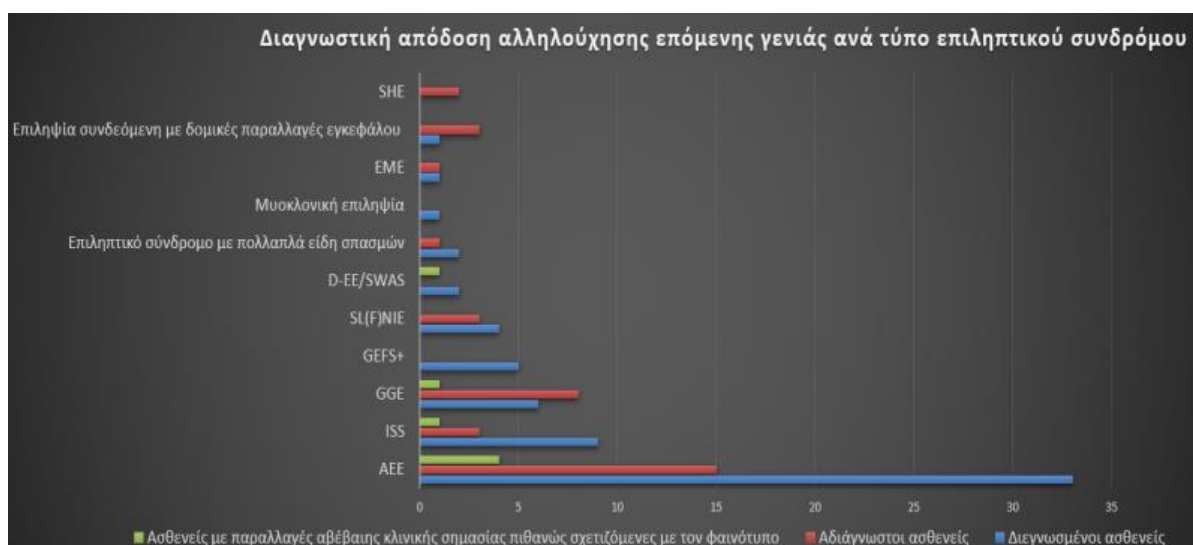
Σύμφωνα με τις νεότερες κατευθυντήριες οδηγίες του ILAE για τη διαγνωστική προσέγγιση των επιληπτικών συνδρόμων προτείνεται η χρήση αλληλούχησης επόμενης γενιάς για τη διάγνωση όλων των ασθενών με εξαίρεση τις περιπτώσεις συνδρόμων που οφείλονται σε επεκτάσεις επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών όπως η νόσος Unverricht-Lundborg. Τα ποσοστά διάγνωσης κυμαίνονται ανάλογα με τον τύπο του επιληπτικού συνδρόμου ωστόσο μεγαλύτερη διαγνωστική απόδοση έχουν οι αυτοπεριοριζόμενες (οικογενείς) επιληψίες νεογνικής και/ή βρεφικής ηλικίας (90%), η οικογενής εστιακή επιληψία με πολλαπλές εστίες (80%) και οι ΑΕΕ (50-60%). Γενετικός έλεγχος συστήνεται σε άτομα με Γενικευμένη γενετική επιληψία ή μεμονωμένους πυρετικούς σπασμούς μόνο επί θετικού οικογενειακού ιστορικού ή άλλων συμπτωμάτων όπως διαταραχές του αυτιστικού φάσματος ή δυσμορφικών στιγμάτων ή σε περιπτώσεις φαρμακοανθεκτικών σπασμών. Παράλληλα από τη σύγκριση των διαφορετικών εργαστηριακών μεθοδολογιών προέκυψε ότι η συνολική διαγνωστική προσέγγιση ήταν 48% με τη χρήση Whole Genome Sequencing, 45% με τη χρήση Whole Exome Sequencing, 25% με τη χρήση πάνελ γονιδίων, 5-15% με τη χρήση μοριακού καρυοτύπου, ενώ πολύ μικρή διαγνωστική απόδοση είχαν ο καρυότυπος και η στοχευμένη μελέτη γονιδίων με αλληλούχηση κατά Sanger [292].

Από τους 383 ασθενείς που παραπέμφθηκαν για γενετικό έλεγχο λόγω επιληψίας στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής (2017-2022) στους 327 πραγματοποιήθηκαν στοχευμένοι έλεγχοι, ενώ 56 προχώρησαν μόνο με αλληλούχηση επόμενης γενιάς. Από τους 327 διαγνώστηκαν 19 ασθενείς (με σύνδρομα Rett, Rett-like, Angelman, Dravet, Ευθραύστου Χ) και 308 παρέμειναν αδιάγνωστοι. Από τους 308 οι 51 προχώρησαν σε αλληλούχηση επόμενης γενιάς. Στο σύνολο των 107 ασθενών (σε 51 είχαν διεξαχθεί προηγούμενοι έλεγχοι και σε 56 ο πρώτος έλεγχος πραγματοποιήθηκε με NGS) που μελετήθηκαν με αλληλούχηση επόμενης γενιάς η μοριακή διαταραχή εντοπίστηκε σε 64 οδηγώντας σε διαγνωστική απόδοση 59,8%, πολύ υψηλότερη της απόδοσης των στοχευμένων ελέγχων που ανήλθε σε 5,81% υποδεικνύοντας τη σημασία της χρήσης του NGS ως εργαλείο πρώτης γραμμής στη διάγνωση ασθενών με επιληψία. Επιπρόσθετα

διαγνώσθηκαν ακόμα 11 πάσχοντα μέλη των οικογενειών των εξεταζόμενων τα οποία δεν προστέθηκαν στην αναφερόμενη διαγνωστική απόδοση.

Όσον αφορά τη διαγνωστική απόδοση ανά επιληπτικό σύνδρομο, όπως αυτή αποδίδεται στο Γράφημα 10, μέγιστη διαγνωστική απόδοση επιτεύχθηκε για τους ασθενείς με GEFS+ όπου διαγνώσθηκαν όλοι (5/5) και ακολούθησαν το σύνδρομο των βρεφικών σπασμών (9/13, 69,2%), οι AEE (34/52, 65,3%), οι D/EE- SWAS και οι πολλαπλοί τύποι σπασμών χωρίς ξεκάθαρο επιληπτικό σύνδρομο (από 2/3, 66,6% σε κάθε κατηγορία). Μικρότερη της αναμενόμενης απόδοσης σημειώθηκε για τα αυτοπεριοριζόμενα (οικογενή) σύνδρομα της τάξης του 57,14% (4/7) γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε ατελή ανάπτυξη της κλινικής εικόνας των ασθενών καθότι ήταν όλοι κάτω του ενός έτους ή στην ύπαρξη άλλων μη ταυτοποιημένων ακόμα γενετικών αιτιολογιών. Κανένας εκ των δύο ασθενών που προσήλθαν με κλινική διάγνωση SHE δεν διαγνώσθηκε, ενώ μόλις μία ασθενής με επιληψία σχετιζόμενη με δομικές παραλλαγές εγκεφάλου διαγνώσθηκε (25%, 1/4). Στην συγκεκριμένη κατηγορία επιληπτικού συνδρόμου έχει εξέχοντα ρόλο και ο μωσαϊκισμός που θα μπορούσε να διαφύγει της παρούσας μεθοδολογίας καθώς και το ότι στην παθογένεια των δυσπλασιών του εγκεφαλικού φλοιού συχνά εμπλέκονται γονίδια όπως οι τουμπουλίνες (*TUBB2A*, *TUBB2B*) οι οποίες λόγω μεγάλης ομολογίας μπορούν να οδηγήσουν σε μη ανίχνευση παραλλαγών εξαιτίας εσφαλμένης στοίχισης των εξαχθέντων αναγνώσεων.

Γράφημα 10: Διαγνωστική απόδοση αλληλούχησης επόμενης γενιάς ανά τύπο επιληπτικού συνδρόμου στα πλαίσια της παρούσας μελέτης.



Η αποκάλυψη εκ νέου παραλλαγών σε οικογένειες που μελετώνται με αυτήν την τεχνολογία αναμένεται να αυξήσει το ποσοστό διάγνωσης χωρίς ωστόσο να σημαίνει ότι κάθε *de novo* παραλλαγή στον ασθενή, σε γονίδιο μη συσχετιζόμενο μέχρι στιγμής με αυτήν την κλινική εικόνα, μπορεί να θεωρηθεί αυτόματα αιτιοπαθολογική, καθώς στον γενικό πληθυσμό παρατηρείται τουλάχιστον μία *de novo* παραλλαγή στην κωδικοποιούσα αλληλουχία γονιδίου με μη περιγεγραμμένο φαινότυπο [293].

Αν και οι *de novo* παραλλαγές παρατηρούνται συχνότερα σε ασθενείς με αναπτυξιακές και επιληπτικές εγκεφαλοπάθειες, σε ένα ποσοστό ~13% η γενετική αιτιολογία μπορεί να αποδίδεται σε γονίδια με αυτοσωμικό υπολειπόμενο πρότυπο κληρονομησης όπως έχει παρατηρηθεί σε πληθυσμιακές μελέτες με ύπαρξη συγγένειας [65]. Στην παρούσα μελέτη 10 ασθενείς διαγνώσθηκαν με αυτοσωμικά υπολειπόμενα νοσήματα που οδηγούν στην εμφάνιση σπασμών (15,62%, 10/64). Ωστόσο και άλλοι μηχανισμοί μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση αυτοσωμικών υπολειπόμενων ΑΕΕ όπως η μονογονεϊκή δισωμία ή *de novo* παραλλαγές με ταυτόχρονη συνύπαρξη κληρονομούμενης παραλλαγής [290].

Οφέλη από τη διάγνωση ασθενών με ΑΕΕ με χρήση NGS

Η ύπαρξη γενετικής διάγνωσης μπορεί να ωφελήσει στην εξατομικευμένη θεραπεία του ασθενούς, στην αποφυγή περαιτέρω χρονοβόρων και ακριβών εξετάσεων, στην καλύτερη διαχείριση πιθανών επιπλοκών του εκάστοτε συνδρόμου, στον οικογενειακό προγραμματισμό με εφαρμογή προγεννητικής ή προεμφυτευτικής διάγνωσης καθώς και μελέτη των υπολοίπων μελών της οικογένειας για ανίχνευση φορέων [288]. Η ταυτοποίηση της μοριακής βλάβης επιτρέπει στις οικογένειες να αναζητήσουν ομάδες στήριξης εξειδικευμένες στην εκάστοτε πάθηση, και τις επακόλουθες καθημερινές δυσκολίες καθώς για την καταγραφή σε διεθνείς βάσεις με στόχο μελλοντικές πιθανές θεραπείες. Επιπρόσθετα έχει επιτρέψει τη διάγνωση άτυπων μορφών ήδη γνωστών συνδρόμων καθώς και ανίχνευση νέων (*novel*) παραλλαγών σε γονίδια που συσχετίστηκαν πρόσφατα με σύνδρομα. Αυτή η δυνατότητα πιθανώς να μην είναι εφικτή σε άτομα που εξετάζονται μέσω πάνελ τα οποία περιέχουν μικρό αριθμό γονιδίων [294].

Ακόμα και στην περίπτωση μη διάγνωσης την στιγμή διεξαγωγής του NGS τα δεδομένα πάντα θα είναι διαθέσιμα για επανανάλυση καθώς με την πάροδο του χρόνου υπάρχει συνεχής αύξηση της γνώσης της λειτουργίας γονιδίων και των φαινοτύπων που μπορούν να αποδοθούν σε αυτά καθώς και στην περίπτωση αποκάλυψης παραλλαγών αβέβαιης κλινικής σημασίας όπου μπορεί μελλοντικά να αναφερθεί ασθενής με παρόμοια κλινική εικόνα και όμοια γενετική βλάβη στη διεθνή βιβλιογραφία [4].

Μειονεκτήματα από τη χρήση NGS

Αν και είναι σημαντική η συνεισφορά του WES στην διάγνωση των επιληπτικών συνδρόμων δεν είναι μια μέθοδος χωρίς μειονεκτήματα. Αρχικά ο μεγάλος αριθμός παραλλαγών αβέβαιης κλινικής σημασίας οδηγεί στην ανάγκη στοχευμένης μελέτης δειγμάτων της οικογένειας η οποία είναι χρονοβόρα και δαπανηρή. Ακόμα και αν επιτευχθεί η οικογενειακή μελέτη αν πχ το εύρημα είναι σε ένα γονίδιο με ποικίλη εκφραστικότητα και διεισδυτικότητα το γεγονός ότι την φέρει ένας ασυμπτωματικός γονέας οδηγεί στην ανάγκη λειτουργικών μελετών οι οποίες μπορεί να μην είναι εφικτές εξαιτίας κόστους ή εργαστηριακών δυσκολιών. Επιπρόσθετα η κάλυψη των εξονικών περιοχών δεν είναι απόλυτη οπότε μπορούν να διαφύγουν παραλλαγές που είναι απόρροια χαμηλού ποσοστού μωσαϊκισμού.

Η ύπαρξη τυχαίων ή δευτερευόντων ευρημάτων καθώς και η πιθανή αναφορά τους στην τελική έκθεση αποτελεσμάτων ενέχει κινδύνους σε σχέση με το εάν μελλοντικά θα μπορούσε να συσχετισθεί με την κλινική εικόνα του ασθενούς ή αφορά ένα νόσημα με όψιμη ηλικία έναρξης συμπτωμάτων για το οποίο ο ασθενής ή η οικογένειά του δεν επιθυμεί να γνωρίζει την ύπαρξή του [4].

5.3.2 Μελλοντικές προοπτικές

5.3.2.1 Εφαρμογή Whole genome sequencing (WGS) στη διάγνωση ασθενών με AEE

Παρά τη χρήση νεότερων τεχνολογιών όπως το WES στη διάγνωση AEE ένα ποσοστό ασθενών εξακολουθεί να μένει αδιάγνωστο. Το WES εξετάζει ~1% του γονιδιώματος [4] οπότε είναι πιθανή η ύπαρξη βλάβης στο υπόλοιπο ποσοστό του γονιδιώματος που δεν μελετάται. Σε αυτήν την ομάδα η χρήση WGS πιθανώς να οδηγήσει στη γενετική διάγνωση καθότι προσφέρει πλεονεκτήματα σε σχέση με τις ήδη υπάρχουσες

διαγνωστικές μεθόδους. Ειδικότερα παρουσιάζει καλύτερα ποσοστά κάλυψης ειδικά για εξονικές περιοχές με μεγάλο ποσοστό νουκλεοτιδίων GC, ανευρίσκει CNVs πολύ μικρού μεγέθους που μπορεί να μην ανιχνεύονται από άλλες τεχνολογίες όπως ο μοριακός καρυότυπος και παράλληλα μπορεί να ανιχνεύσει χρωμοσωμικές μεταθέσεις ή παραλλαγές εκτός των εξονικών περιοχών οι οποίες ωστόσο μπορούν να επηρεάσουν τη διαδικασία ματίσματος ή την έκφραση ενός γονιδίου. Ωστόσο ακόμα και με αυτήν την τεχνολογία η μοριακή διάγνωση των ασθενών μπορεί να μην επιτευχθεί δεδομένου ότι ο όγκος των δεδομένων που προκύπτει είναι πολύ μεγάλος (~5.000.000 παραλλαγές ανά εξετασθέν δείγμα) [291]. Παράλληλα από δημοσιευμένες μελέτες είναι γνωστό ότι αναμένονται έως και 100 *de novo* παραλλαγές σε μη κωδικοποιούσες περιοχές οι οποίες με βάση τα σημερινά εργαλεία πρόβλεψης παθογνωμικότητας και την υπάρχουσα γνώση για τις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων ίσως να μην μπορούν να αξιολογηθούν τελικά ως προς την επίδραση τους στην ανάπτυξη του φαινοτύπου [65].

Σύγκριση διαγνωστικής απόδοσης WES με WGS

Σύμφωνα με νεότερες μελέτες η επανανάλυση δεδομένων WES φαίνεται να συμβάλει περισσότερο στη διάγνωση των ασθενών σε σχέση με την εφαρμογή WGS. Ειδικότερα 10,5% των ασθενών οι οποίοι αρχικά έλαβαν αρνητική απάντηση [295, 296] διαγνώστηκαν με επανανάλυση των δεδομένων. Επιπρόσθετα η εφαρμογή WGS σε άτομα με ΑΕΕ και αρνητικό αποτέλεσμα WES ή πάνελ γονιδίων κατέδειξε ότι 16 στους 19 ασθενείς θα μπορούσαν να είχαν διαγνωσθεί με επανανάλυση των δεδομένων ή με χρήση WES αντί για πάνελ γονιδίων ενώ ταυτοποιήθηκαν μόλις 3 ασθενείς που έφεραν σύνθετα CNVs τα οποία θα διέφευγαν της διάγνωσης [297].

5.3.2.2 Εφαρμογή Optical genome mapping στη διάγνωση ασθενών με ΑΕΕ

Μία νέα τεχνολογία όπως είναι η οπτική χαρτογράφηση του γονιδιώματος (Optical genome mapping) μπορεί να οδηγήσει στη διάγνωση ασθενών με παραλλαγές αριθμού αντιγράφων (μεγέθους τουλάχιστον 500 βάσεων) ή σύνθετων γενωμικών ανακατατάξεων ή επεκτάσεις επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών [298]. Δεν υπάρχουν ακόμα σαφή δεδομένα για τη διαγνωστική της απόδοση σε μελέτες ασθενών με επιληπτικά σύνδρομα εξαιτίας της χρήσης της κυρίως σε ασθενείς με καρκίνο ή με ευρήματα από τον μοριακό καρυότυπο. Ωστόσο υπάρχουν μεμονωμένες καταγραφές περιπτώσεων όπως αυτή ενός

άρρενα ασθενούς με ΑΕΕ που διαγνώσθηκε με μωσαϊκό έλλειμμα και αναστροφή στην χρωμοσωμική περιοχή που εδράζεται το γονίδιο *CDKL5* [299].

5.3.3 Κλινική αντιμετώπιση επιληπτικών συνδρόμων

5.3.3.1 Κετογόνος δίαιτα

Η κετογόνος δίαιτα αποτελεί, στις περισσότερες μορφές επιληψιών, μια συμπληρωματική θεραπεία για την μείωση της επιληπτικής δραστηριότητας του ασθενούς. Αποτελείται από υψηλή συγκέντρωση λιπαρών οξέων, κυρίως τριγλυκεριδίων μακράς αλύσου, και χαμηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών και υδατανθράκων. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης της δεν είναι γνωστός ωστόσο ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων οδηγεί στην παραγωγή ακετοξικού οξέως το οποίο μπορεί να αντικαταστήσει τη γλυκόζη ως πηγή ενέργειας στο αίμα των ασθενών [97].

5.3.3.2 Χειρουργική της επιληψίας

Με δεδομένο ότι οι διαφορετικές μορφές επιληπτικών συνδρόμων απαιτούν διαφορετική θεραπευτική προσέγγιση, όπως διακοπή καρβαμαζεπίνης σε ασθενείς με διαυλοπάθεια νατρίου, και το γεγονός ότι η χειρουργική αντιμετώπιση των σπασμών σε άτομα με διάγνωση διαυλοπάθειας ή διαταραχών στη συναπτική μεταβίβαση δεν οδηγεί στην καλύτερη ποιότητα ζωής των ασθενών, μελέτες που χρησιμοποίησαν την μοριακή διάγνωση πριν την επιλογή της καταλληλότερης θεραπευτικής προσέγγισης των ασθενών ανέδειξαν καλύτερη μετεγχειρητική πορεία στους ασθενείς όπου πραγματοποιήθηκε επέμβαση και στην πλειοψηφία τους είχαν εστιακή φλοιϊκή δυσπλασία και μοριακή διαταραχή στο μονοπάτι του mTOR[4].

5.3.3.3 Πρόγνωση ασθενών με επιληψία

Η πρόγνωση των ασθενών με επιληψία σύμφωνα με νεότερα βιβλιογραφικά δεδομένα θα μπορούσε να χωριστεί σε τέσσερις κατηγορίες: 1.εξαιρετική πρόγνωση με αυτόματη ύφεση των σπασμών η οποία συνήθως παρατηρείται σε άτομα με αυτοπεριοριζόμενους εστιακούς ή μυοκλονικούς σπασμούς, 2.καλή πρόγνωση σε άτομα των οποίων οι σπασμοί ανταποκρίνονται στην φαρμακευτική αγωγή όπως σε παιδιά με επεισόδια απώλειας συνειδήσεως, 3.αβέβαιη πρόγνωση σε εφήβους με μυοκλονική

επιληψία καθώς και άτομα με εστιακούς σπασμούς και 4.κακή πρόγνωση σε ασθενείς με φαρμακοανθεκτική επιληψία συνοδευόμενη από νευροαναπτυξιακές διαταραχές [1].

Η κλινική διάγνωση επιληπτικού συνδρόμου βασιζόμενη μόνο στην καταγραφή του είδους των σπασμών και των ηλεκτροεγκεφαλογραφικών ευρημάτων σε παιδιατρικούς ασθενείς ενέχει δυσκολίες σε ότι αφορά την ακριβή ταυτοποίηση του νοσήματος, την πρόγνωση ή την πιθανή θεραπεία του. Η ανεύρεση της γενετικής βλάβης επιβεβαιώνει ή αποσαφηνίζει την κατηγοριοποίηση των ασθενών ειδικά σε περιστατικά με σύνθετη κλινική εικόνα. Το κυριότερο όφελος της γενετικής διάγνωσης είναι ο τερματισμός της «διαγνωστικής οδύσσειας» της οικογένειας και η αποφυγή επιπλέον εξετάσεων. Παράλληλα ο συνεχώς αυξανόμενος αριθμός διαγνωσμένων ασθενών μπορεί να παρέχει πληροφορίες για πιθανές συννοσηρότητες που τείνουν να εμφανίζονται με την πάροδο του χρόνου και πιθανές μεθόδους διαχείρισής τους, να οδηγήσει σε καλύτερη αποσαφήνιση των μοριακών μονοπατιών που οδηγούν σε νόσο και σε πιθανές εξατομικευμένες θεραπείες με στόχο την παύση της επιληπτογένεσης από την έναρξή της. Επιπρόσθετα μετά από γενετική συμβουλευτική μπορεί να εκτιμηθεί ο κίνδυνος εμφάνισης του νοσήματος σε άλλο άτομο της οικογένειας, να ανιχνευθούν φορείς και να πραγματοποιηθεί προγεννητικός ή προεμφυτευτικός έλεγχος εφόσον η οικογένεια το επιθυμεί.

Βιβλιογραφία

1. Beghi, E., *The Epidemiology of Epilepsy*. Neuroepidemiology, 2020. **54**(2): p. 185-191.
2. Eltze, C.M., et al., *A population-based study of newly diagnosed epilepsy in infants*. Epilepsia, 2013. **54**(3): p. 437-45.
3. Perucca, P., M. Bahlo, and S.F. Berkovic, *The Genetics of Epilepsy*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2020. **21**: p. 205-230.
4. Moller, R.S., et al., *From next-generation sequencing to targeted treatment of non-acquired epilepsies*. Expert Rev Mol Diagn, 2019. **19**(3): p. 217-228.
5. *An Introduction to the Life and Work of John Hughlings Jackson: Introduction*. Medical History. Supplement, 2007(26): p. 3-34.
6. Fisher, R.S., et al., *ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy*. Epilepsia, 2014. **55**(4): p. 475-82.
7. Scheffer, I.E., et al., *ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology*. Epilepsia, 2017. **58**(4): p. 512-521.
8. Ishida, S., et al., *Mutations of DEPDC5 cause autosomal dominant focal epilepsies*. Nat Genet, 2013. **45**(5): p. 552-5.
9. Fisher, R.S., et al., *Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types*. Epilepsia, 2017. **58**(4): p. 531-542.
10. Trinka, E., et al., *A definition and classification of status epilepticus - Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus*. Epilepsia, 2015.
11. Minardi, C., et al., *Epilepsy in Children: From Diagnosis to Treatment with Focus on Emergency*. 2019. **8**(1).
12. Chen, H. and M.Z. Koubeissi, *Electroencephalography in Epilepsy Evaluation*. Continuum (Minneapolis, Minn), 2019. **25**(2): p. 431-453.
13. Berg, A.T., et al., *Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009*. Epilepsia, 2010. **51**(4): p. 676-85.
14. Scheffer, I.E. and J. Liao, *Deciphering the concepts behind "Epileptic encephalopathy" and "Developmental and epileptic encephalopathy"*. Eur J Paediatr Neurol, 2019.
15. Helbig, I., M. von Deimling, and E.D. Marsh, *Epileptic Encephalopathies as Neurodegenerative Disorders*. Adv Neurobiol, 2017. **15**: p. 295-315.
16. Kato, M. and W.B. Dobyns, *X-linked lissencephaly with abnormal genitalia as a tangential migration disorder causing intractable epilepsy: proposal for a new term, "interneuronopathy"*. J Child Neurol, 2005. **20**(4): p. 392-7.
17. Katsarou, A.M., S.L. Moshé, and A.S. Galanopoulou, *INTERNEURONOPATHIES AND THEIR ROLE IN EARLY LIFE EPILEPSIES AND NEURODEVELOPMENTAL DISORDERS*. Epilepsia Open, 2017. **2**(3): p. 284-306.
18. Ziobro, J. and R.A. Shellhaas, *Neonatal Seizures: Diagnosis, Etiologies, and Management*. Semin Neurol, 2020. **40**(2): p. 246-256.
19. Bartolini, E., et al., *Epilepsy and brain channelopathies from infancy to adulthood*. Neurol Sci, 2020. **41**(4): p. 749-761.
20. Bonnycastle, K., E.C. Davenport, and M.A. Cousin, *Presynaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders: Insights from the synaptic vesicle life cycle*. J Neurochem, 2021. **157**(2): p. 179-207.
21. Jeyabalan, N. and J.P. Clement, *SYNGAP1: Mind the Gap*. Front Cell Neurosci, 2016. **10**: p. 32.
22. Agarwal, M., M.V. Johnston, and C.E. Stafstrom, *SYNGAP1 mutations: Clinical, genetic, and pathophysiological features*. Int J Dev Neurosci, 2019. **78**: p. 65-76.
23. Hirsch, E., et al., *Electroclinical signs of benign neonatal familial convulsions*. Ann Neurol, 1993. **34**(6): p. 835-41.

24. Dehan, M., et al., [*Convulsions in the fifth day of life: a new syndrome?*]. Arch Fr Pediatr, 1977. **34**(8): p. 730-42.
25. Grinton, B.E., et al., *Familial neonatal seizures in 36 families: Clinical and genetic features correlate with outcome*. Epilepsia, 2015. **56**(7): p. 1071-80.
26. Symonds, J.D., et al., *Early childhood epilepsies: epidemiology, classification, aetiology, and socio-economic determinants*. Brain, 2021. **144**(9): p. 2879-2891.
27. Lee, E.H., *Epilepsy syndromes during the first year of life and the usefulness of an epilepsy gene panel*. Korean J Pediatr, 2018. **61**(4): p. 101-107.
28. Reynolds, C., M.D. King, and K.M. Gorman, *The phenotypic spectrum of SCN2A-related epilepsy*. Eur J Paediatr Neurol, 2020. **24**: p. 117-122.
29. Schwarz, N., et al., *Clinical and genetic spectrum of SCN2A-associated episodic ataxia*. Eur J Paediatr Neurol, 2019. **23**(3): p. 438-447.
30. Döring, J.H., et al., *The Phenotypic Spectrum of PRRT2-Associated Paroxysmal Neurologic Disorders in Childhood*. Biomedicines, 2020. **8**(11).
31. Landolfi, A., P. Barone, and R. Erro, *The Spectrum of PRRT2-Associated Disorders: Update on Clinical Features and Pathophysiology*. Front Neurol, 2021. **12**: p. 629747.
32. Yang, L., et al., *Novel and de novo point and large microdeletion mutation in PRRT2-related epilepsy*. Brain Behav, 2020. **10**(5): p. e01597.
33. Scheffer, I.E. and S.F. Berkovic, *Generalized epilepsy with febrile seizures plus. A genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes*. Brain, 1997. **120** (Pt 3): p. 479-90.
34. Scheffer, I.E. and R. Nabbout, *SCN1A-related phenotypes: Epilepsy and beyond*. Epilepsia, 2019. **60** Suppl 3: p. S17-s24.
35. Aicardi, J. and F. Goutieres, [*Neonatal myoclonic encephalopathy (author's transl)*]. Rev Electroencephalogr Neurophysiol Clin, 1978. **8**(1): p. 99-101.
36. Noh, G.J., Y. Jane Tavyev Asher, and J.M. Graham, Jr., *Clinical review of genetic epileptic encephalopathies*. Eur J Med Genet, 2012. **55**(5): p. 281-98.
37. Amzica, F., *Basic physiology of burst-suppression*. Epilepsia, 2009. **50** Suppl 12: p. 38-9.
38. Beal, J.C., K. Cherian, and S.L. Moshe, *Early-onset epileptic encephalopathies: Ohtahara syndrome and early myoclonic encephalopathy*. Pediatr Neurol, 2012. **47**(5): p. 317-23.
39. Lee, S., et al., *Genetic diagnosis and clinical characteristics by etiological classification in early-onset epileptic encephalopathy with burst suppression pattern*. Epilepsy Res, 2020. **163**: p. 106323.
40. Hussain, S.A., *Epileptic Encephalopathies*. Continuum (Minneapolis, Minn), 2018. **24**(1, Child Neurology): p. 171-185.
41. Mills, P.B., et al., *Genotypic and phenotypic spectrum of pyridoxine-dependent epilepsy (ALDH7A1 deficiency)*. Brain, 2010. **133**(Pt 7): p. 2148-59.
42. Darin, N., et al., *Mutations in PROSC Disrupt Cellular Pyridoxal Phosphate Homeostasis and Cause Vitamin-B(6)-Dependent Epilepsy*. Am J Hum Genet, 2016. **99**(6): p. 1325-1337.
43. Plecko, B., *Pyridoxine and pyridoxalphosphate-dependent epilepsies*. Handb Clin Neurol, 2013. **113**: p. 1811-7.
44. Coughlin, C.R., 2nd, et al., *Consensus guidelines for the diagnosis and management of pyridoxine-dependent epilepsy due to α -aminoacidic semialdehyde dehydrogenase deficiency*. J Inherit Metab Dis, 2021. **44**(1): p. 178-192.
45. Jiao, X., et al., *Clinical and genetic features in pyridoxine-dependent epilepsy: a Chinese cohort study*. Dev Med Child Neurol, 2020. **62**(3): p. 315-321.
46. Mills, P.B., et al., *Epilepsy due to PNPO mutations: genotype, environment and treatment affect presentation and outcome*. Brain, 2014. **137**(Pt 5): p. 1350-60.
47. Yamatogi, Y. and S. Ohtahara, *Early-infantile epileptic encephalopathy with suppression-bursts, Ohtahara syndrome; its overview referring to our 16 cases*. Brain Dev, 2002. **24**(1): p. 13-23.

48. Radaelli, G., et al., *Causes of mortality in early infantile epileptic encephalopathy: A systematic review*. *Epilepsy Behav*, 2018. **85**: p. 32-36.
49. Ohtahara, S. and Y. Yamatogi, *Ohtahara syndrome: with special reference to its developmental aspects for differentiating from early myoclonic encephalopathy*. *Epilepsy Res*, 2006. **70 Suppl 1**: p. S58-67.
50. Friocourt, G. and J.G. Parnavelas, *Mutations in ARX Result in Several Defects Involving GABAergic Neurons*. *Front Cell Neurosci*, 2010. **4**: p. 4.
51. Gürsoy, S. and D. Erçal, *Diagnostic Approach to Genetic Causes of Early-Onset Epileptic Encephalopathy*. *J Child Neurol*, 2016. **31**(4): p. 523-32.
52. Sherr, E.H., *The ARX story (epilepsy, mental retardation, autism, and cerebral malformations): one gene leads to many phenotypes*. *Curr Opin Pediatr*, 2003. **15**(6): p. 567-71.
53. Shoubridge, C., T. Fullston, and J. Gécz, *ARX spectrum disorders: making inroads into the molecular pathology*. *Hum Mutat*, 2010. **31**(8): p. 889-900.
54. Bruyere, H., et al., *Confirmation of linkage in X-linked infantile spasms (West syndrome) and refinement of the disease locus to Xp21.3-Xp22.1*. *Clin Genet*, 1999. **55**(3): p. 173-81.
55. Strømme, P., et al., *Mutations in the human ortholog of Aristaless cause X-linked mental retardation and epilepsy*. *Nat Genet*, 2002. **30**(4): p. 441-5.
56. Bienvenu, T., et al., *ARX, a novel Prd-class-homeobox gene highly expressed in the telencephalon, is mutated in X-linked mental retardation*. *Hum Mol Genet*, 2002. **11**(8): p. 981-91.
57. Turner, G., et al., *Variable expression of mental retardation, autism, seizures, and dystonic hand movements in two families with an identical ARX gene mutation*. *Am J Med Genet*, 2002. **112**(4): p. 405-11.
58. Scheffer, I.E., et al., *X-linked myoclonic epilepsy with spasticity and intellectual disability: mutation in the homeobox gene ARX*. *Neurology*, 2002. **59**(3): p. 348-56.
59. Suri, M., et al., *Protein structure and phenotypic analysis of pathogenic and population missense variants in STXBP1*. *Mol Genet Genomic Med*, 2017. **5**(5): p. 495-507.
60. Saitsu, H., et al., *De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy*. *Nat Genet*, 2008. **40**(6): p. 782-8.
61. Stamberger, H., et al., *STXBP1 encephalopathy: A neurodevelopmental disorder including epilepsy*. *Neurology*, 2016. **86**(10): p. 954-62.
62. Lim, C.X., et al., *KCNT1 mutations in seizure disorders: the phenotypic spectrum and functional effects*. *J Med Genet*, 2016. **53**(4): p. 217-25.
63. Pavone, P., et al., *West syndrome: a comprehensive review*. 2020.
64. Wang, Q.H., et al., *Phenotypic characterization of COL4A1-related West syndrome*. *Epilepsy Res*, 2020. **164**: p. 106349.
65. Happ, H.C. and G.L. Carvill, *A 2020 View on the Genetics of Developmental and Epileptic Encephalopathies*. 2020. **20**(2): p. 90-96.
66. Specchio, N. and P. Curatolo, *Developmental and epileptic encephalopathies: what we do and do not know*. *Brain*, 2021. **144**(1): p. 32-43.
67. Zhu, Y.C. and Z.Q. Xiong, *Molecular and Synaptic Bases of CDKL5 Disorder*. *Dev Neurobiol*, 2019. **79**(1): p. 8-19.
68. Bahi-Buisson, N. and T. Bienvenu, *CDKL5-Related Disorders: From Clinical Description to Molecular Genetics*. *Mol Syndromol*, 2012. **2**(3-5): p. 137-152.
69. Kalscheuer, V.M., et al., *Disruption of the serine/threonine kinase 9 gene causes severe X-linked infantile spasms and mental retardation*. *Am J Hum Genet*, 2003. **72**(6): p. 1401-11.

70. Weaving, L.S., et al., *Mutations of CDKL5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation*. Am J Hum Genet, 2004. **75**(6): p. 1079-93.
71. Tao, J., et al., *Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation*. Am J Hum Genet, 2004. **75**(6): p. 1149-54.
72. Olson, H.E., et al., *Cyclin-Dependent Kinase-Like 5 Deficiency Disorder: Clinical Review*. Pediatr Neurol, 2019. **97**: p. 18-25.
73. Guerrini, R. and E. Parrini, *Epilepsy in Rett syndrome, and CDKL5- and FOXP1-gene-related encephalopathies*. Epilepsia, 2012. **53**(12): p. 2067-78.
74. Hannenhalli, S. and K.H. Kaestner, *The evolution of Fox genes and their role in development and disease*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(4): p. 233-40.
75. Wong, L.C., et al., *FOXP1-Related Syndrome: From Clinical to Molecular Genetics and Pathogenic Mechanisms*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(17).
76. Shoichet, S.A., et al., *Haploinsufficiency of novel FOXP1B variants in a patient with severe mental retardation, brain malformations and microcephaly*. Hum Genet, 2005. **117**(6): p. 536-44.
77. Petersen, T.N., et al., *SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions*. Nat Methods, 2011. **8**(10): p. 785-6.
78. Dibbens, L.M., et al., *X-linked protocadherin 19 mutations cause female-limited epilepsy and cognitive impairment*. Nat Genet, 2008. **40**(6): p. 776-81.
79. Niazi, R., et al., *A mutation update for the PCDH19 gene causing early-onset epilepsy in females with an unusual expression pattern*. Hum Mutat, 2019. **40**(3): p. 243-257.
80. Kolc, K.L., et al., *PCDH19 Pathogenic Variants in Males: Expanding the Phenotypic Spectrum*. Adv Exp Med Biol, 2020. **1298**: p. 177-187.
81. Trivisano, M., et al., *Defining the electroclinical phenotype and outcome of PCDH19-related epilepsy: A multicenter study*. Epilepsia, 2018. **59**(12): p. 2260-2271.
82. Chemaly, N., et al., *Early and long-term electroclinical features of patients with epilepsy and PCDH19 mutation*. Epileptic Disord, 2018. **20**(6): p. 457-467.
83. Kolic, I., et al., *GLUT1 Deficiency Syndrome-Early Treatment Maintains Cognitive Development? (Literature Review and Case Report)*. Genes (Basel), 2021. **12**(9).
84. Yu, M., et al., *A Challenging Diagnosis of Atypical Glut1-DS: A Case Report and Literature Review*. Front Neurol, 2020. **11**: p. 549331.
85. Klepper, J., et al., *Glut1 Deficiency Syndrome (Glut1DS): State of the art in 2020 and recommendations of the international Glut1DS study group*. Epilepsia Open, 2020. **5**(3): p. 354-365.
86. Klepper, J., et al., *GLUT1 deficiency with delayed myelination responding to ketogenic diet*. Pediatr Neurol, 2007. **37**(2): p. 130-3.
87. Leen, W.G., et al., *Child neurology: differential diagnosis of a low CSF glucose in children and young adults*. Neurology, 2013. **81**(24): p. e178-81.
88. Gokben, S., et al., *Targeted next generation sequencing: the diagnostic value in early-onset epileptic encephalopathy*. Acta Neurol Belg, 2017. **117**(1): p. 131-138.
89. Mei, D., et al., *The Impact of Next-Generation Sequencing on the Diagnosis and Treatment of Epilepsy in Paediatric Patients*. Mol Diagn Ther, 2017. **21**(4): p. 357-373.
90. Allen, N.M., et al., *Genetic potassium channel-associated epilepsies: Clinical review of the K(v) family*. Eur J Paediatr Neurol, 2020. **24**: p. 105-116.
91. Brunklaus, A. and D. Lal, *Sodium channel epilepsies and neurodevelopmental disorders: from disease mechanisms to clinical application*. Dev Med Child Neurol, 2020. **62**(7): p. 784-792.
92. Mei, D., et al., *Dravet syndrome as part of the clinical and genetic spectrum of sodium channel epilepsies and encephalopathies*. Epilepsia, 2019. **60 Suppl 3**: p. S2-s7.

93. Meng, H., et al., *The SCN1A mutation database: updating information and analysis of the relationships among genotype, functional alteration, and phenotype*. Hum Mutat, 2015. **36**(6): p. 573-80.
94. Dravet, C., *The core Dravet syndrome phenotype*. Epilepsia, 2011. **52 Suppl 2**: p. 3-9.
95. Claes, L., et al., *De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy*. Am J Hum Genet, 2001. **68**(6): p. 1327-32.
96. Myers, K.A., D.L. Johnstone, and D.A. Dymont, *Epilepsy genetics: Current knowledge, applications, and future directions*. 2019. **95**(1): p. 95-111.
97. Anwar, A., et al., *Dravet Syndrome: An Overview*. Cureus, 2019. **11**(6): p. e5006.
98. Jansson, J.S., T. Hallböök, and C. Reilly, *Intellectual functioning and behavior in Dravet syndrome: A systematic review*. Epilepsy Behav, 2020. **108**: p. 107079.
99. Wheless, J.W., S.P. Fulton, and B.D. Mudigoudar, *Dravet Syndrome: A Review of Current Management*. Pediatr Neurol, 2020. **107**: p. 28-40.
100. Specchio, N., et al., *Electroencephalographic features in dravet syndrome: five-year follow-up study in 22 patients*. J Child Neurol, 2012. **27**(4): p. 439-44.
101. Zhou, P., et al., *Novel mutations and phenotypes of epilepsy-associated genes in epileptic encephalopathies*. 2018. **17**(8): p. e12456.
102. Zhang, J., et al., *Identifying mutation hotspots reveals pathogenetic mechanisms of KCNQ2 epileptic encephalopathy*. 2020. **10**(1): p. 4756.
103. Hortigüela, M., et al., *Clinical and genetic features of 13 Spanish patients with KCNQ2 mutations*. J Hum Genet, 2017. **62**(2): p. 185-189.
104. Na, J.H., et al., *Targeted gene panel sequencing in early infantile onset developmental and epileptic encephalopathy*. Brain Dev, 2020. **42**(6): p. 438-448.
105. Bonardi, C.M., et al., *KCNT1-related epilepsies and epileptic encephalopathies: phenotypic and mutational spectrum*. Brain, 2021.
106. Barcia, G., et al., *Epilepsy with migrating focal seizures: KCNT1 mutation hotspots and phenotype variability*. Neurol Genet, 2019. **5**(6): p. e363.
107. Gertler, T., et al., *KCNT1-Related Epilepsy*, in *GeneReviews*(®), M.P. Adam, et al., Editors. 1993, University of Washington, Seattle

Copyright © 1993-2020, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.: Seattle (WA).

108. Barcia, G., et al., *De novo gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy*. Nat Genet, 2012. **44**(11): p. 1255-9.
109. Møller, R.S., et al., *Mutations in KCNT1 cause a spectrum of focal epilepsies*. Epilepsia, 2015. **56**(9): p. e114-20.
110. Morin, M., et al., *Novel mutations in the KCNJ10 gene associated to a distinctive ataxia, sensorineural hearing loss and spasticity clinical phenotype*. Neurogenetics, 2020. **21**(2): p. 135-143.
111. Celmina, M., et al., *EAST/SeSAME syndrome: Review of the literature and introduction of four new Latvian patients*. Clin Genet, 2019. **95**(1): p. 63-78.
112. Palmer, E.E., et al., *De novo and inherited mutations in the X-linked gene CLCN4 are associated with syndromic intellectual disability and behavior and seizure disorders in males and females*. Mol Psychiatry, 2018. **23**(2): p. 222-230.
113. Okkenhaug, H., et al., *The human ClC-4 protein, a member of the CLC chloride channel/transporter family, is localized to the endoplasmic reticulum by its N-terminus*. Faseb j, 2006. **20**(13): p. 2390-2.
114. He, H., et al., *The molecular and phenotypic spectrum of CLCN4-related epilepsy*. Epilepsia, 2021. **62**(6): p. 1401-1415.
115. Oguni, H., et al., *Treatment and long-term prognosis of myoclonic-astatic epilepsy of early childhood*. Neuropediatrics, 2002. **33**(3): p. 122-32.

116. Kaminska, A., et al., *Delineation of cryptogenic Lennox-Gastaut syndrome and myoclonic astatic epilepsy using multiple correspondence analysis*. *Epilepsy Res*, 1999. **36**(1): p. 15-29.
117. Jallon, P. and P. Latour, *Epidemiology of idiopathic generalized epilepsies*. *Epilepsia*, 2005. **46 Suppl 9**: p. 10-4.
118. Perucca, E., et al., *Antiepileptic drugs as a cause of worsening seizures*. *Epilepsia*, 1998. **39**(1): p. 5-17.
119. Shorvon, S. and M. Walker, *Status epilepticus in idiopathic generalized epilepsy*. *Epilepsia*, 2005. **46 Suppl 9**: p. 73-9.
120. Knake, S., et al., *Tiagabine-induced absence status in idiopathic generalized epilepsy*. *Seizure*, 1999. **8**(5): p. 314-7.
121. Mantoan, L. and M. Walker, *Treatment options in juvenile myoclonic epilepsy*. *Curr Treat Options Neurol*, 2011. **13**(4): p. 355-70.
122. Thomas, P., L. Valton, and P. Genton, *Absence and myoclonic status epilepticus precipitated by antiepileptic drugs in idiopathic generalized epilepsy*. *Brain*, 2006. **129**(Pt 5): p. 1281-92.
123. de Kovel, C.G., et al., *Recurrent microdeletions at 15q11.2 and 16p13.11 predispose to idiopathic generalized epilepsies*. *Brain*, 2010. **133**(Pt 1): p. 23-32.
124. Mullen, S.A., et al., *Copy number variants are frequent in genetic generalized epilepsy with intellectual disability*. *Neurology*, 2013. **81**(17): p. 1507-14.
125. Licchetta, L., et al., *Sleep-related hypermotor epilepsy: Long-term outcome in a large cohort*. *Neurology*, 2017. **88**(1): p. 70-77.
126. Licchetta, L., et al., *Profile of neuropsychological impairment in Sleep-related Hypermotor Epilepsy*. *Sleep Med*, 2018. **48**: p. 8-15.
127. Derry, C.P., et al., *Severe autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy associated with psychiatric disorders and intellectual disability*. *Epilepsia*, 2008. **49**(12): p. 2125-9.
128. Provini, F., et al., *Nocturnal frontal lobe epilepsy. A clinical and polygraphic overview of 100 consecutive cases*. *Brain*, 1999. **122 (Pt 6)**: p. 1017-31.
129. Scheffer, I.E., et al., *Familial partial epilepsy with variable foci: a new partial epilepsy syndrome with suggestion of linkage to chromosome 2*. *Ann Neurol*, 1998. **44**(6): p. 890-9.
130. Berkovic, S.F., et al., *Familial partial epilepsy with variable foci: clinical features and linkage to chromosome 22q12*. *Epilepsia*, 2004. **45**(9): p. 1054-60.
131. Scheffer, I.E., et al., *Mutations in mammalian target of rapamycin regulator DEPDC5 cause focal epilepsy with brain malformations*. *Ann Neurol*, 2014. **75**(5): p. 782-7.
132. Picard, F., et al., *Dominant partial epilepsies. A clinical, electrophysiological and genetic study of 19 European families*. *Brain*, 2000. **123 (Pt 6)**: p. 1247-62.
133. Callenbach, P.M., et al., *Familial partial epilepsy with variable foci in a Dutch family: clinical characteristics and confirmation of linkage to chromosome 22q*. *Epilepsia*, 2003. **44**(10): p. 1298-305.
134. Scheffer, I.E., et al., *Autosomal dominant frontal epilepsy misdiagnosed as sleep disorder*. *Lancet*, 1994. **343**(8896): p. 515-7.
135. Baldassari, S., et al., *GATOR1 complex: the common genetic actor in focal epilepsies*. *J Med Genet*, 2016. **53**(8): p. 503-10.
136. Carvill, G.L., et al., *Epileptic spasms are a feature of DEPDC5 mTORopathy*. *Neurol Genet*, 2015. **1**(2): p. e17.
137. Liu, L., et al., *DEPDC5 Variants Associated Malformations of Cortical Development and Focal Epilepsy With Febrile Seizure Plus/Febrile Seizures: The Role of Molecular Sub-Regional Effect*. *Front Neurosci*, 2020. **14**: p. 821.

138. Dibbens, L.M., et al., *Mutations in DEPDC5 cause familial focal epilepsy with variable foci*. Nat Genet, 2013. **45**(5): p. 546-51.
139. Bisulli, F., et al., *Epilepsy with auditory features: Long-term outcome and predictors of terminal remission*. Epilepsia, 2018. **59**(4): p. 834-843.
140. Pippucci, T., et al., *Epilepsy with auditory features: A heterogeneous clinico-molecular disease*. Neurol Genet, 2015. **1**(1): p. e5.
141. Nanduri, A.S., et al., *The maestro don Gonzalo Rodríguez-Lafora*. Epilepsia, 2008. **49**(6): p. 943-7.
142. García-Gimeno, M.A., E. Knecht, and P. Sanz, *Lafora Disease: A Ubiquitination-Related Pathology*. Cells, 2018. **7**(8).
143. Haryanya, G., et al., *The rare rs769301934 variant in NHLRC1 is a common cause of Lafora disease in Turkey*. J Hum Genet, 2021. **66**(12): p. 1145-1151.
144. Parihar, R., A. Rai, and S. Ganesh, *Lafora disease: from genotype to phenotype*. J Genet, 2018. **97**(3): p. 611-624.
145. Casciato, S., et al., *Severe and rapidly-progressive Lafora disease associated with NHLRC1 mutation: a case report*. Int J Neurosci, 2017. **127**(12): p. 1150-1153.
146. Villanueva, V., et al., *MRI volumetry and proton MR spectroscopy of the brain in Lafora disease*. Epilepsia, 2006. **47**(4): p. 788-92.
147. Turnbull, J., et al., *Lafora disease*. Epileptic Disord, 2016. **18**(S2): p. 38-62.
148. Hyppönen, J., et al., *Refining the phenotype of Unverricht-Lundborg disease (EPM1): a population-wide Finnish study*. Neurology, 2015. **84**(15): p. 1529-36.
149. Lehesjoki, A.E. and R. Kälviäinen, *Progressive Myoclonic Epilepsy Type 1*, in *GeneReviews*(®), M.P. Adam, et al., Editors. 1993, University of Washington, Seattle

Copyright © 1993-2021, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.: Seattle (WA).

150. Moore, S.J., et al., *The clinical and genetic epidemiology of neuronal ceroid lipofuscinosis in Newfoundland*. Clin Genet, 2008. **74**(3): p. 213-22.
151. Santorelli, F.M., et al., *Molecular epidemiology of childhood neuronal ceroid-lipofuscinosis in Italy*. Orphanet J Rare Dis, 2013. **8**: p. 19.
152. Specchio, N., et al., *Photosensitivity is an early marker of neuronal ceroid lipofuscinosis type 2 disease*. Epilepsia, 2017. **58**(8): p. 1380-1388.
153. *Isolation of a novel gene underlying Batten disease, CLN3. The International Batten Disease Consortium*. Cell, 1995. **82**(6): p. 949-57.
154. Lim, A. and R.H. Thomas, *The mitochondrial epilepsies*. Eur J Paediatr Neurol, 2020. **24**: p. 47-52.
155. Specchio, N., et al., *POLG1-Related Epilepsy: Review of Diagnostic and Therapeutic Findings*. Brain Sci, 2020. **10**(11).
156. Rahman, S. and W.C. Copeland, *POLG-related disorders and their neurological manifestations*. Nat Rev Neurol, 2019. **15**(1): p. 40-52.
157. Ganetzky, R., E.M. McCormick, and M.J. Falk, *Primary Pyruvate Dehydrogenase Complex Deficiency Overview*, in *GeneReviews*(®), M.P. Adam, et al., Editors. 1993, University of Washington, Seattle

Copyright © 1993-2021, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.: Seattle (WA).

158. Leigh, D., *Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1951. **14**(3): p. 216-21.
159. Thorburn, D.R., J. Rahman, and S. Rahman, *Mitochondrial DNA-Associated Leigh Syndrome and NARP*, in *GeneReviews*(®), M.P. Adam, et al., Editors. 1993, University of Washington, Seattle

Copyright © 1993-2021, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.: Seattle (WA).

160. Rahman, S. and D. Thorburn, *Nuclear Gene-Encoded Leigh Syndrome Spectrum Overview*, in *GeneReviews*(®), M.P. Adam, et al., Editors. 1993, University of Washington, Seattle

Copyright © 1993-2021, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.: Seattle (WA).

161. Angelman, H., *'Puppet' Children A Report on Three Cases*. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 1965. **7**(6): p. 681-688.
162. Yang, L., et al., *Genotype-Phenotype Correlations in Angelman Syndrome*. *Genes (Basel)*, 2021. **12**(7).
163. Sidorov, M.S., et al., *Delta rhythmicity is a reliable EEG biomarker in Angelman syndrome: a parallel mouse and human analysis*. *J Neurodev Disord*, 2017. **9**: p. 17.
164. Tzagkaraki, E., et al., *Screening of UBE3A gene in patients referred for Angelman Syndrome*. *Eur J Paediatr Neurol*, 2013. **17**(4): p. 366-73.
165. Amir, R.E., et al., *Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2*. *Nat Genet*, 1999. **23**(2): p. 185-8.
166. Good, K.V., J.B. Vincent, and J. Ausiό, *MeCP2: The Genetic Driver of Rett Syndrome Epigenetics*. *Front Genet*, 2021. **12**: p. 620859.
167. Psoni, S., et al., *MECP2 mutations and clinical correlations in Greek children with Rett syndrome and associated neurodevelopmental disorders*. *Brain Dev*, 2012. **34**(6): p. 487-95.
168. Cutri-French, C., et al., *Comparison of Core Features in Four Developmental Encephalopathies in the Rett Natural History Study*. *Ann Neurol*, 2020. **88**(2): p. 396-406.
169. Fang, X., et al., *Analysis of X-inactivation status in a Rett syndrome natural history study cohort*. *Mol Genet Genomic Med*, 2022. **10**(5): p. e1917.
170. Nissenkorn, A., et al., *Epilepsy in Rett syndrome--lessons from the Rett networked database*. *Epilepsia*, 2015. **56**(4): p. 569-76.
171. Operto, F.F., et al., *Epilepsy and genetic in Rett syndrome: A review*. *Brain Behav*, 2019. **9**(5): p. e01250.
172. Myers, K.A., et al., *Fragile Females: Case Series of Epilepsy in Girls With FMR1 Disruption*. *Pediatrics*, 2019. **144**(3).
173. Cowley, B., et al., *Epileptic Electroencephalography Profile Associates with Attention Problems in Children with Fragile X Syndrome: Review and Case Series*. *Front Hum Neurosci*, 2016. **10**: p. 353.
174. Heard, T.T., et al., *EEG abnormalities and seizures in genetically diagnosed Fragile X syndrome*. *Int J Dev Neurosci*, 2014. **38**: p. 155-60.
175. Goodspeed, K., et al., *Pitt-Hopkins Syndrome: A Review of Current Literature, Clinical Approach, and 23-Patient Case Series*. *J Child Neurol*, 2018. **33**(3): p. 233-244.
176. Matricardi, S., et al., *Epilepsy, electroclinical features, and long-term outcomes in Pitt-Hopkins syndrome due to pathogenic variants in the TCF4 gene*. *Eur J Neurol*, 2021.
177. Zhao, T., et al., *Pitt-Hopkins syndrome: phenotypic and genotypic description of four unrelated patients and structural analysis of corresponding missense mutations*. *Neurogenetics*, 2021. **22**(3): p. 161-169.
178. Mesman, S., R. Bakker, and M.P. Smidt, *Tcf4 is required for correct brain development during embryogenesis*. *Mol Cell Neurosci*, 2020. **106**: p. 103502.
179. Forrest, M.P., et al., *The emerging roles of TCF4 in disease and development*. *Trends Mol Med*, 2014. **20**(6): p. 322-31.
180. Sweetser, D.A., et al., *Pitt-Hopkins Syndrome*, in *GeneReviews*(®), M.P. Adam, et al., Editors. 1993, University of Washington, Seattle

Copyright © 1993-2021, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.: Seattle (WA).

181. Jobling, R., et al., *The collagenopathies: review of clinical phenotypes and molecular correlations*. *Curr Rheumatol Rep*, 2014. **16**(1): p. 394.
182. Nishimura, N., et al., *Expanding the phenotype of COL4A1-related disorders-Four novel variants*. *Brain Dev*, 2020. **42**(9): p. 639-645.
183. Zagaglia, S., et al., *Neurologic phenotypes associated with COL4A1/2 mutations: Expanding the spectrum of disease*. *Neurology*, 2018. **91**(22): p. e2078-e2088.
184. Poirier, K., et al., *CSNK2B splice site mutations in patients cause intellectual disability with or without myoclonic epilepsy*. *Hum Mutat*, 2017. **38**(8): p. 932-941.
185. Li, J., et al., *Germline de novo variants in CSNK2B in Chinese patients with epilepsy*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 17909.
186. Ernst, M.E., et al., *CSNK2B: A broad spectrum of neurodevelopmental disability and epilepsy severity*. *Epilepsia*, 2021. **62**(7): p. e103-e109.
187. Nakashima, M., et al., *Identification of de novo CSNK2A1 and CSNK2B variants in cases of global developmental delay with seizures*. *J Hum Genet*, 2019. **64**(4): p. 313-322.
188. Yang, C.P., et al., *Comprehensive integrative analyses identify GLT8D1 and CSNK2B as schizophrenia risk genes*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 838.
189. Olson, H.E., et al., *A Recurrent De Novo PACS2 Heterozygous Missense Variant Causes Neonatal-Onset Developmental Epileptic Encephalopathy, Facial Dysmorphism, and Cerebellar Dysgenesis*. *Am J Hum Genet*, 2018. **102**(5): p. 995-1007.
190. Terrone, G., et al., *A further contribution to the delineation of epileptic phenotype in PACS2-related syndrome*. *Seizure*, 2020. **79**: p. 53-55.
191. Dentici, M.L., et al., *Expanding the clinical spectrum associated with PACS2 mutations*. *Clin Genet*, 2019. **95**(4): p. 525-531.
192. Sousa, S.B. and R.C. Hennekam, *Phenotype and genotype in Nicolaiides-Baraitser syndrome*. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2014. **166c**(3): p. 302-14.
193. Hofmeister, B., et al., *Epilepsy in Nicolaiides-Baraitser Syndrome: Review of Literature and Report of 25 Patients Focusing on Treatment Aspects*. *Neuropediatrics*, 2021. **52**(2): p. 109-122.
194. Inuzuka, L.M., et al., *ATP6V1B2-related epileptic encephalopathy*. *Epileptic Disord*, 2020. **22**(3): p. 317-322.
195. Yuan, Y., et al., *De novo mutation in ATP6V1B2 impairs lysosome acidification and causes dominant deafness-onychodystrophy syndrome*. *Cell Res*, 2014. **24**(11): p. 1370-3.
196. Zádori, D., et al., *Clinicopathological Relationships in an Aged Case of DOORS Syndrome With a p.Arg506X Mutation in the ATP6V1B2 Gene*. *Front Neurol*, 2020. **11**: p. 767.
197. Beauregard-Lacroix, E., et al., *DOORS syndrome and a recurrent truncating ATP6V1B2 variant*. *Genet Med*, 2021. **23**(1): p. 149-154.
198. Kortüm, F., et al., *Mutations in KCNH1 and ATP6V1B2 cause Zimmermann-Laband syndrome*. *Nat Genet*, 2015. **47**(6): p. 661-7.
199. Popp, B., et al., *Exome Pool-Seq in neurodevelopmental disorders*. *Eur J Hum Genet*, 2017. **25**(12): p. 1364-1376.
200. Shaw, M., et al., *EXOME REPORT: Novel mutation in ATP6V1B2 segregating with autosomal dominant epilepsy, intellectual disability and mild gingival and nail abnormalities*. *Eur J Med Genet*, 2020. **63**(4): p. 103799.
201. Zhao, W., et al., *A subunit of V-ATPases, ATP6V1B2, underlies the pathology of intellectual disability*. *EBioMedicine*, 2019. **45**: p. 408-421.
202. Hunt, D., et al., *Whole exome sequencing in family trios reveals de novo mutations in PURA as a cause of severe neurodevelopmental delay and learning disability*. *J Med Genet*, 2014. **51**(12): p. 806-13.

203. Reijnders, M.R.F., et al., *PURA syndrome: clinical delineation and genotype-phenotype study in 32 individuals with review of published literature*. J Med Genet, 2018. **55**(2): p. 104-113.
204. Lalani, S.R., et al., *Mutations in PURA cause profound neonatal hypotonia, seizures, and encephalopathy in 5q31.3 microdeletion syndrome*. Am J Hum Genet, 2014. **95**(5): p. 579-83.
205. Reijnders, M.R.F., et al., *PURA-Related Neurodevelopmental Disorders*, in *GeneReviews*(®), M.P. Adam, et al., Editors. 1993, University of Washington, Seattle

Copyright © 1993-2021, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.: Seattle (WA).

206. Bramswig, N.C., et al., *Heterozygous HNRNPU variants cause early onset epilepsy and severe intellectual disability*. Hum Genet, 2017. **136**(7): p. 821-834.
207. Leduc, M.S., et al., *Clinical and molecular characterization of de novo loss of function variants in HNRNPU*. Am J Med Genet A, 2017. **173**(10): p. 2680-2689.
208. Durkin, A., et al., *Clinical findings of 21 previously unreported probands with HNRNPU-related syndrome and comprehensive literature review*. Am J Med Genet A, 2020. **182**(7): p. 1637-1654.
209. Song, Z., et al., *De novo frameshift variants of HNRNPU in patients with early infantile epileptic encephalopathy: Two case reports and literature review*. Int J Dev Neurosci, 2021. **81**(7): p. 663-668.
210. Mewar, R., et al., *Molecular cytogenetic determination of a deletion/duplication of 1q that results in a trisomy 18 syndrome-like phenotype*. Am J Med Genet, 1994. **52**(2): p. 178-83.
211. Thierry, G., et al., *Molecular characterization of 1q44 microdeletion in 11 patients reveals three candidate genes for intellectual disability and seizures*. Am J Med Genet A, 2012. **158a**(7): p. 1633-40.
212. Depienne, C., et al., *Genetic and phenotypic dissection of 1q43q44 microdeletion syndrome and neurodevelopmental phenotypes associated with mutations in ZBTB18 and HNRNPU*. Hum Genet, 2017. **136**(4): p. 463-479.
213. Vlaskamp, D.R.M., et al., *SYNGAP1 encephalopathy: A distinctive generalized developmental and epileptic encephalopathy*. Neurology, 2019. **92**(2): p. e96-e107.
214. Voisin, N., et al., *Variants in the degron of AFF3 are associated with intellectual disability, mesomelic dysplasia, horseshoe kidney, and epileptic encephalopathy*. Am J Hum Genet, 2021. **108**(5): p. 857-873.
215. Steichen-Gersdorf, E., et al., *Triangular tibia with fibular aplasia associated with a microdeletion on 2q11.2 encompassing LAF4*. Clin Genet, 2008. **74**(6): p. 560-5.
216. Shimizu, D., et al., *De novo AFF3 variant in a patient with mesomelic dysplasia with foot malformation*. J Hum Genet, 2019. **64**(10): p. 1041-1044.
217. Bursztejn, A.C., et al., *Unusual cutaneous features associated with a heterozygous gain-of-function mutation in IFIH1: overlap between Aicardi-Goutières and Singleton-Merten syndromes*. Br J Dermatol, 2015. **173**(6): p. 1505-13.
218. Rice, G.I., et al., *Genetic and phenotypic spectrum associated with IFIH1 gain-of-function*. Hum Mutat, 2020. **41**(4): p. 837-849.
219. Zaki, M., et al., *Recurrent and Prolonged Infections in a Child with a Homozygous IFIH1 Nonsense Mutation*. Front Genet, 2017. **8**: p. 130.
220. Rice, G.I., et al., *Gain-of-function mutations in IFIH1 cause a spectrum of human disease phenotypes associated with upregulated type I interferon signaling*. Nat Genet, 2014. **46**(5): p. 503-509.
221. Dimitriou, E., et al., *The Spectrum of Krabbe Disease in Greece: Biochemical and Molecular Findings*. JIMD Rep, 2016. **25**: p. 57-64.
222. Jain, M. and O. De Jesus, *Krabbe Disease*, in *StatPearls*. 2021, StatPearls Publishing

Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).

223. Chen, T., et al., *Genetic and epigenetic mechanisms of epilepsy: a review*. Neuropsychiatr Dis Treat, 2017. **13**: p. 1841-1859.
224. Fallah, M.S., et al., *Impaired Regulation of Histone Methylation and Acetylation Underlies Specific Neurodevelopmental Disorders*. Front Genet, 2020. **11**: p. 613098.
225. Hebbar, M. and H.C. Mefford, *Recent advances in epilepsy genomics and genetic testing*. 2020. **9**.
226. Riggs, E.R., et al., *Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen)*. Genet Med, 2020. **22**(2): p. 245-257.
227. Riggs, E.R., et al., *Correction: Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen)*. Genet Med, 2021. **23**(11): p. 2230.
228. Lu, Y., et al. *Next Generation Sequencing in Aquatic Models*. 2016.
229. Desvignes, J.P., et al., *VarAFT: a variant annotation and filtration system for human next generation sequencing data*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(W1): p. W545-w553.
230. Richards, S., et al., *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*. Genet Med, 2015. **17**(5): p. 405-24.
231. Archer, H.L., et al., *Gross rearrangements of the MECP2 gene are found in both classical and atypical Rett syndrome patients*. J Med Genet, 2006. **43**(5): p. 451-6.
232. Fehr, S., et al., *There is variability in the attainment of developmental milestones in the CDKL5 disorder*. J Neurodev Disord, 2015. **7**(1): p. 2.
233. Rodgers, J., et al., *A novel ARX loss of function variant in female monozygotic twins is associated with chorea*. Eur J Med Genet, 2021. **64**(11): p. 104315.
234. Euro, L., et al., *Atomistic Molecular Dynamics Simulations of Mitochondrial DNA Polymerase γ : Novel Mechanisms of Function and Pathogenesis*. Biochemistry, 2017. **56**(9): p. 1227-1238.
235. Lemke, J.R., et al., *Targeted next generation sequencing as a diagnostic tool in epileptic disorders*. Epilepsia, 2012. **53**(8): p. 1387-98.
236. Al Yazidi, G., M.I. Shevell, and M. Srour, *Two Novel KCNQ2 Mutations in 2 Families With Benign Familial Neonatal Convulsions*. Child Neurol Open, 2017. **4**: p. 2329048x17691396.
237. Vanmolkot, K.R., et al., *Novel mutations in the Na⁺, K⁺-ATPase pump gene ATP1A2 associated with familial hemiplegic migraine and benign familial infantile convulsions*. Ann Neurol, 2003. **54**(3): p. 360-6.
238. Castro, M.J., et al., *Recurrent ATP1A2 mutations in Portuguese families with familial hemiplegic migraine*. J Hum Genet, 2007. **52**(12): p. 990-998.
239. Capendeguy, O. and J.D. Horisberger, *Functional effects of Na⁺,K⁺-ATPase gene mutations linked to familial hemiplegic migraine*. Neuromolecular Med, 2004. **6**(2-3): p. 105-16.
240. Zhu, B., et al., *Functional analysis of epilepsy-associated variants in STXBP1/Munc18-1 using humanized Caenorhabditis elegans*. Epilepsia, 2020. **61**(4): p. 810-821.
241. Hardies, K., et al., *Recessive loss-of-function mutations in AP4S1 cause mild fever-sensitive seizures, developmental delay and spastic paraplegia through loss of AP-4 complex assembly*. Hum Mol Genet, 2015. **24**(8): p. 2218-27.
242. Vill, K., et al., *A homozygous splice variant in AP4S1 mimicking neurodegeneration with brain iron accumulation*. Mov Disord, 2017. **32**(5): p. 797-799.

243. Kaymakcalan, H., et al., *Novel compound heterozygous mutations in GPT2 linked to microcephaly, and intellectual developmental disability with or without spastic paraplegia*. Am J Med Genet A, 2018. **176**(2): p. 421-425.
244. Warner, T.T., A. Granata, and G. Schiavo, *TorsinA and DYT1 dystonia: a synaptopathy?* Biochem Soc Trans, 2010. **38**(2): p. 452-6.
245. Kariminejad, A., et al., *TOR1A variants cause a severe arthrogyriposis with developmental delay, strabismus and tremor*. Brain, 2017. **140**(11): p. 2851-2859.
246. Isik, E., et al., *Biallelic TOR1A mutations cause severe arthrogyriposis: A case requiring reverse phenotyping*. Eur J Med Genet, 2019. **62**(9): p. 103544.
247. Chen, J., et al., *Cardio-facio-cutaneous syndrome-associated pathogenic MAP2K1 variants activate autophagy*. Gene, 2020. **733**: p. 144369.
248. Pernice, H.F., et al., *mTOR and MAPK: from localized translation control to epilepsy*. BMC Neurosci, 2016. **17**(1): p. 73.
249. Chatron, N., et al., *The epilepsy phenotypic spectrum associated with a recurrent CUX2 variant*. Ann Neurol, 2018. **83**(5): p. 926-934.
250. Suzuki, T., et al., *CUX2 deficiency causes facilitation of excitatory synaptic transmission onto hippocampus and increased seizure susceptibility to kainate*. Sci Rep, 2022. **12**(1): p. 6505.
251. Stephenson, J.D., et al., *VarMap: a web tool for mapping genomic coordinates to protein sequence and structure and retrieving protein structural annotations*. Bioinformatics, 2019. **35**(22): p. 4854-4856.
252. Veltra, D., et al., *A novel pathogenic ATP6V1B2 variant: Widening the genotypic spectrum of the epileptic neurodevelopmental phenotype*. Am J Med Genet A, 2022.
253. Cavallin, M., et al., *Further refinement of COL4A1 and COL4A2 related cortical malformations*. Eur J Med Genet, 2018. **61**(12): p. 765-772.
254. Sutherland, H.G. and L.R. Griffiths, *Genetics of Migraine: Insights into the Molecular Basis of Migraine Disorders*. Headache, 2017. **57**(4): p. 537-569.
255. Chen, B.S., et al., *CADASIL presenting with focal and generalised epilepsy due to a novel NOTCH3 mutation*. Seizure, 2019. **66**: p. 36-38.
256. Kolc, K.L., et al., *A systematic review and meta-analysis of 271 PCDH19-variant individuals identifies psychiatric comorbidities, and association of seizure onset and disease severity*. Mol Psychiatry, 2019. **24**(2): p. 241-251.
257. Shanske, S., et al., *The G13513A mutation in the ND5 gene of mitochondrial DNA as a common cause of MELAS or Leigh syndrome: evidence from 12 cases*. Arch Neurol, 2008. **65**(3): p. 368-72.
258. Ballardini, D., et al., *Comparing Two Neurodevelopmental Disorders Linked to CK2: Okur-Chung Neurodevelopmental Syndrome and Poirier-Bienvenu Neurodevelopmental Syndrome-Two Sides of the Same Coin?* Front Mol Biosci, 2022. **9**: p. 850559.
259. Forrest, M., et al., *Functional analysis of TCF4 missense mutations that cause Pitt-Hopkins syndrome*. Hum Mutat, 2012. **33**(12): p. 1676-86.
260. Arboleda, V.A., et al., *De novo nonsense mutations in KAT6A, a lysine acetyltransferase gene, cause a syndrome including microcephaly and global developmental delay*. Am J Hum Genet, 2015. **96**(3): p. 498-506.
261. Tham, E., et al., *Dominant mutations in KAT6A cause intellectual disability with recognizable syndromic features*. Am J Hum Genet, 2015. **96**(3): p. 507-13.
262. Kennedy, J., et al., *KAT6A Syndrome: genotype-phenotype correlation in 76 patients with pathogenic KAT6A variants*. Genet Med, 2019. **21**(4): p. 850-860.
263. Li, L., et al., *Lysine acetyltransferase 8 is involved in cerebral development and syndromic intellectual disability*. J Clin Invest, 2020. **130**(3): p. 1431-1445.

264. Bryant, L., et al., *Histone H3.3 beyond cancer: Germline mutations in Histone 3 Family 3A and 3B cause a previously unidentified neurodegenerative disorder in 46 patients.* Sci Adv, 2020. **6**(49).
265. Bosch, D.G., et al., *NR2F1 mutations cause optic atrophy with intellectual disability.* Am J Hum Genet, 2014. **94**(2): p. 303-9.
266. Rech, M.E., et al., *Phenotypic expansion of Bosch-Boonstra-Schaaf optic atrophy syndrome and further evidence for genotype-phenotype correlations.* Am J Med Genet A, 2020. **182**(6): p. 1426-1437.
267. Mio, C., et al., *Missense NR2F1 variant in monozygotic twins affected with the Bosch-Boonstra-Schaaf optic atrophy syndrome.* Mol Genet Genomic Med, 2020. **8**(7): p. e1278.
268. Sharma, N., K. Bham, and S. Senapati, *Human ankyrins and their contribution to disease biology: An update.* J Biosci, 2020. **45**.
269. Yang, R., et al., *ANK2 autism mutation targeting giant ankyrin-B promotes axon branching and ectopic connectivity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(30): p. 15262-15271.
270. Khan, K., et al., *Recessive variants in ZNF142 cause a complex neurodevelopmental disorder with intellectual disability, speech impairment, seizures, and dystonia.* Genet Med, 2019. **21**(11): p. 2532-2542.
271. Domínguez-Sala, E., et al., *Abnormalities in Cortical GABAergic Interneurons of the Primary Motor Cortex Caused by Lis1 (Pafah1b1) Mutation Produce a Non-drastic Functional Phenotype.* Front Cell Dev Biol, 2022. **10**: p. 769853.
272. Herbst, S.M., et al., *LIS1-associated classic lissencephaly: A retrospective, multicenter survey of the epileptogenic phenotype and response to antiepileptic drugs.* Brain Dev, 2016. **38**(4): p. 399-406.
273. Bahi-Buisson, N., et al., *New insights into genotype-phenotype correlations for the doublecortin-related lissencephaly spectrum.* Brain, 2013. **136**(Pt 1): p. 223-44.
274. Nicita, F., et al., *Epilepsy is a possible feature in Williams-Beuren syndrome patients harboring typical deletions of the 7q11.23 critical region.* Am J Med Genet A, 2016. **170a**(1): p. 148-55.
275. Hegde, A.U., et al., *GABA Transaminase Deficiency With Survival Into Adulthood.* J Child Neurol, 2019. **34**(4): p. 216-220.
276. Swaminathan, A., et al., *Non-canonical mTOR-Independent Role of DEPDC5 in Regulating GABAergic Network Development.* Curr Biol, 2018. **28**(12): p. 1924-1937.e5.
277. Wang, J., et al., *Epilepsy-associated genes.* Seizure, 2017. **44**: p. 11-20.
278. Wang, J.Y., et al., *Screening and identification of novel candidate biomarkers of focal cortical dysplasia type II via bioinformatics analysis.* Childs Nerv Syst, 2022. **38**(5): p. 953-960.
279. Rutsch, F., et al., *A specific IFIH1 gain-of-function mutation causes Singleton-Merten syndrome.* Am J Hum Genet, 2015. **96**(2): p. 275-82.
280. Ding, Y., et al., *Genotype and Phenotype Analysis of Chinese Children With Tuberous Sclerosis Complex: A Pediatric Cohort Study.* Front Genet, 2020. **11**: p. 204.
281. Jiang, C., et al., *WDR73 missense mutation causes infantile onset intellectual disability and cerebellar hypoplasia in a consanguineous family.* Clin Chim Acta, 2017. **464**: p. 24-29.
282. Guo, Y.C., et al., *Spinocerebellar ataxia 35: novel mutations in TGM6 with clinical and genetic characterization.* Neurology, 2014. **83**(17): p. 1554-61.
283. Li, M., et al., *Whole exome sequencing identifies a novel mutation in the transglutaminase 6 gene for spinocerebellar ataxia in a Chinese family.* Clin Genet, 2013. **83**(3): p. 269-73.

284. Pavinato, L., et al., *CAPRIN1 haploinsufficiency causes a neurodevelopmental disorder with language impairment, ADHD and ASD*. *Brain*, 2022.
285. Plecko, B. and P. Mills, *PNPO Deficiency*, in *GeneReviews*(®), M.P. Adam, et al., Editors. 1993, University of Washington, Seattle

Copyright © 1993-2022, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.: Seattle (WA).

286. Rodan, L.H., et al., *Gain-of-function variants in the ODC1 gene cause a syndromic neurodevelopmental disorder associated with macrocephaly, alopecia, dysmorphic features, and neuroimaging abnormalities*. *Am J Med Genet A*, 2018. **176**(12): p. 2554-2560.
287. López-Doménech, G., et al., *The Eutherian Armcx genes regulate mitochondrial trafficking in neurons and interact with Miro and Trak2*. *Nat Commun*, 2012. **3**: p. 814.
288. Kothur, K., et al., *Diagnostic yield of targeted massively parallel sequencing in children with epileptic encephalopathy*. *Seizure*, 2018. **59**: p. 132-140.
289. Palmer, E.E., et al., *Integrating exome sequencing into a diagnostic pathway for epileptic encephalopathy: Evidence of clinical utility and cost effectiveness*. *Mol Genet Genomic Med*, 2018. **6**(2): p. 186-199.
290. Sands, T.T. and H. Choi, *Genetic Testing in Pediatric Epilepsy*. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2017. **17**(5): p. 45.
291. McTague, A., et al., *The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood*. *Lancet Neurol*, 2016. **15**(3): p. 304-16.
292. Krey, I., et al., *Current practice in diagnostic genetic testing of the epilepsies*. *Epileptic Disord*, 2022. **24**(5): p. 1-22.
293. Moller, R.S., H.A. Dahl, and I. Helbig, *The contribution of next generation sequencing to epilepsy genetics*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2015. **15**(12): p. 1531-8.
294. Minardi, R., et al., *Whole-exome sequencing in adult patients with developmental and epileptic encephalopathy: It is never too late*. *Clin Genet*, 2020. **98**(5): p. 477-485.
295. Li, J., et al., *Reanalysis of whole exome sequencing data in patients with epilepsy and intellectual disability/mental retardation*. *Gene*, 2019. **700**: p. 168-175.
296. *The Epilepsy Genetics Initiative: Systematic reanalysis of diagnostic exomes increases yield*. *Epilepsia*, 2019. **60**(5): p. 797-806.
297. Palmer, E.E., et al., *Diagnostic Yield of Whole Genome Sequencing After Nondiagnostic Exome Sequencing or Gene Panel in Developmental and Epileptic Encephalopathies*. *Neurology*, 2021. **96**(13): p. e1770-e1782.
298. Mak, A.C., et al., *Genome-Wide Structural Variation Detection by Genome Mapping on Nanochannel Arrays*. *Genetics*, 2016. **202**(1): p. 351-62.
299. Cope, H., et al., *Detection of a mosaic CDKL5 deletion and inversion by optical genome mapping ends an exhaustive diagnostic odyssey*. *Mol Genet Genomic Med*, 2021. **9**(7): p. e1665.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. Ταξινόμηση επιληπτικών συνδρόμων σύμφωνα με την ηλικία έναρξης των σπασμών

Επιληπτικά σύνδρομα νεογνικής- βρεφικής ηλικίας (0-2 ετών)

Αυτοπεριοριζόμενα επιληπτικά σύνδρομα νεογνικής βρεφικής-ηλικίας

- Αυτοπεριοριζόμενη (Οικογενής) Νεογνική Επιληψία (Self-Limited (Familial) Neonatal Epilepsy, SLFNE)
- Αυτοπεριοριζόμενη (Οικογενής) Νεογνική-Βρεφική Επιληψία (Self-Limited (Familial) Neonatal-Infantile Epilepsy, SLFNIE)
- Αυτοπεριοριζόμενη (Οικογενής) Βρεφική Επιληψία (Self-Limited (Familial) Infantile Epilepsy, SLFIE)
- Γενετική Επιληψία με πυρετικούς σπασμούς + (Genetic Epilepsy with Febrile Seizures +, GEFS+)

Αναπτυξιακές και επιληπτικές εγκεφαλοπάθειες

- Πρώιμη βρεφική αναπτυξιακή και επιληπτική εγκεφαλοπάθεια (Early Infantile Developmental and Epileptic Encephalopathy, EIDEE)
 - Πρώιμη μυοκλονική εγκεφαλοπάθεια (Early Myoclonic Encephalopathy, EME)
 - Πρώιμη βρεφική επιληπτική εγκεφαλοπάθεια (Early Infantile Epileptic Encephalopathy, EIEE)
- Επιληψία της βρεφικής ηλικίας με μεταναστεύοντες εστιακούς σπασμούς (Epilepsy of Infancy with Migrating Focal Seizures, EIMFS)
- Σύνδρομο Βρεφικών σπασμών (Infantile Spasms Syndrome, ISS)
- Σύνδρομο Dravet
- Άλλα σύνδρομα συγκεκριμένης αιτιολογίας (πχ διαυλοπάθειες καλίου)

Επιληπτικά σύνδρομα της παιδικής ηλικίας (2-12 ετών)

Σύνδρομα εστιακής επιληψίας

Σύνδρομα γενικευμένης επιληψίας

Αναπτυξιακές και επιληπτικές εγκεφαλοπάθειες (γενετικής αιτιολογίας)

- Σύνδρομο Lennox-Gastaut
- Αναπτυξιακή και/ή Επιληπτική Εγκεφαλοπάθεια με συνεχείς εκφορτίσεις αιχμής-κύματος στη διάρκεια του ύπνου (Developmental and/or Epileptic Encephalopathy with Spike-Wave Activation in Sleep, D/EE-SWAS)
 - Επιληψία με συνεχείς εκφορτίσεις αιχμής-κύματος στη διάρκεια του βραδέως ύπνου
 - Σύνδρομο Landau Kleffner
- Μυοκλονική ατονική επιληψία (Myoclonic-Atonic Epilepsy, MAE)

Απώλεια συνειδήσεως της παιδικής ηλικίας

Επιληπτικά σύνδρομα με ποικίλη ηλικία έναρξης

Σύνδρομο εστιακής επιληψίας

- Υπερκινητική επιληψία σχετιζόμενη με τον ύπνο (Sleep-related Hypermotor Epilepsy, SHE)
- Οικογενής εστιακή επιληψία με ποικίλες εστίες (Familial Focal Epilepsy with Variable Foci, FFEVF)
- Επιληψία με ακουστικά στοιχεία (Epilepsy with Auditory Features, EAF)

Σύνδρομο γενετικής γενικευμένης επιληψίας

- Αφαιρέσεις της εφηβικής ηλικίας (Juvenile Absence Epilepsy, JAE)
- Μυοκλονική επιληψία της εφηβικής ηλικίας (Juvenile Myoclonic Epilepsy, JME)
- Γενικευμένοι τονικοκλονικοί σπασμοί (Epilepsy with Generalized Tonic-Clonic seizures Alone, GTCA)

Σύνδρομο συνδυασμού γενικευμένης και εστιακής επιληψίας

Αναπτυξιακές και επιληπτικές εγκεφαλοπάθειες

- Προοδευτικές μυοκλονικές επιληψίες (Progressive Myoclonus Epilepsies)

2. Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη των γονιδίων *MECP2*, *FOXG1*, *ARX*, *POLG*, *SCN1A* και *CDKL5*

ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>MECP2</i>	F:εμπρόσθιος εκκινητής, R:ανάστροφος εκκινητής, αναγραφόμενη κατεύθυνση 5' προς 3'
EXON 1	F:GTAAAACGACGGCCAGTATCTCGCCAATTGACGGCATCG R:CAGGAAACAGCTATGACGGTAGAGAGGAGGGACGCCAT
EXON 2	F:GTAAAACGACGGCCAGTCCCAAATAGCCCTGGGAAA R:CAGGAAACAGCTATGACTGGCCAAACCAGGACATATAC
EXON 3	F:GTAAAACGACGGCCAGTAAGATCTGAGTGATGATGGCCTGGG R:CAGGAAACAGCTATGACAAGCACACCTGGTCTCAGTGTTCA
EXON 4.1/4.2	F:GTAAAACGACGGCCAGTTTGTGAGAGCGTTGTACACCACAT R:CAGGAAACAGCTATGACTCCTCTGGGCATCTTCTCCTCTT
EXON 4.3	F:GTAAAACGACGGCCAGTGGGAAAGGACTGAAGACCTGTAAG R:CAGGAAACAGCTATGACCAGTTAATCGGGAAGCTTTGTGAC

ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>FOXG1</i>	F:εμπρόσθιος εκκινητής, R:ανάστροφος εκκινητής, αναγραφόμενη κατεύθυνση 5' προς 3'
EXON 2A	F:GTAAAACGACGGCCAGTTTGCTACATGACTTGCCAG R:CAGGAAACAGCTATGACCCGCTTAGCCCCGTCCA
EXON 2B	F:GTAAAACGACGGCCAGTAGCAGCTGCTGCTCCCGC R:CAGGAAACAGCTATGACTGGAGGTGAGGCGCGCAC
EXON 2C	F:GTAAAACGACGGCCAGTACGTGTTTCATCGGCGGCA R:CAGGAAACAGCTATGACCCAGACAGTCCCGTCGTA
EXON 2D	F:GTAAAACGACGGCCAGTTGCCCTGTGAGCTTTAAGA R:CAGGAAACAGCTATGACCTAGAACCCAATCTTTGGTC

ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ARX	F:εμπρόσθιος εκκλινητής, R:ανάστροφος εκκλινητής, αναγραφόμενη κατεύθυνση 5' προς 3'
EXON 1	F:GTAAAACGACGGCCAGTCTGGCGAGAGCCAATCA R:CAGGAAACAGCTATGACGCAGGCCTCAGAGTTATG
EXON 2A	F:GTAAAACGACGGCCAGTGGCAGCAGCCCTGGCTGG R:CAGGAAACAGCTATGACCGTCGTCCTCGGTGCCGGT
EXON 2B	F:GTAAAACGACGGCCAGTAACGGGGCGCCCTTCGTG R:CAGGAAACAGCTATGACCGTGCCTCTCTGCCGCT
EXON 3	F:GTAAAACGACGGCCAGTTAGCTGAGAGGGCATTGCT R:CAGGAAACAGCTATGACCTGATCCTGCTTCTCTTGG
EXON 4	F:GTAAAACGACGGCCAGTCAAGGGAAGGGACGGGTA R:CAGGAAACAGCTATGACCCCTGTTTGACTCCTGCC
EXON 5	F:GTAAAACGACGGCCAGTAGACGCTGCCCGAGGGCGC R:CAGGAAACAGCTATGACGTGCCACGTCCCGGAGCG

ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ POLG	F:εμπρόσθιος εκκλινητής, R:ανάστροφος εκκλινητής, αναγραφόμενη κατεύθυνση 5' προς 3'
EXON 2	F:CGCAGTAAATGCTCAAGGAA R:CCCGTAACAGGACCTCAGAA
EXON 3	F:CAGTGGTTGTTGTGGAGTGG R:CAGCAAAGGCAACAGAGACA
EXON 4	F:CAAGCATGAACAAGCATGAGG R:AGTCCCAGGATGAGATCTGG
EXONS 5-6	F:CAGAAGTCCCAGAGGAAAGC R:AGCCTAGAAAAGCTAAGGTCC
EXONS 7-8	F:GCTTGCTAAACCAGCTCAGG R:CAATCAGGAGCAGGAGAAGG
EXON 9	F:ATGGGTGGGAGGTAGGGTAG R:GTCCTGAGAATGGAGCAAGG
EXON 10	F:AACAACCTGCCCTTACCATCG R:CCCAGACTCTTGAACCCAAA
EXONS 11-12	F:GAATTGTGGAAGGCACTAGC R:CTGGCTGGGAAGAACTAGG
EXON 13	F:ACAGTTTCAGGCCCTTTTCC R:GCCACCCGACTTTCATTAGA
EXON 14	F:GTCTTAGGGGGCATGTGTGT R:GAAGAGAGGGGAAAGGCATC
EXONS 15-16	F:TGGAGTATAGCAGTCTGG R:ACTAGAGTCCTGCCTGACC
EXONS 17-18	F:GCCATCCCCTCAGGAAAGG R:GGACAGTAAAGCAGGCCTCG
EXONS 19-20	F:GAAGTGATATGTGAACATTCC R:CTACAAACATTGGTAAGGTCC
EXON 21	F:CAGAGTGAAGCTTCTTTGG R:GTCAAAACTGACCAGTCTGG
EXON 22	F:TGCTGGACCTTACCTTTCT R:CTGGACACAGGGCACCTTAT
EXON 23	F:ACATTACGTTTCGTGGCAAT R:ACCTCCTGTGAGTGGGAAAG

ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>SCN1A</i>	F:εμπρόςθιος εκκινήτης, R:ανάστροφος εκκινήτης, αναγραφόμενη κατεύθυνση 5' προς 3'
EXON 3	F:GTAAAACGACGGCCAGTGGAAATTCATATGCAGAATAAATGGT R:GCAGTAGGCAATTAGCAGCA
EXON 4	F:GTAAAACGACGGCCAGTTGATTGTGCTGTTTCTCATTFA R:TGCAAAATGAGAGTGATGAAAA
EXON 5	F:GTAAAACGACGGCCAGTCTGAATTTTGGCTAAGCTG R:ACAGTTTCAAATCCCAAATGT
EXON 6	F:GTAAAACGACGGCCAGTAGGGCTACGTTTCATTTGTATG R:GCACTGATGGAAAACCAAAT
EXON 7	F:GTAAAACGACGGCCAGTCAGCTTTTCTTTGTGTCCTGTT R:TGAAACACCTAGTCTTATGATTCCTG
EXON 8	F:GTAAAACGACGGCCAGTCTCCACTAGCGTTGCAAAACA R:GGATATCCAGCCCCCAAGT
EXON 9	F:GTAAAACGACGGCCAGTCAAATACTTGTGCCTTTGAATGA R:AAAATTAGTTGGCTGTTATCTTCAG
EXON 10	F:GTAAAACGACGGCCAGTAAGGCAGCAGAACGACTTGT R:TTTCATAACTCAATTGGTTTTCTGT
EXON 11	F:GTAAAACGACGGCCAGTTGAAAGTTGAAGCCACCAC R:AAGGTCAGTGCCATGAGACA
EXON 12	F:GTAAAACGACGGCCAGTCTCCAAAAGCCTTCATTAGG R:CCCCTCTCTCCCATGTTTTA
EXON 13	F:GTAAAACGACGGCCAGTTGCAAAATGAAATCACATTCAA R:CCAGCCATGCCTGAACTATT
EXON 14	F:GTAAAACGACGGCCAGTTCACCATTTGGTTGTTTGCT R:TTTGGTGAAAATAATTGAAACGA
EXON 15	F:GTAAAACGACGGCCAGTAGTGGATATGAAATAAATGTGTGTG R:CAGGAAGCATGAAGGATGGT
EXON 16	F:GTAAAACGACGGCCAGTTGTGGGAAAATAGCATAAGCA R:GCTAATGGTTGTGTGGCAA
EXON 17	F:GTAAAACGACGGCCAGTAAATTAGCCATGAGCCTGAGA R:TGTGCCATGCTGGTGTATTT
EXON 18	F:GTAAAACGACGGCCAGTTCACCCATCTTCTAATCACTATGC R:GCTGAGGATCATCTGTATGTGTG
EXON 19	F:GTAAAACGACGGCCAGTTGGCAGGCAACTTATTACCA R:CAAGCTGCACTCAAATGAA
EXON 20	F:GTAAAACGACGGCCAGTTTGCTAAAGGATATTATGGAAGCA R:TGAAACAAAGGATTAATAAGTCATCA
EXON 21	F:GTAAAACGACGGCCAGTCTGCCCTCCTATTCCAATGA R:GACAAGCTACCTTGAACAGAGACA
EXON 22	F:GTAAAACGACGGCCAGTCACATTGAATGATGATTCTGTTTAT R:AATTTTGGCTATATACAATACTTCAGG
EXON 23	F:GTAAAACGACGGCCAGTCAGATAAGAATTCTGACTTTTCTTTT R:TTCCAAACAATAAAAAATATTCAGAGA
EXON 24	F:GTAAAACGACGGCCAGTTGTCTTTCAAAAATATTCCTTTTG R:CGATTAATTTTACCACCTGATCAAT
EXON 25	F:GTAAAACGACGGCCAGTCACCAGTGACATTTCCAGCA R:TGGCAGAGAAAACACTCCAA
EXON 26	F:GTAAAACGACGGCCAGTTGGGGGTGTTTGTCTTCAT R:TTTGTGAGACAAGCATGCAA
EXON 27	F:GTAAAACGACGGCCAGTGCTAATGCACATGAGAAAACCTCC R:TCTTGATTGTTTCAGCTTCACT
EXON 28.1	F:GTAAAACGACGGCCAGTCGCATGATTTCTTCACTGGTT R:GTTGCATCGGGATCAAAT

EXON 28.2A	F:GTAAAACGACGGCCAGTATCCTTCCTGGTTGTGGTGA R:GAAGGATTGGAAGCCATGAA
EXON 28.2B	F:GTAAAACGACGGCCAGTGTGACCGGATCCACTGTCTT R:CTTTGTCACCCGGTCATAGG
EXON 28.3	F:GTAAAACGACGGCCAGTCAAAGGTGGGGCTAATCTTC R:CAGTTTGGCATTGACCTCCT

EKKINHTEΣ ΓONIDIΟΥ <i>CDKL5</i>	F:εμπρόσθιος εκκινητής, R:ανάστροφος εκκινητής, αναγραφόμενη κατεύθυνση 5' προς 3'
EXON 2	F:TATTACTGTTGGTTTCTTCT R:TAACCTAAGTTCATTGCTC
EXON 3	F:TGTATGCGTGCCCTTGATTG R:TGCCACACGCAAAGACCAC
EXON 4	F:ACACTCTGGCTTCTTGCTAC R:CACTTCTTCCACACTCTATG
EXON 5	F:TTGGGATGTTTTAGTGT R:ATAATGTCAGAAACAGCCTT
EXON 6	F:GAAAGTTGTAGATAGAAAGC R:AATCTCATACTCACCTCG
EXON 7	F:CAATCAGGAGAACATAGAAC R:AAGAATGTTCTCTACCA
EXON 8	F:TAGCCCATGCGAGAACAG R:CTCAAAGCAAATGACAATAG
EXON 9	F:CTTGTGTTCTGATGATTTGC R:TTCCATTTTGGGTTTCAGCA
EXON 10	F:GCTTATCTGCTCCCTTCTGC R:TATTTGCCATTCCACATCTC
EXON 11	F:TGATATTCTGCAATGACTGT R:CCACCTCCTCCACCTAC
EXON 12.1/12.2	F:GAAGGCACATGCTTGAGAGA R:CAGAAAGGTTGCTCACAGAC
EXON 12.3/12.4	F:TCTCAGCAGAACCGCCACTC R:ATTCAGTCAAGGTGCTCAAC
EXON 13	F:TAGGAACAGGATGCTCTTAT R:ACTTCAACTTATTTGTGGGA
EXON 14	F:CTGGGCAATAGAGTGAGACC R:GACTTAGCAGGAGCAGAGGC
EXON 15	F:GTCCATCAGTGACTTACT R:AACAAACCAAAATGCTCACC
EXON 16	F:TTTACCCAAGTGTGATTTC R:GCAAAGTGTAAGTATCCAT
EXON 17	F:CTCCTTTGGGTGTGGTTGC R:AAGATTCATCCTGGCTCACG
EXON 18	F:CACCCAGTCACCTCACCTCT R:TTCGTGAGCGATTGTTCTG
EXON 19	F:TCTGGTCAATGGGATGTGGG R:CAGTGAGCCGAGATTGTGTG
EXON 20	F:CTGGTGTCTGGGAGCCGATG R:CTGCCATTACAATCACCTG
EXON 21	F:CTCAACGGTGAAGAGACAG R:AGGAAAACCTAACCTCAGCG

3. Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών που διαγνώστηκαν με αλληλούχηση επόμενης γενιάς

Κωδικός	Φύλο	Ηλικία διάγνωσης	Επιληπτικό σύνδρομο	Ηλικία έναρξης σπασμών	Ευρήματα από CT/MRI	Φαρμακευτική αγωγή	Επιπρόσθετα κλινικά στοιχεία	Οικογενειακό ιστορικό	Προηγούμενος γενετικός έλεγχος	Υπεύθυνο/α γονίδιο/α
51CES	A	1.5 ετών	DEE	2 μηνών	Κφ	LEV, PHT	Εξαδακτυλία και συνδακτυλία	Μητέρα με εξαδακτυλία και FS	Αλληλούχηση γονιδίου <i>SCN1A</i>	<i>SCN1A, GLI3</i>
52	A	6 μηνών	DEE	5 ημερών	Υποπλασία μεσολοβίου	PB, LEV	Υποτονία	Μεγαλύτερος αδελφός με παρόμοια κλινική εικόνα	-	<i>ARX, SCN1A</i>
53	A	13 ετών	DEE	5.5 μηνών	Κφ	LEV, VPA	-	-	-	<i>SCN1A</i>
54	A	6 μηνών	SLFNIE	5 μηνών	Κφ	PB, LEV	-	Μητέρα και μητρικός παππούς: ISS, μητρική αδελφή: FS.	-	<i>SCN2A</i>
55CES	A	4 ετών	SLNIE	Από τη γέννηση	Κφ	PB	-	-	-	<i>KCNQ2</i>
56CES	A	1 μηνός	ISS	1 ημέρας	Κφ	PB, LEV, TPM, PN	-	Άγνωστο (δότρια ωαρίου), από την πατρική πλευρά αρνητικό.	-	<i>KCNQ2</i>
57CES	A	3 μηνών	SLNIE	5 ημερών	Κφ	PB, LEV	-	-	-	<i>KCNQ2</i>
58	A	1 μηνός	EMEE	2 ημερών	Κφ	PB, LEV, P5P	Καρδιομυοπάθεια, αρθρογρύπωση. <u>Ο ασθενής απεβίωσε.</u>	-	Καρούτυπος	<i>KCNT1</i>
59	A	5 ετών	DEE	32 ημερών	M.E.	PB, LEV, VGB	Υποτονία, οπισθότονος	-	Αλληλούχηση των γονιδίων <i>ARX, FOXG1, CDKL5</i>	<i>KCNT1</i>
60	A	17 ετών	GGE (IGE)	4 ετών	Κφ	VPA	Αυτισμός	Αδελφή: FS και AS, πατέρας: parkinson.	Fragile X, Prader Willi, Καρούτυπος	<i>KCNT1</i>
61	Θ	27 ετών	DEE	Βρεφική ηλικία	Αυξημένο T2 σήμα σε γέφυρα και παρεγκεφαλίδα, αιμαγγείωμα προμήκους	LTG, VPA, LCM	Υποκαλιαιμία, αυξημένη ρενίνη αίματος, κύστη ωθήκης	-	-	<i>KCNJ10</i>
62	Θ	2.5 ετών	DEE	14 μηνών	Υπομυελίνωση	LEV, VPA, CLB	Απραξία χεριών, οριακή μικροκεφαλία, αναπτυξιακή παλινδρόμηση	-	Αλληλούχηση και MLPA γονιδίου <i>MECP2</i>	<i>CLCN4</i>
63	Θ	7 ετών	GEE	6 ετών	M.E.	M.E.	Αναπτυξιακή παλινδρόμηση, διαταραχές ύπνου,	-	Αλληλούχηση γονιδίου <i>MECP2</i>	<i>SYNGAP1</i>

							αυτοτραυματισμοί			
64	A	3,5 ετών	DEE	2 ετών	Κφ	LEV	-	Ετεροθαλής πατρικός αδελφός με ψυχοκινητική καθυστέρηση	Fragile X, a-CGH.	SYNGAP1
65	A	2,5 ετών	DEE	2 ετών	Κφ		-	-	Fragile X, a-CGH.	SYNGAP1
66	Θ	10 ετών	DEE	9 ετών	Κφ	M.E.	Στερεοτυπίες χειρών, κορμική αταξία, τρόμος κεφαλής	-	Αλληλούχηση των γονιδίων <i>MECP2</i> , <i>FOXG1</i> και <i>SLC2A1</i> , <i>SMA</i> MLPA, a-CGH, Καρυότυπος, MS-PCR για σύνδρομο Angelman	STXBP1
67	A	1 έτους	DEE	11 μηνών	Κφ	LEV	Υποτονία	-	-	STXBP1
68	Θ	1 έτους	GEFS+	1 έτους	Κφ	LEV, PB	-	Μητέρα: FS έως 9 ετών	Αλληλούχηση και MLPA γονιδίου <i>SCN1A</i>	PCDH19
69	Θ	10 ετών	DEE	7 μηνών	Κφ	VPA, TPM, CLN	Στερεοτυπίες, επιθετική συμπεριφορά	-	Αλληλούχηση των γονιδίων <i>MECP2</i> , <i>CDKL5</i> , <i>FOXG1</i>	PCDH19
70	Θ	1.5 ετών	GEFS+	8 μηνών	Ήπια λέπτυνση μεσολοβίου	RIX, steroids	Αταξία	Μητρικός παππούς με επιληψία της παιδικής ηλικίας	Αλληλούχηση και MLPA γονιδίου <i>SCN1A</i>	PCDH19
71	Θ	6 ετών	DEE	M.E.	Κφ	VPA	Μικροκεφαλία, υποτονία	-	-	MECP2
72	A	13 ετών	DEE	12 ετών	Κφ	LEV, VPA, TPM, CLB	Νευροψυχιατρικές εκδηλώσεις	Μητρικά ξαδέλφια: DEE	-	NHLRC1
73	A	29 ετών	DEE	8 μηνών	Μη ειδικές διαταραχές λευκής ουσίας	M.E.	Δυσμετρία, κορμική αταξία, νυσταγμός	Μικρότερος αδελφός: DEE, απεβίωσε σε παιδική ηλικία	a-CGH	COL4A1
74	Θ	5 ετών	D/EE-SWAS (EA- ESES)	14 μηνών	M.E.	VPA	Αναπτυξιακή παλινδρόμηση	Πατέρας: καθυστέρηση λόγου-βάδισης, FS. Μητρικά ξαδέλφια: επιληψία σε παιδική ηλικία.	-	COL4A2
75	A	5 ετών	DEE	Βρεφική	Κφ	LEV	Νόσος Hirschsprung	-	-	CSNK2B
76	Θ	9 μηνών	ISS	6 μηνών	Κφ	LEV, OXC	-	-	-	CSNK2B
77CES	A	2 ετών	DEE	Βρεφική	Κφ	PB	IUGR, υπέρτονια κάτω άκρων, μικροκεφαλία, μικροσωμία, αιμαγγείωμα δέρματος	-	a-CGH , αλληλούχηση γονιδίου <i>ARX</i>	IFIH1
78	A	2,5 ετών	MST	2 ετών	Κφ	OXC	Αναπτυξιακή παλινδρόμηση, τρόμος	-	-	DEPDC5

79CES	Θ	8 ετών	DEE	11 μηνών	Κφ	VPA	Αταξία, δυσμορφικά στίγματα προσώπου, στραβισμός, νυσταγμός	-	Αλληλούχηση γονιδίου <i>SCN1A</i> , Καρυότυπος, a-CGH	<i>AFF3</i>
80	A	9 ετών	DEE	3 μηνών	Κφ	LEV, OXC	-	-	-	<i>TCF4</i>
81	Θ	14 ημερών	MST	6 ημερών	Κφ	PB, OXC	Ολιγάμνιο	-	-	<i>PACS2</i>
82	A	1 έτους	GGE	7 μηνών	Κφ	LEV	Άπνοιες	-	-	<i>PRRT2</i>
83	Θ	8 μηνών	SLFNIE	4 μηνών	Κφ	LEV, CBZ	-	Πατέρας: κλονικοί σπασμοί και AS, πατρικός παππούς: AS	-	<i>PRRT2</i>
84	Θ	10 ετών	DEE	3 ετών	Κφ	VPA, RIS	-	Μητέρα: απύρετοι σπασμοί μέχρι ηλικίας 3,5 ετών	Καρυότυπος, Fragile X, αλληλούχηση γονιδίου <i>MECP2</i>	<i>PRRT2</i>
85	Θ	1.5 έτους	GEFS+	Βρεφική	M.E.	LEV, PHT	Δυσμορφικά στίγματα προσώπου	-	-	<i>SMARCA2</i>
86	Θ	8m	DEE	6 μηνών	Λευκοδυστροφία	M.E.	Αναπτυξιακή παλινδρόμηση	-	-	<i>GALC</i>
87	Θ	12 ετών	DEE	Βρεφική	Δυσγενεσία μεσολοβίου	VPA	Μικροκεφαλία, αταξία,δυστονία	Μητρικός αδελφός: επιληψία της παιδικής ηλικίας	Angelman	<i>AP4S1</i>
88	Θ	40 ετών	DEE	6 μηνών	Κφ	M.E.	Στραβισμός	-	-	<i>HNRNPU</i>
89	Θ	12 ετών	DEE	M.E	Κφ	TPM	Υποτονία, αρθρογρύπωση, σκολίωση, βαρηκοΐα, οπτική ατροφία, υπερτελωρισμός, πρόσχαρη συμπεριφορά	-	Angelman αλληλούχηση γονιδίου <i>MECP2</i> , Καρυότυπος, a-CGH	<i>H3-3A</i>
90	A	14 ετών	GGE	14 ετών	Κφ	M.E.	Ακροπαραισθησία, ημιπληγική ημικρανία	Μητέρα: επιπλεγμένες ημικρανίες	-	<i>NOTCH3</i>
91	A	3 ετών	ISS	9 μηνών	Δυσγενεσία μεσολοβίου	VPA, CBZ	Αυτισμός	-	Αλληλούχηση γονιδίου <i>MECP2</i> , Angelman	<i>CAPRIN1</i>
92	Θ	7 ετών	ISS	5 μηνών	Κυστικά μορφώματα	VPA	Δερματικές κηλίδες υπόχρωμες και café au lait, μικροκεφαλία	Θετικό οικογενειακό ιστορικό για διάφορους καρκίνους και από τις δύο πλευρές	Αλληλούχηση και MLPA γονιδίων <i>MECP2, CDKL5, FOXP1, NF1</i> , Angelman, a-CGH Καρυότυπος με παρουσία ευθραυστότητας	<i>BRCA2</i>
93	Θ	9 μηνών	DEE	8 μηνών	Δυσγενεσία μεσολοβίου	M.E.	Μικροκεφαλία, υποτονία	-	-	<i>FOXP1</i>

94	Θ	15.5 ετών	EAWBM	M.E.	Ετεροτοπία	VPA, LTG, CLB	-	-	-	DCX
95	Θ	15 ετών	DEE	9 μηνών	Ατροφία μεσολοβίου και παρεγκεφαλίδας	M.E.	Μικροκεφαλία, τετραπληγία, καταρράκτης	Μεγαλύτερη αδελφή με παρόμοιο φαινότυπο που απεβίωσε	Angelman, αλληλούχηση γονιδίου MECP2, a-CGH	WDR73
96	A	6 μηνών	ISS	5 μηνών	Μη ειδικές διαταραχές λευκής ουσίας	LEV, VGB	-	Πατρικός ανηψιός με αυτισμό	-	MT-ND5
97	Θ	15 ετών	DEE	15 ετών	Μη ειδικές διαταραχές λευκής ουσίας	M.E.	Υπέρταση, αδυναμία πρόσληψης βάρους	-	Καρυότυπος	MAP2K1
98	Θ	7 ετών	DEE	4 ετών	M.E.	STM, OXC	Τρόμος, στερεοτυπίες χεριών	-	Fragile X, αλληλούχηση γονιδίου MECP2, a-CGH.	PAFAH1B1
99	Θ	16 ημερών	DEE	1 ημέρας	Μη ειδικές διαταραχές λευκής ουσίας	PB, PN, P5P, BIO	Ληθαργικότητα, υποτονία, ραβδομύωση, κεντρικού τύπου άπνοια, διαβήτης, βαρηκώια	-	Μυοτονική δυστροφία τύπου 1	ABAT
100	Α	4 μηνών	DEE (AS)	3 μηνών	Διεύρυνση γεφυροπαρεγκεφαλικών δεξαμενών	M.E.	ΨΚΚ, κορμική υποτονία, μικροσωμία, οπισθότονος, υπέρταση άκρων, οφθαλμικός αλφισμός, δυσμορφικά στίγματα προσώπου	-	-	Multiple genes (7q11.23 deletion syndrome)
101	Θ	47 ετών	TS (ISS)	Βρεφική	Αποπιτανώσεις, αμαρτώματα	N.A	Ακροπαραισθησία, σκληρυντικού τύπου αλλοιώσεις, αδένωμα παγκρέατος, καρκίνος του γαστρεντερικού συστήματος, λιποαδενώματα μαστών	Θετικό οικογενειακό ιστορικό για διάφορους καρκίνους και από τις δύο πλευρές	-	TSC1
102	A	2 ετών	GEFS+ (FS)	1,5 έτους	Κφ	N.A	Μακροκεφαλία, υπερτελωρισμός, δυσμορφικά στίγματα προσώπου, μικροσωμία, καθυστέρηση λόγου	-	Καρυότυπος, σύνδρομο Silver-Russell	KAT6A
103	A	6 ετών	DEE	1,5 έτους	Ασυμμετρία εγκεφαλικών ημισφαιρίων και ινιακών λοβών.	LEV, VPA	-	-	Καρυότυπος, Fragile X,	KAT8
104	Θ	32 ετών	D/EE-SWAS	Παιδική	Κφ	N.A	Επεισόδια επιληπτικής αφασίας και ημιπληγικές ημικρανίες	Μητέρα: ημιπληγικές ημικρανίες, γιος: αυτισμός	-	ATP1A2
105	A	19 ετών	DEE	2,5 ετών	Κφ	VPA, PER, RFM	Πυρετικοί και απύρετοι σπασμοί, επιθετική	-	Καρυότυπος, a-CGH, Fragile X, αλληλούχηση	ATP6V1B2

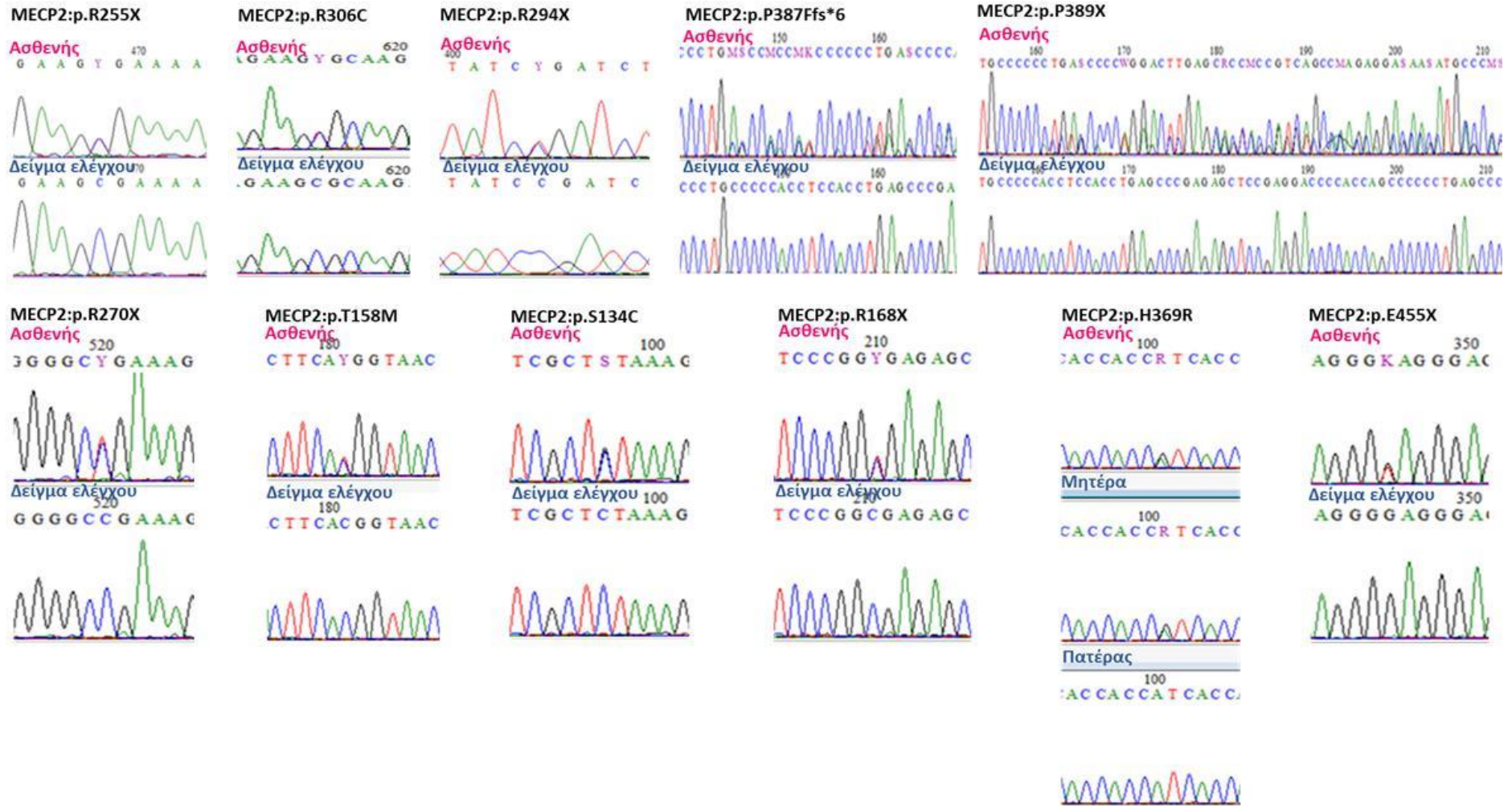
							συμπεριφορά, τώρα μυοκλονική ατονική επιληψία με πολλαπλά επεισόδια σε καθημερινή βάση		γονιδίου <i>MECP2</i>	
106	A	1.5 έτους	DEE	9 μηνών	Καθυστέρηση μυελίνωσης	LEV	Δυσμορφικά στίγματα προσώπου	-	Καρυότυπος, a-CGH	<i>ZNF142</i>
107	Θ	2 μηνών	ISS	49 ημερών	Κφ	OXC	Αιμαγγειώματα δέρματος	-	-	<i>ANK2</i>
108	A	16 ετών	GGE	3.5 ετών	Κφ	VPA	Μαρφανοειδή χαρακτηριστικά	Πατέρας: επιληψία μέχρι την ενήλικο ζωή	-	<i>CUX2</i>
109	Θ	1.5 έτους	DEE	1 έτους	Κφ	M.E.	Αταξία, μικροκεφαλία, δυσμορφικά στίγματα προσώπου, στερεοτυπίες, γαστροισοφαγική παλινδρόμηση	Αδελφός: αυτισμός	-	<i>GPT2</i>
110CES	A	2 ετών	ME	10 μηνών	Κφ	VPA	-	-	Αλληλούχηση γονιδίου <i>SCN1A</i>	<i>NR2F1</i>
111	Θ	3 ετών	ISS	12 μηνών	Αυξημένο T2 σήμα περικολιακά	VPA	Υποτονία	-	Prader Willi, Μυοτονική Δυστοφία τύπου 1, SMA MLPA.	<i>PURA</i>
112	A	2 ετών	DEE	2 ετών	M.E.	M.E.	Τρόμος	-	-	<i>STXBP1</i>
113	Θ	3 ετών	GEFS+	1.5 έτους	Κφ	LEV, VPA	Αταξία, καθυστέρηση λόγου	Πατέρας: αταξία, σπασμοί	Αλληλούχηση γονιδίου <i>SCN1A</i>	<i>TGM6</i>
114	A	4 ημερών	ISS	1 ημέρας	M.E.	M.E.	Αρθρογύπωση, υποτονία, δυσμορφικά στίγματα προσώπου <u>Ο ασθενής απεβίωσε (8 ημερών)</u>	-	Προγεννητικά καρυότυπος και a-CGH.	<i>TOR1A</i>
Κλινικά χαρακτηριστικά σθενών με παραλλαγές αβέβαιης κλινικής σημασίας										
115	Θ	11 ετών	GGE	8 ετών	Κφ	VPA, LTG	Χοραιοαθέτωση, δυσαρθρία, τρόμος	-	-	<i>ALDH18A1, MECP2</i>
116	Θ	11 ετών	DEE	1 ημέρας	M.E.	M.E.	Διφυής αντίχειρας, άκαμπτες αρθρώσεις	-	-	<i>PNPO</i>
117	Θ	5 ετών	D/EE-SWAS (ESES)	4 ετών	Μη ειδικές διαταραχές λευκής ουσίας	VPA, OXC		-	-	<i>ODC1</i>
118 trio WES	Θ	6 ετών	DEE	7 ημερών	Νέκρωση στελέχους	LEV, VPA, CLB, PB	Επεισόδια μεταβολικής αποδιοργάνωσης επί ιογενών λοιμώξεων	-	Αλληλούχηση γονιδίων <i>MECP2, CDKL5, FOXG1</i> , μιτοχονδριακό πάνελ	<i>ARMCX2</i>
119	A	8 ετών	DEE	4 ετών	Κφ	VPA	Δυσαρθρία	-	-	<i>ATP2C2</i>

120	A	3 ετών	ISS	Βρεφική	Υδροκέφαλο με διάταση των πλαγίων κοιλιών	M.E.	Υπερμετρωπία, διαταραχές καρδιακής αγωγιμότητας, βαρηκοΐα, στερεοτυπίες χειρών, υπερτονία άκρων, υποτονία κορμού, IUGR	-	Καρυότυπος a-CGH	<i>MED13L</i>
121	Θ	9 ετών	DEE	Βρεφική	M.E.	M.E.	Μικροκεφαλία, σκολίωση, σπαστική τετραπληγία	-	Αλληλούχηση γονιδίων και MLPA γονιδίων <i>MECP2, CDKL5</i> , Καρυότυπος, a-CGH	<i>HUWE1</i>

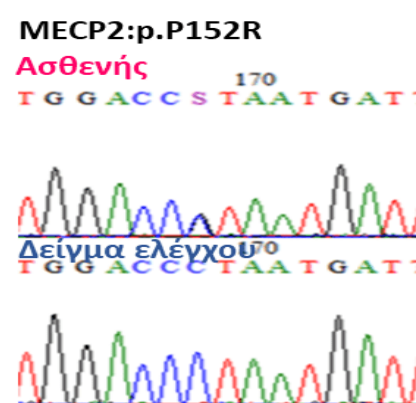
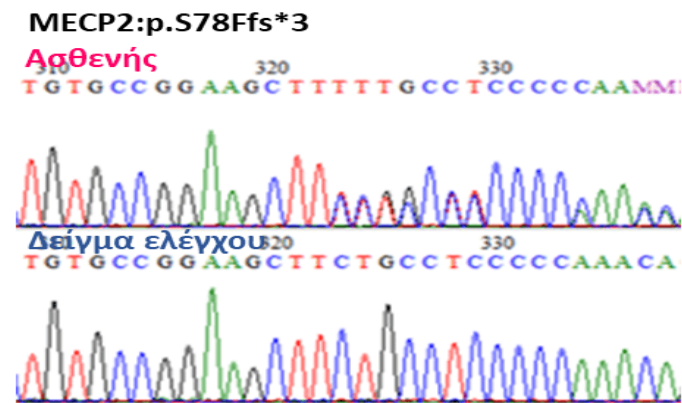
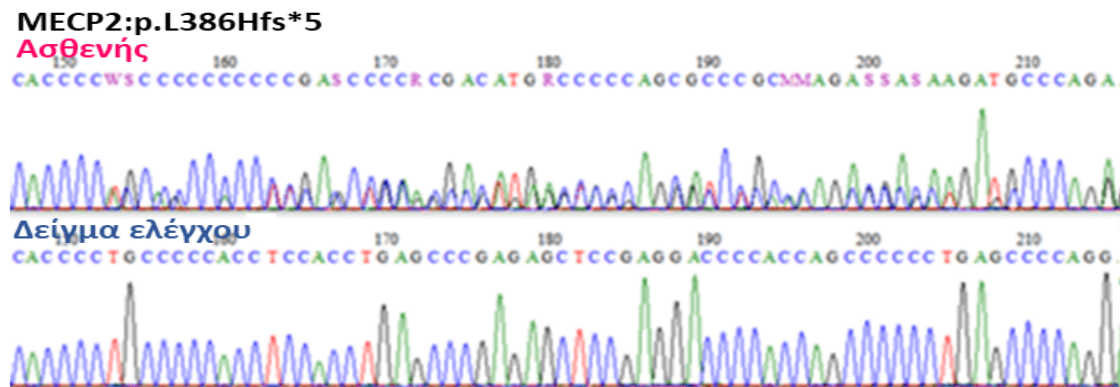
Συνομογραφίες Πίνακα:

TS: Οζώδης σκλήρυνση, IUGR: ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης, BIO: Βιοτίνη, CBZ: Καρβαμαζεπίνη, CLB: Κλοβαζάμη, CLN:Κλοναζεπάμη, LCM: Λακοσαμίδη, LEV: Λεβετιρασετάμη, LTG: Λαμοτριγίνη, OXC: Οξυκαρβαζεπίνη, PB: Φαινοβαρβιτάλη, PER: Περαμπανέλη, PHT: Φαινοτοΐνη, PN: Πυριδοξίνη, P5P: 5-φωσφορική-πυριδοξάλη, RFM: Ρουφιναμίση, RIS: Ρισπεριδόνη, RIX: Ριτουξιμάμπη, STM: Σουλτιάμη, TPM: Τοπιραμάτη, VGB: Βιγαπατρίνη, VPA: Βαλπροϊκό οξύ, a-CGH: μοριακός καρυότυπος, M.E.: μη εφαρμόσιμο.

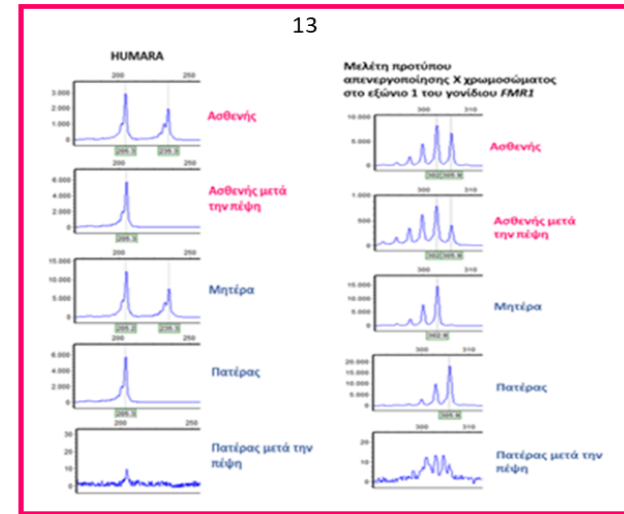
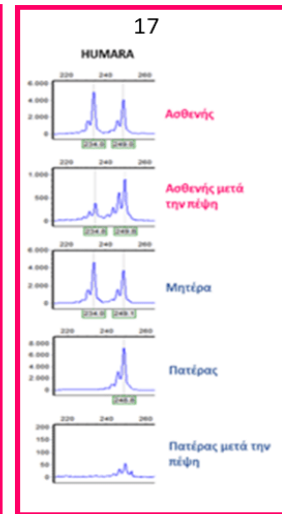
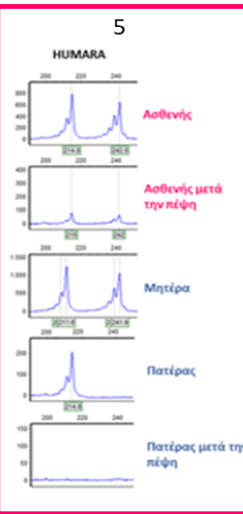
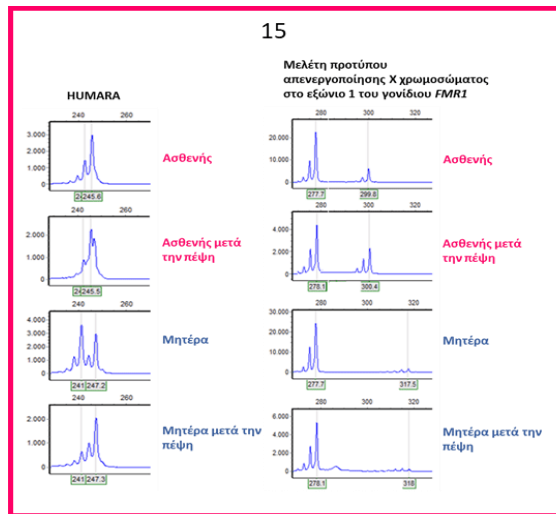
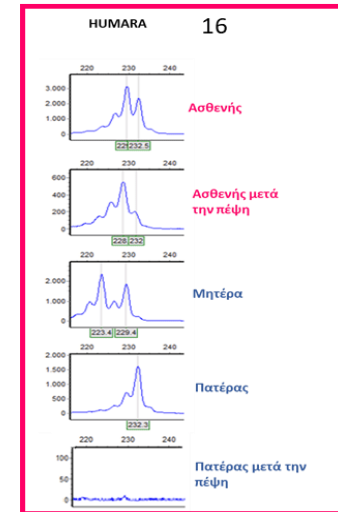
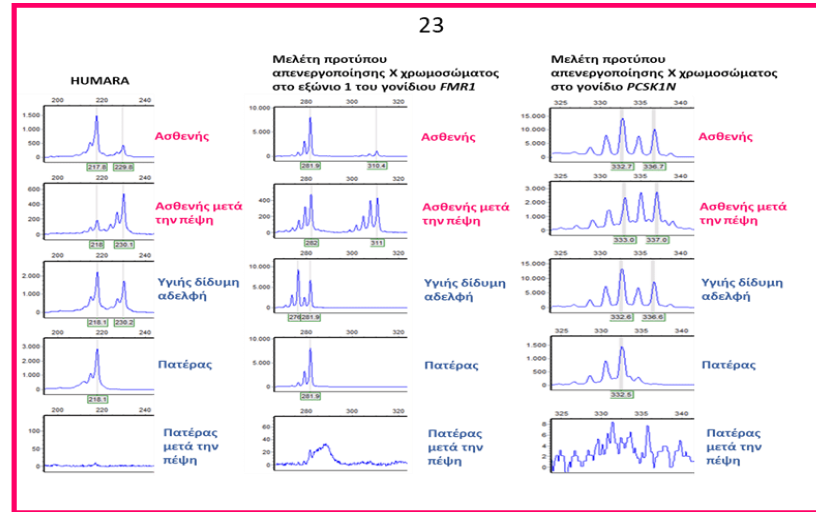
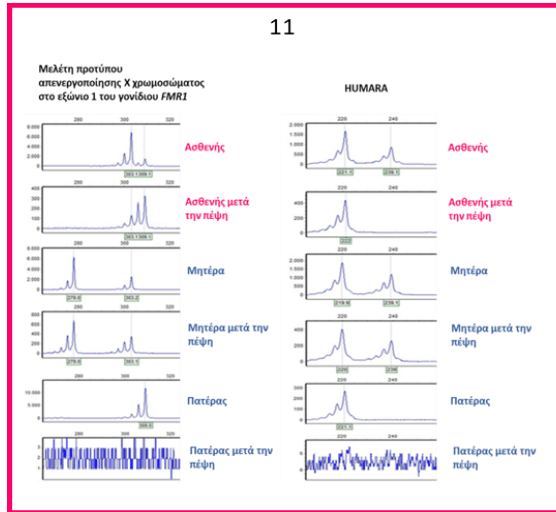
4. Εικόνες από τα δεδομένα της αλληλούχησης κατά Sanger στους ασθενείς με μοριακή βλάβη του γονιδίου *MECP2* συγκριτικά με γονεϊκά δείγματα ή δείγματα ελέγχου.



4. Εικόνες από τα δεδομένα της αλληλούχησης κατά Sanger στους ασθενείς με μοριακή βλάβη του γονιδίου *MECP2* συγκριτικά με γονεϊκά δείγματα ή δείγματα ελέγχου (συνέχεια).



5. Εικόνες από την μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης ασθενών με παραλλαγές του γονιδίου *MECP2*.



6. Εικόνες από την μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης θήλων με παραλλαγές σε φυλοσύνδετα γονίδια.

