



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESI DOCTORAL

**SEQÜENCIACIÓ EXÒMICA EN L'ESTUDI
MOLECULAR DE LES ENCEFALOPATIES
EPILEPTIQUES D'INICI PRECOÇ**

MEMÒRIA PRESENTADA PER
Anna Marcé Grau

PER OPTAR AL TÍTOL DE
Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona

PROGRAMA EN NEUROCIÈNCIES
INSTITUT DE NEUROCIÈNCIES
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
2013-2018

Aquesta tesi ha estat realitzat sota la direcció del Dr. **Alfons Macaya Ruiz** i tutoritzada pel **Dr. José Rodríguez Álvarez**, al Grup de Recerca en Neurologia Pediàtrica de l'Institut de Recerca de la Vall d'Hebron, gràcies a la beca predoctoral atorgada per l'Institut de Recerca de la Vall d'Hebron i finançada per la iniciativa de miromecenatge *Amics del VHIR*.

Dr. Alfons Macaya Ruiz

Dr. José Rodríguez Álvarez

ANNA MARCÉ GRAU
2018



ÍNDEX

ABREVIATURES	5
INTRODUCCIÓ	13
1. El sistema nerviós central	15
1.1. La transmissió de l'impuls nerviós	15
1.2. La neurotransmissió	17
1.2.1. Transmissió nerviosa per potencial d'acció	17
1.2.2. Transmissió nerviosa per neurotransmissors	18
1.3. Establiment de la xarxa neuronal	22
2. Epilèpsia	24
2.1. Fisiopatologia de l'epilèpsia	25
2.2. L'hipocamp i l'excitabilitat neuronal	30
2.3. Classificació de les crisis epilèptiques	32
2.4. Trastorns epilèptics	34
2.4.1. Tipus d'epilèpsia	34
2.4.2. Etiologia	35
2.4.3. Comorbiditats	36
2.4.4. Síndromes epilèptics	37
3. Encefalopaties epilèptiques	38
3.1. Encefalopaties epilèptiques d'inci precoç	40
3.1.1. Predisposició a l'epilèpsia en el desenvolupament	40
3.1.2. Classificació de les EIEE	43
3.1.3. Genètica de les EIEE	48
4. Diagnòstic de les Encefalopaties Epilèptiques d'Inici Precoç	57
4.1. Diagnòstic clínic	57
4.2. Diagnòstic molecular	59
4.2.1. Tecnologies de seqüenciació massiva	60
OBJECTIUS	65
MATERIALS I MÈTODES	69
1. Individus	71
2. Tècniques genètiques	82
2.1. Extracció de DNA	82
2.1.1. Extracció de DNA a partir de sang total	82
2.1.2. Extracció de DNA a partir de saliva	83
2.2. Panell d'epilèpsies	84

2.3. Exoma complet.....	84
2.3.1. Preparació de les mostres.....	85
2.3.2. WES i dades crues.....	85
2.3.3. Priorització de variants.....	87
2.3.4. Reanàlisi de dades NGS.....	91
2.4. Genoma complet.....	92
2.4.1. Preparació de les mostres.....	92
2.4.2. WGS i dades crues.....	92
2.4.3. Priorització de variants.....	93
2.5. Validació pel mètode Sanger.....	93
2.5.1. Disseny de primers.....	93
2.5.2. Polymerase chain reaction (PCR).....	94
2.5.3. Purificació.....	95
2.5.4. Seqüenciació Sanger.....	96
3. Tècniques de biologia molecular.....	97
3.1. Clonatge per mètode Gateway.....	97
3.1.1. Amplificació i mutagènesis.....	97
3.1.2. Entry clone.....	98
3.1.3. Expression vector.....	99
3.1.4. Generació de vectors heterozigots.....	100
3.2. Transformació de bacteris competents.....	101
3.3. Transfecció de cèl·lules de mamífer.....	101
4. Tècniques de biologia de proteïnes.....	103
4.1. Estudi de l'expressió proteica (Western Blot).....	103
4.1.1. Extracte proteic.....	103
4.1.2. Electroforesis en gel i transferència en membrana.....	103
4.1.3. Bloqueig i anticossos.....	103
4.1.4. Revelat i anàlisi de resultats.....	104
4.2. Co-immunoprecipitació.....	104
4.2.1. Transfecció cel·lular.....	104
4.2.2. Extracte proteic i immunoprecipitació.....	105
4.2.3. Western blot.....	105
4.3. Assaig de glicosilació.....	106
4.3.1. Extracte proteic i tractament amb endoglicosidases.....	106
4.3.2. Immunoblot.....	106
4.4. Immunocitoquímica.....	107
4.4.1. Condicions cel·lulars.....	107

4.4.2. Fixació, permeabilització i bloqueig	107
4.4.3. Anticossos i marcatge de nuclis	107
4.4.4. Microscopi de fluorescència i anàlisi de col·localització.....	108
4.5. Anàlisi de reporters	108
4.5.1. Condicions cel·lulars	109
4.5.2. Registre de l'activitat luciferasa	111
4.5.3. Anàlisi de resultats	111
4.6. Anàlisi estadístic.....	111
5. Estudis in vivo en peix zebra.....	113
5.1. Síntesi de RNA.....	113
5.2. Creuament	113
5.3. Modulació farmacològica de canals de potassi.....	114
5.4. Injecció de RNA.....	114
5.5. Registre de comportament	116
RESULTATS	117
Capítol 1. Aplicació de les tècniques ngs per al diagnòstic de les encefalopaties epilèptiques d'inici precoç.....	119
1.1. Resultats globals de l'estudi genètic de pacients EIEE	122
1.2. Variants en gens associats a epilèpsia	124
1.3. Anàlisi de variants en nous gens candidats	132
Capítol 2. Estudi de la correlació genotip-fenotip en gens prèviament associats a les EIEE.....	139
2.1. Estudi computacional de l'estructura de GNAO1	139
2.2. Estudis electrofisiològics per a KCNQ2	142
2.2.1. Caracterització fenotípica i genètica de cada pacient estudiat.....	142
2.2.2 Caracterització funcional de la subunitat Kv7.2 portadora de les diferents mutacions	144
Capítol 3. Sobreexpressió de RNA en peix zebra com a model <i>in vivo</i> per a EIEE	147
3.1. Estudi del fenotip epilèptic en peix zebra per modulació farmacològica de canals de potassi.....	147
3.2. Sobreexpressió del RNA humà en peix zebra	148
3.2.1. Canals de potassi Kv7.2 i Kv7.3	148
3.2.2. Receptor muscarínic d'acetilcolina tipus 1 (CHRM1)	152
Capítol 4. El receptor muscarínic d'acetilcolina tipus 1 com a gen causal d'encefalopatia epilèptica d'inici precoç.....	155
4.1. Característiques genètiques de la variant p.Pro380Leu en CHRM1	155
4.2. Estudi del tràfic cel·lular de CHRM1	157

4.2.1. Expressió proteica i glicosilació	158
4.2.2. Oligomerització entre monòmers de CHRM1	160
4.2.3. Tràfic cel·lular i localització transmembrana	161
4.2.4. Senyalització intracel·lular per estimulació del receptor CHRM1	163
DISCUSSIÓ	165
1. L'ús de les tècniques NGS com a eina diagnòstica per a les encefalopaties epilèptiques d'inici precoç	167
1.1. Diagnòstic de les EIEE mitjançant WES	169
1.1.1. WES i les variants de significat incert	171
1.2. Els casos negatius de l'estudi WES	175
2. Estudi de la correlació genotip-fenotip en gens causals d'EIEE	177
2.1. GNAO1: trastorn del moviment associat a epilèpsia	177
2.2. Encefalopaties epilèptiques associades a KCNQ2	179
3. La sobreexpressió de RNA en peix zebra com a model animal per a la ràpida selecció de nous gens candidats	184
4. Associació de la variant p.P380L a CHRM1 al fenotip EIEE	187
CONCLUSIONS	191
BIBLIOGRAFIA	195

ANNEXOS

Annex I. Marcé-Grau A et al, 2015

Annex II. Gomis-Pérez C et al, 2018 (en revisió)

Annex III. NGS per al diagnòstic de l'esclerosi tuberosa

ABREVIATURES

AARS: *Alanyl-trna Synthetase*
aCGH: *Array comparative genomic hybridization*
ACh: *Acetilcolina*
ADAM22: *A disintegrin and metalloproteinase domain 22*
AES: *Antiepileptics estàndards*
ALDH7A1: *Aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1*
ALG13: *Asparagine-linked glycosylation 13*
AMPA: *α -amino-3- hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate*
AP3B2: *Adaptor-related protein complex 3, beta-2 subunit*
ARHGEF9: *RHO guanine nucleotide exchange factor 9*
ARX: *Aristaless-related homeobox gene*
BAM: *Binary alignment map*
bp: *Parells de bases*
CA: *Calcimicina*
CACNA1A: *Calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha-1A subunit*
CANCA1C: *Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha-1C subunit*
CACNA1G: *Calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha-1G subunit*
CAD: *Carbamoyl phosphate synthetase/aspartate transcarbamoylase/dihydroorotase*
cAMP: *adenosin monofosfat cíclic*
CDKL5: *Cyclin-dependent kinase-like 5*
cDNA: *DNA codificant*
Ch: *Cacbacol*
CHET: *Heterozigot compost*
CHRM1: *Receptor muscarínic d'acetilcolina tipus 1*
ClinVar: *Clinical Variation Database*
CMA: *Chromosome microarray analysis*
CNPY3: *Canopy FGF signaling regulator 3*
CNV: *Copy number variant (Variant de nombre de còpia)*
Co-IP: *Co-immuniprecipitació*
CPLX1: *Complexin 1*
CRE: *cAMP response element*
CYFIP2: *Cytoplasmic FMRP-interacting protein 2*
DAPI: *4',6-diamidino-2-phenylindole, marcatge fluorescent de nuclis cel·lular*
DBS: *Deep brain stimulation*
dbSNP: *SNP database*
ddG: *Càrrega d'energia lliure*
DENND4C: *DENN domain-containing protein 4C*

DENND5A: *DENN domain-containing protein 5A*
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DNA: Àcid desoxiribonucleic
DNM1: *Dynamin 1*
DOCK7: *Dedicator of cytokinesis 7*
Domini PH: *Pleckstrin homology domain*
EE: Encefalopatia Epilèptica
EEF1A2: *Eukaryotic translation elongation factor 1, alpha-2*
EEG: Electroencefalograma
EIEE: Encefalopatia epilèptica d'inici precoç
EME: Encefalopatia mioclònica precoç
Endo F: Enzim endoglicosidasa F
Endo H: Enzim endoglicosidasa H
ExAC: *Exome Aggregation Consortium*
FBS: *Fetal bovine serum*
FGF12: *Fibroblast growth factor 12*
FMN1: *Formin 1*
FRRS1L: *Ferric chelate reductase 1-like*
FSK: Forskolina
GABA: Àcid Gamma-aminobutíric
GABBR2: *GABA-B receptor, R2 subunit*
GABRA1: *Gamma-aminobutyric acid receptor, alpha-1*
GABRB1: *Gamma-aminobutyric acid receptor, beta-1*
GABRB3: *Gamma-aminobutyric acid receptor, beta-3*
gDNA: DNA genòmic
GDP: *Guanidina difosfat*
GNAO1: *Guanine nucleotide-binding protein, alpha-activating activity polypeptide O*
gnomAD: *Genome Aggregation Database*
GRIA2: *Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 2*
GRIN2B: *Glutamate receptor, ionotropic, n-methyl-d-aspartate, subunit 2b*
GRIN2D: *Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate, subunit 2d*
GTP: *Guanidina trifosfat*
GUF1: *GUF1 GTPase*
H2OmilliQ: aigua desionitzada
HCN1: *Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 1*
HEK293: *Human embryonic kidney cells 293*
HeLa: Henrietta Lacks, línia de cèl·lules epitelials humanes de carcinoma cervical

HNRNPU: *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U*

HUVH: Hospital Universitari Vall d'Hebron

IGV: *Integrative Genomics Viewer*

ILAE: *International League Against Epilepsy*

INO80: *INO80 complex, catalytic subunit*

IP: immunoprecipitació

IP3: *fosfoinositol-3-fosfat*

ITPA: *Inosine triphosphatase*

kb: Quilobases

kDa: Quilodaltons

KCNA2: *Potassium channel, voltage-gated, shaker-related subfamily, member 2*

KCNB1: *Potassium channel, voltage-gated, shab-related subfamily, member 1*

KCNQ2; Kv7.2: *Potassium channel, voltage-gated, kqt-like subfamily, member 2*

KCNQ3; Kv7.3: *Potassium channel, voltage-gated, kqt-like subfamily, member 3*

KCNT1: *Potassium channel, subfamily t, member 1*

KCNT2: *Potassium channel, subfamily T, member 2*

KIF1B: *Kinesin family member 1b*

LOVD: *Leiden Open (source) Variation Database*

LPD: Linopiridina

MDH2: *Malate dehydrogenase, mitochondrial*

MMPSI: Epilèpsia maligna amb convulsions parcials migratòries a la infància

MRI: Ressonància magnètica

mRNA: RNA missatger

mt; mut: mutant

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NECAP1: *Necap endocytosis-associated protein 1*

NFAT-RE: *Nuclear factor of activated T-cells response element*

NGS: *Next Generation Sequencing (Seqüenciació massiva)*

NMDA: *N-methyl-D-aspartate*

NT: neurotransmissors

NTRK2: *Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2*

OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*

PARS2: *Prolyl-tRNA synthetase 2*

PBS: *Phosphate buffered saline*

PCDH19: *Protocadhrin 19*

PCR: *Polymerase chain reaction*

PFA: Paraformaldehid

PIGA: *Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class A protein*
PIGP: *Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class P protein*
PLCB1: *Phospholipase c, beta-1*
PMA: *Phorbol 12-myristate 13-acetate*
PNKP: *Polynucleotide kinase 3-prime phosphatase*
Polyphen: *Polymorphism Phenotyping*
PROVEAN: *Protein Variation Effect Analyzer*
PTF1A: *Pancreas transcription factor 1, alpha subunit*
RARS2: *Arginyl-tRNA synthetase 2*
RHOBTB2: *Rho-related BTB domain-containing protein 2*
RMSD: *root-mean-square deviation*
RNA: Àcid ribonucleic
RTG: Retigabina
RT-PCR: PCR de retrotranscripció
SAM: *Sequence alignment map*
SCN1A: *Sodium channel, neuronal type i, alpha subunit*
SCN1B: *Sodium channel, voltage-gated, type I, beta subunit*
SCN2A: *Sodium channel, voltage-gated, type II, alpha subunit*
SCN3A: *Sodium channel, voltage-gated, type III, alpha subunit*
SCN8A: *Sodium channel, voltage-gated, type VIII, alpha subunit*
SCN9A: *Sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha subunit*
SETDB1: *Set domain protein, bifurcated, 1*
SIK: *Salt-inducible kinase 1*
SLC12A5: *Solute carrier family 12 (potassium/chloride transporter), member 5*
SLC13A5: *Solute carrier family 13 (sodium-dependent citrate transporter), member 5*
SLC1A2: *Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2*
SLC25A12: *Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, aralar), member 12*
SLC25A22: *Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, glutamate), member 22*
SLC35A2: *Solute carrier family 35 (UDP-galactose transporter), member 2*
SMEI: Epilèpsia mioclònica severa a la infància o Síndrome de Dravet
SN: sobrenedant
SNC: Sistema nerviós central
SNP: *Single nucleotide polymorphism* (Polimorfisme de nucleòtid únic)
SNV: *Single nucleotide variant* (Variant de nucleòtid únic)
SPATA5: *Spermatogenesis-associated protein 5*
SPTAN1: *Spectrin, alpha, nonerythrocytic 1*
ST3GAL3: *ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 3*

STXBP1: *Syntaxin-binding protein 1*

SUDEP: Mort sobtada de forma inexplicable per epilèpsia

SYNJ1: *Synaptojanin 1*

SZT2: *Seizure threshold 2*

TBC1D24: *TBC1 domain family, member 24*

TRAK2: *Trafficking protein, kinesin-binding 2*

tRNA: RNA de transferència

UBA5: *Ubiquitin-activating enzyme E1 domain-containing 1*

VCF: *Variant Calling File*

VEEG: *Video-electroencefalograma*

VHIR: Vall d'Hebron Institut de Recerca

VUS: Variant de significat incert

WES: *Whole exome sequencing* (Seqüenciació de l'exoma complet)

WGS: *Whole genome sequencing* (Seqüenciació del genoma complet)

wt: *wildtype*

WWOX: *WW domain-containing oxidoreductase*

YWHAG: *Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma isoform*

INTRODUCCIÓ

1. El sistema nerviós central

El sistema nerviós central és un sistema complex caracteritzat per un gran ventall d'activitat dinàmica i patrons de connectivitat necessaris per a la integració i processament de la informació relativa al comportament i cognició¹. El coneixement dels mecanismes que regeixen els circuits neuronals en un individu sa és crític per a poder entendre les alteracions que s'hi produeixen, per tal de poder proporcionar diagnòstic i tractaments a les malalties neurològiques².

1.1. La transmissió de l'impuls nerviós

La neurona és la unitat cel·lular específica del sistema nerviós, la qual prové de la diferenciació de les cèl·lules precursors anomenades neuroblasts³. Es tracta d'una cèl·lula polaritzada a través de la qual es transmeten impulsos nerviosos, els quals es comunicaran amb una segona neurona a través de la sinapsi. Aquesta, és considerada la unitat funcional del SNC i la seva organització i funció és el focus d'estudi per a conèixer el funcionament del cervell, així com per a estudiar les conseqüències de la seva disfunció en la progressió de diverses malalties neurològiques⁴.

La neurona consta de tres parts ben diferenciades: el cos neuronal format per la dendrita i espines dendrítiques, que formen el terminal postsinàptic, l'axó i el terminal presinàptic. El fenomen de polarització cel·lular indica el sentit de la transmissió de l'impuls nerviós a través de potencials d'acció. El terminal postsinàptic rep l'impuls nerviós que avança a través de l'axó fins a arribar al terminal presinàptic, on té lloc la transmissió del senyal a la següent neurona³. En condicions estàndard, el funcionament bàsic de la sinapsi consisteix en l'entrada de calci al terminal presinàptic com a conseqüència del potencial d'acció. Aquest augment de concentració de calci intracel·lular desencadena una cascada de senyalització que acabarà produint la fusió de les vesícules sinàptiques amb la membrana plasmàtica presinàptica, donant lloc a l'alliberació del neurotransmissor corresponent. Aquest, s'unirà als receptors postsinàptics situats a les espines dendrítiques de la següent neurona, iniciant de nou el potencial d'acció al llarg de la neurona⁵. Per tant, la transmissió de l'impuls nerviós implica convertir el senyal elèctric de la neurona presinàptica en un senyal químic, i després de nou en un senyal elèctric al terminal postsinàptic⁶.

La neurogènesi és el procés de generació de noves neurones a partir de cèl·lules mare i progenitores que es dona majoritàriament en l'embriogènesi. Durant el desenvolupament, la neurogènesi ve seguida per una migració neural juntament amb la generació de dendrites i axons, i l'extensió d'aquests últims. La connexió guiada

entre dendrites i axons rep el nom de sinaptogènesi, i ve determinada per tres esdeveniments característics: la iniciació de la sinapsi gràcies al reconeixement de molècules diana a la membrana plasmàtica d'altres cèl·lules, organització dels components sinàptics com ara vesícules sinàptiques, i finalment, especificació de les propietats de la sinapsi: neurotransmissors, tipus d'activitat o plasticitat. Aquestes propietats poden fer variar el tipus de transformació de l'impuls presinàptic en senyals postsinàptics en cada una de les múltiples connexions que forma una neurona (cada espina dendrítica en pot formar una), i encara més si es té en compte la influència de senyals moduladors diferents. Com a conseqüència, la neurona integra múltiples senyals en forma de potencial d'acció que poden variar, no només entre neurones, sinó també entre els diferents terminals sinàptics d'una mateixa neurona (Figura 1). Tot això dóna lloc a que la majoria de neurones participin de forma simultània en diversos circuits neuronals⁷.

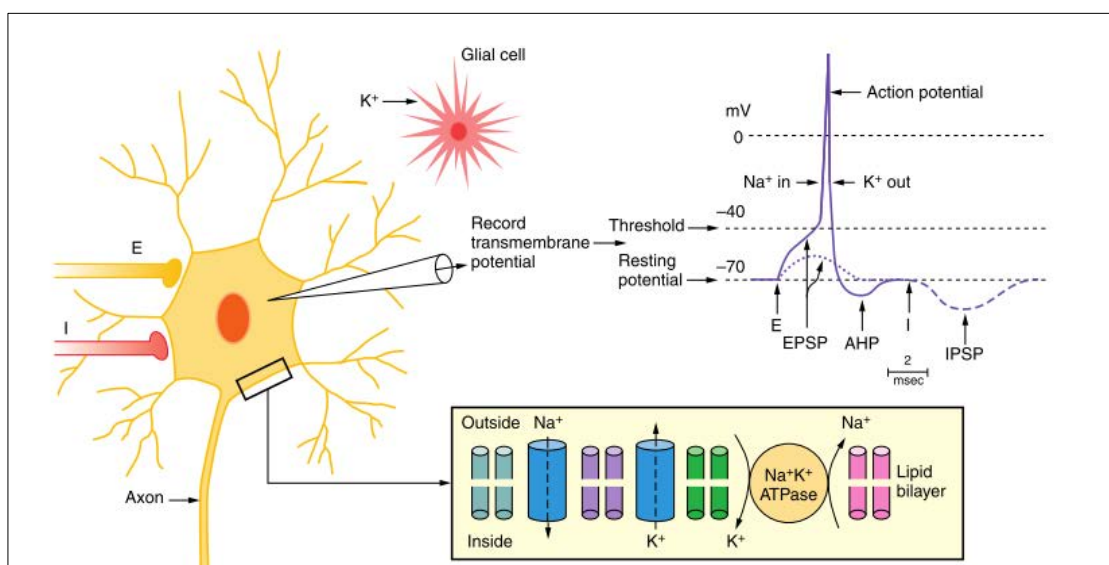


Figura 1 | Funcionament fisiològic de la xarxa neuronal i activació neuronal per potencial d'acció. L'activació normal d'una neurona s'esquemmatitza, en primer lloc amb la sinapsi amb una neurona excitatòria (E) i una inhibidòria (I). La representació dels canals iònics de membrana amb el sentit del bombeig iònic indicat donen com a resultat la generació d'un potencial d'acció on l'activació de la neurona excitatòria (E), genera potencials d'acció postsinàptics excitadors (EPSP) fins a assolir el llindar de despolarització. Al potencial d'acció hi segueix un estat de posterior hiperpolarització (AHP) el qual determinarà el període refractari. Quan l'estímul prové de la neurona inhibidòria (I), es genera un potencial postsinàptic inhibitori (IPSP) impeding l'excitació neuronal. (*Extreta de Pediatric Epilepsy: An Overview*¹²)

Adicionalment a les neurones i el seu funcionament, es coneix que la comunicació polaritzada entre neurones a través dels potencials d'acció està fortament influenciada per tipus cel·lulars no neuronals englobats en la població cel·lular anomenada glia (astròcits, oligodendròcits, microglia i cèl·lules endimàries). La glia no transmet

potencials d'acció, tot i això, es comunica tant amb les neurones a través d'interaccions entre receptors de membrana i molècules senyalitzadores, com amb altres cèl·lules glials a través de senyals químics o *gap junctions*. Aquestes cèl·lules ajuden a les neurones a propagar l'impuls nerviós, com ara mielinitzant els axons (oligodendròcits) o modulant la comunicació interneuronal a través de l'alliberament o eliminació de neurotransmissors i neuromoduladors per glia perisinàptica (astròcits)³

1.2.La neurotransmissió

La transmissió de l'impuls nerviós consta de dos components diferents, la transmissió del potencial d'acció dins una mateixa neurona i la transmissió del senyal a través de la unió sinàptica entre dues cèl·lules a partir de neurotransmissors⁸

1.2.1. Transmissió nerviosa per potencial d'acció

La conducció nerviosa es realitza a través de la superfície de la neurona gràcies a ones de potencial elèctric de membrana. Quan una d'aquestes ones entra en contacte amb la dendrita o l'axó, s'altera momentàniament el potencial de repòs de la membrana en aquell punt convertint-se en un potencial d'acció en moviment que dona lloc a l'impuls nerviós (Figura 1). El mecanisme clau que desencadena els canvis de potencial és la permeabilitat dels ions a través de la membrana, sigui per difusió o per proteïnes intermembrana.

El potencial de repòs és de -61mV i ve definit per una major proporció de ions potassi dins la cèl·lula mentre que el sodi es troba augmentat a l'espai extracel·lular. Al llarg de la membrana neuronal hi ha canals específics dependents de voltatge que faciliten el transport de ions a través de la membrana en funció del potencial. El potencial d'acció té lloc quan augmenta el potencial de membrana per sobre de -40mV , desencadenant l'obertura dels canals que permetran l'entrada de sodi a l'interior cel·lular creant una diferència de potencial de valors positius (fase de despolarització). A continuació, per a compensar, s'atura l'entrada de sodi i s'obren els canals de potassi per a reduir-ne la concentració intracel·lular, i d'aquesta manera repolaritzar la membrana creant un període refractari en què no es pot transmetre un segon impuls durant uns mil·lisegons. Aquest dura fins que es recupera l'equilibri iònic que defineix el potencial de repòs de membrana. Amb aquest procés, es manté el potencial d'acció al llarg de la neurona, sent un fenomen de tot o res, ja que només aquells impulsos que superin el llindar d'activació donaran lloc a transmissió nerviosa. De la mateixa manera es manté un control del nombre d'impulsos rebuts gràcies al període refractari.

1.2.2. Transmissió nerviosa per neurotransmissors

La comunicació entre neurones al cervell es dona, tal com s'ha descrit anteriorment, a través de les sinapsis utilitzant com a senyal missatgers químics anomenats neurotransmissors. Aquests són alliberats pel terminal presinàptic quan el potencial d'acció arriba a l'extrem distal de l'axó on, mitjançant una descàrrega de calci intracel·lular, s'activa la fusió de les vesícules presinàptiques amb la membrana. Un cop alliberat, el neurotransmissor s'uneix amb el seu receptor corresponent situat a la membrana postsinàptica. Aquests receptors pateixen un canvi conformacional a conseqüència de la interacció, desencadenant una cadena de senyalització intracel·lular que portarà a la propagació d'un flux d'ions al llarg de la membrana de la neurona postsinàptica⁹.

La complexa xarxa que representa el sistema nerviós humà està formada per combinacions de diferents sinapsis i neurotransmissors (Taula 1). Una neurona pot rebre dos tipus d'estímul sinàptic, excitatori o inhibitori, en funció de les propietats de la connexió, tant pel que fa a la velocitat d'acció com al tipus de resposta⁸. La combinació d'aquests estímuls dona lloc a un equilibri excitació-inhibició molt important per al control de l'excitabilitat neuronal.

El principal neurotransmissor excitatori al sistema nerviós central és el glutamat, mentre que els senyals inhibitoris vénen donats, principalment, per la glicina a la mèdulla espinal, i l'àcid γ -aminobutíric (GABA) al cervell. Per altra banda, l'acetilcolina, el quart neurotransmissor més rellevant al SNC, pot actuar de forma dual. No obstant això, tots els tipus de sinapsis, ja siguin excitatòries com inhibidores, comparteixen dues característiques semblants. En primer lloc, els receptors implicats pateixen un fenomen de renovació (*turn over*) periòdic a través del tràfic de proteïna entre els punts sinàptics de la superfície cel·lular i les estructures endosòmiques a través d'un procés d'endocitosis constitutiva. En segon lloc, la localització dels receptors a la correcta posició del terminal sinàptic ve donada per un conjunt de proteïnes intracel·lulars que en faciliten l'ancoratge amb el citoesquelet cel·lular. Per a cada tipus de receptor les proteïnes implicades varien, donant una *clustering* característica segons el tipus de sinapsis¹⁰.

Taula 1 | Principals neurotransmissors i receptors postsinàptics. Classificació dels sistemes de neurotransmissió i principals punts d'expressió del sistema nerviós central

NT	Funció	Receptor ionotòpic	Receptor metabotròpic	Lloc d'acció
D-Aspartat	Excitatori	NMDA	NA	Còrtex, cerebel i medul·la espinal
Glutamat	Excitatori	NMDA, kainate, AMPARs	mGluRs	Còrtex, cerebel i medul·la espinal
Glicina	Inhibitori	NMDA, GlyR	NA	Medul·la espinal
GABA	Inhibitori	GABA _A , GABA _{A-p}	GABA _B	Encèfal, medul·la espinal
Norepinefina	Dual	NA	Adrenoreceptors	Encèfal, locus coeruleus, hipotàlem
Dopamina	Inhibitori	NA	Rc dopamina	Substància negra, diencèfal, hipotàlem
Serotonina	Inhibitori	5-HT ₃	Rc serotonina	Nucli del rafe, protuberància i mesencefal
Histamina	Excitatori	NA	Rc histamina	Encèfal, hipotàlem
Acetilcolina	Dual	nAChRs	mAChRs	Ganglis de la base, còrtex motor, hipocamp

NT: neurotransmissor; Dual: excitatori i inhibitori; Rc: receptor; NA: no aplica

▪ Sinapsi excitatòria

El glutamat s'encarrega de la majoria de neurotransmissions excitatòries al cervell a través de diferents tipus de receptors de glutamat, ionotròpics i metabotròpics.

Els receptors ionotròpics, els quals són canals iònics activats per lligand, es divideixen en tres grups en funció de les seves propietats electrofisiològiques i farmacològiques. El receptor *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate* (AMPA) i el receptor de kainat donen lloc, principalment, a respostes electrofisiològiques ràpides al glutamat, mentre que els receptors *N-methyl-D-aspartate* (NMDA) intervenen en la neurotransmissió de fase lenta i, alhora, estan implicats en la plasticitat sinàptica per la seva capacitat de detectar la presència simultània d'activitat sinàptica en diferents punts de la mateixa cèl·lula. Per altra banda, els receptors metabotròpics de glutamat desencadenen una cascada de senyalització a través de proteïnes G al terminal postsinàptic com a conseqüència de l'alliberació de glutamat a l'espai sinàptic.

Ambdós tipus de receptors són necessaris per al correcte funcionament neuronal, per tant, la seva correcta constitució i distribució espacial al llarg de la membrana postsinàptica definiran la funcionalitat de cada sinapsi. Addicionalment, existeixen

molècules intracel·lulars que col·laboren en la correcta funcionalitat i disposició dels receptors, i tenen també un impacte important en l'eficiència de la sinapsi¹¹.

▪ **Sinapsi inhibidòria**

Tant el GABA com la glicina són neurotransmissors que intervenen en la inhibició ràpida del SNC a través de l'activació de diferents tipus de canals iònics permeables a clorur dels terminals postsinàptics. Aquests receptors ionotrópics són canals iònics activats per lligand, els quals tenen una estructura en heteropentàmers constituïts per diferent combinació de subunitats. A diferència de les sinapsis excitatòries, els canals implicats en la inhibició, augmenten la concentració de clorur intracel·lular, disminuint el potencial per sota del de repòs, i d'aquesta manera, dificultant l'inici d'un potencial d'acció⁶.

Els receptors de glicina, neurotransmissor inhibitori específic de mèdula espinal, poden constituir-se a partir de dos tipus de subunitats: subunitat α , la qual conté quatre isoformes, i la subunitat β d'isoforma única. Els pentàmers que constitueixen aquests receptors acostumen a estar formats per tres subunitats α i dues β , tot i que també es poden trobar homopentàmers α , especialment als estadis inicials de desenvolupament neuronal.

Els receptors ionotrópics GABA es diferencien en GABA_A i GABA_C. Els primers es divideixen en set subfamílies amb múltiples isoformes cada una: α (6 isoformes), β (3 isoformes), γ (3 isoformes) i δ , ϵ , θ i π d'isoforma única. Això dona lloc a una àmplia varietat de receptors GABA_A expressats de forma heterogènia tant temporalment com espacialment al cervell. Tot i això, es postula que la majoria de subtipus de receptor GABA_A expressats fisiològicament estan constituïts per 2 α :2 β :1 γ . La necessitat de tenir sinapsis GABAèrgiques amb diferents propietats i funcions, explicaria el motiu pel qual existeixen tants subtipus diferents de receptors GABA_A. De la mateixa manera, s'ha descrit que la diversitat de subunitats podria ser important per a la localització subcel·lular del receptor, aspecte que s'ha observat en les neurones piramidals de l'hipocamp. Contrastant amb la gran varietat dels receptors GABA_A, els GABA_C tenen una estructura molt més simple formada únicament per tres subunitats diferents ρ , que donaran lloc a pentàmers tant homomèrics com heteromèrics. Alhora, mentre que els receptors A estan distribuïts àmpliament pel cervell, els receptors C restringeixen la seva expressió a la retina¹⁰.

Per altra banda, també trobem els receptors metabotrópics GABA_B, els quals se situen tant a la membrana del terminal presinàptic com a la del postsinàptic. Aquest fan la seva funció a través de la unió a proteïnes G, i controlen la conductivitat de calci i potassi. A diferència dels receptors ionotrópics GABA_A que generen un potencial postsinàptic ràpid, d'alta conductivitat i inhibitori proper al cos cel·lular, els receptors GABA_B donen lloc a potencials postsinàptics lents, de llarga durada i de baixa conductivitat, principalment a les dendrites¹².

▪ Sinapsi colinèrgica

L'acetilcolina (ACh) és un neurotransmissor que a la vegada també pot actuar com a neuromodulador en relació a funcions cognitives. Tot i estar ampliament distribuït pel SNC, s'ha descrit que la seva principal influència es dona sobre les neurones corticals i hipocampals¹³, i la seva acció pot resultar en sinapsis excitatòria o inhibitoria en funció del receptor al qual s'uneixi⁸. Existeixen dos tipus principals de receptors colinèrgics, els receptors nicotínics i els muscarínics. Ambdós estan expressats tant al terminal presinàptic com al postsinàptic, i estan distribuïts per tot el sistema nerviós.

Els receptors nicotínics són canals catiónics excitatoris, ja que la seva activació resulta en una despolarització de la membrana cel·lular. Estan formats per la combinació de cinc subunitats diferents, les quals confereixen diferents propietats fisiològiques i farmacològiques a cada subtipus de receptor. Actualment hi ha nou isoformes de la subunitat α i tres de la β . La seva funció principal es duu a terme a l'hipocamp, especialment a les neurones piramidals i a les interneurons GABAèrgiques, on els receptors més abundants són l'homòmer format per cinc subunitats de $\alpha 7$ i l'heteròmer $\alpha 4\beta 2$. Per altra banda, els receptors muscarínics estan acoblats a proteïnes G, les quals seran responsables de donar una funció diferencial entre els cinc subtipus diferents de receptors. Els receptors M1, M3 i M5 estan acoblats a proteïna Gq i són excitatoris, en canvi, els subtipus M2 i M4 s'acoblen a proteïna Gi/o i són inhibitoris. Els receptors M1, M2 i M4 s'expressen tant pre com postsinàpticament, tot i que M1 té major expressió en somes i dendrites i M2 i M4 als terminals sinàptics. En concret, el receptor M1 s'ha descrit com el subtipus més abundant a sistema nerviós central i té un paper important en la regulació de l'excitabilitat de les neurones de l'hipocamp¹⁴.

1.3. Establiment de la xarxa neuronal

El desenvolupament de la xarxa neuronal, i per tant de les seves connexions, ve determinat per diferents nivells d'expressió de determinades proteïnes als diferents cons axonals de creixement.

Les diferents vies implicades en el mecanisme de guia d'axons seran les responsables de l'estructura de les projeccions axòniques, la migració cel·lular, la sinaptogènesi i la dinàmica de proteïnes, a través de diversos mecanismes principals. El mecanisme més conegut és el control de l'estructuració del citoesquelet a nivell local, però també ha estat descrit que aquestes vies intervenen en la regulació de l'expressió de gens implicats en el control d'aquests processos del desenvolupament. Els senyals de la guia d'axons també indueixen a la translocació de proteïnes específiques necessàries per a induir la resposta del con axonal. Aquest mecanisme intervé en el direccionament i ramificació axonal durant el seu creixement, així com en la sinaptogènesi¹⁵.

La sinaptogènesi s'inicia a través d'interaccions proteïna-proteïna específiques expressades als terminals pre i postsinàptics¹⁶. Per una banda, els receptors ionotòpics de glutamat (NMDAR i AMPA) i els GABAèrgics i de glicina són imprescindibles per a la generació de les sinapsis. La senyalització a través de NMDAR i receptors GABA és important per al desenvolupament de les sinapsis GABAèrgiques, mentre que els receptors AMPA, a través de diferents vies de senyalització, regulen preferentment la generació de sinapsis excitatòries. Per altra banda, l'alliberament de calci resultant de la despolarització de les neurones, activa un programa d'expressió gènica al nucli que inclou els gens IEGs (*immediately-early genes*)¹⁷. Aquests presenten diferents finestres d'activació cinètica, postulant la regulació de la transcripció com a mecanisme clau de plasticitat i maduració dels circuits neuronals, tant a curt com a llarg termini. CREB, la proteïna d'unió en resposta a cAMP, ha estat un dels elements reguladors del desenvolupament i plasticitat sinàptica. Arc, és un altre element que regula el tipus de dendrites, l'eliminació de sinapsis redundants i l'activitat dels receptors AMPA encarregats de la potenciació a llarg termini (LTP) i la depressió a llarg termini (LTD). La majoria de IEGs es poden agrupar en funció del tipus de sinapsis que regulen; en l'establiment de les inhibidores o GABAèrgiques hi intervenen Npas4, Nfas186, les semaforines (SEM), les neuroligines (NLGNs) i el receptor tirosina quinasa TrkB. En l'organització de les sinapsis excitatòries les neurexines (NRXN) tenen un paper important juntament amb GLutD2, Cbln1¹⁸. Homer1a regula negativament les estructures de les sinapsis

glutamatèrgiques a través de la regulació de l'homeostasi del calci i la localització dels receptors de glutamat. Finalment, les molècules d'adhesió cel·lular sinàptiques (SynCAMs), contribueixen tant en la sinaptogènesi com en el manteniment de les sinapsis excitatòries, regulant el balanç entre LTP i LTD¹⁹. Aquests elements reguladors, alhora, estan modificats per la traducció i els processos d'*splicing* alternatiu, que resuten en isoformes diferents de cada IEG. Aquests canvis representen un nivell addicional d'especificitat proteica per a controlar la sinaptogènesi al sistema nerviós²⁰.

El conjunt d'aquests senyals que es donen de forma simultània, competeixen per a establir la sinapsis entre neurones principals i interneurons inhibidores, eliminant totes aquelles connexions febles sobrants, per tal d'establir l'estructura adequada per al correcte funcionament de la xarxa neuronal. Alteracions en qualsevol dels elements reguladors implicats en aquest procés tindran com a conseqüència un incorrecte desenvolupament de les connexions entre neurones i de la plasticitat sinàptica. Aquests errors en l'establiment de l'estructura neuronal desencadenen el desenvolupament de trastorns tant del neurodesenvolupament com neuropsiquiàtrics, entre els quals es troben trastorns del comportament, autisme, esquizofrènia, epilèpsia i autisme¹⁷

2. Epilèpsia

Amb una prevalença d'entre 0,5 i 2% entre la població general, l'epilèpsia és una de les malalties neurològiques més freqüents. En gairebé dos terços dels casos d'epilèpsia, l'inici de la malaltia té lloc durant la infantesa o adolescència, tot i això, la màxima taxa d'incidència se situa durant el primer any de vida, la qual va disminuint amb l'edat, fins a la vellesa que torna a augmentar de nou²¹.

El concepte d'epilèpsia ha evolucionat des del 1981 quan la Lliga Internacional Contra l'Epilèpsia (ILAE), màxima autoritat acadèmica de la comunitat de l'epilèpsia, en va fer la primera definició²². L'any 2005 es va definir com a trastorn del cervell caracteritzat per una forta predisposició a generar convulsions epilèptiques juntament amb les conseqüències neurobiològiques, cognitives, psicològiques i socials d'aquesta condició. Aquesta definició requeria, almenys, haver sofert una convulsió epilèptica, és a dir, un succés transitori de signes i/o símptomes a causa d'un excés o sincronia anormal de l'activitat del cervell²³.

Tradicionalment, la definició es refereix al terme trastorn o família de trastorns per emfatitzar que compren moltes malalties i condicions diferents. Aquesta concepció, però, va ser modificada el 2014 per un grup de treball de la Lliga Contra l'Epilèpsia (ILAE), considerant l'epilèpsia com a una malaltia del cervell que compleix les següents premisses²⁴.

1. Un mínim de dues crisis epilèptiques no provocades o reflexos separades per més de 24 hores.
2. Una crisi epilèptica no provocada o reflexa amb una probabilitat de patir més crisis similar al risc general de recurrència en els 10 anys següents a les dues convulsions descrites a la premissa 1. Aquest risc es considera major al 60%, i ve determinat per diferents evidències que incrementen la probabilitat de tenir convulsions addicionals, com ara una activitat epileptiforme a l'EEG o una anomalia potencialment epileptogènica a la imatge cerebral²⁵
3. Diagnòstic d'una síndrome epilèptica.

La ILAE també admet que l'epilèpsia no és necessàriament una malaltia crònica per a tota la vida, sinó que es podria considerar resolta en aquells casos que hagin patit una

síndrome epilèptica dependent de l'edat però que han estat lliures de crisis durant els següents 10 anys i sense tractament antiepilèptic durant un mínim de 5 anys²⁴.

2.1. Fisiopatologia de l'epilèpsia

L'estudi dels mecanismes epilèptics, incloent-hi tant models animals com humans, s'han dut a terme durant segles. No obstant això, la recerca específica de l'epileptogènesi, és a dir, el fenomen per el qual el sistema nerviós es capaç de generar convulsions espontànies donant lloc al desenvolupament de la condició d'epilèpsia i/o progressió d'aquesta fins que s'estableix, s'ha potenciat en les últimes dècades. El fenomen de l'epileptogènesi consta de tres etapes: esdeveniment inicial desencadenant, seguit per un període de latència que deriva en una fase crònica d'epilèpsia. Aquest, és un procés crònic que pot ser d'origen genètic o adquirit, i que pot perdurar molt de temps després del diagnòstic de l'epilèpsia²⁶

El mecanisme fisiopatològic de l'epilèpsia, però, fins al moment és un procés bastant desconegut, i diferents aproximacions intenten donar explicació a aquest fenomen neurològic. Estudis fisiològics demostren que les crisis epilèptiques reflecteixen un estat d'hiperactivitat transitori, anormal i sincrònic d'una població neuronal del cervell. Aquesta disfunció cerebral pot anar acompanyada d'alteracions motores, sensorials o autonòmiques en funció de la regió del cervell implicada en l'origen i la progressió de la crisi²⁷. Per altra banda, els mecanismes cel·lulars responsables de la generació de crisi epilèptiques impliquen una alteració rítmica o tònica de l'equilibri entre els nivells d'excitació i inhibició neuronals que regulen la conductivitat a través de les membranes¹². Finalment, estudis neuroquímics defensen que les crisis poden ser generades tant per un procés excessivament excitatori en una població de neurones del cervell, com per hipoactivitat en la inhibició neuronal. Aquest mecanisme considera que canvis en les xarxes neuronals, en l'estructura de les neurones, en la síntesi de neurotransmissors i en els seus receptors, en el desenvolupament de la sinapsi o en els canals iònics, així com un desequilibri energètic cel·lular o processos inflamatoris podrien contribuir en la hiperexcitabilitat neuronal i en la generació de crisis epilèptiques²⁸.

Com s'ha comentat en la descripció del funcionament normal del sistema nerviós, la fisiologia de la sinapsi consisteix en la transmissió del potencial d'acció a través de conduccions despolaritzants (a través de l'acció del sodi i del calci) i de conduccions hiperpolaritzants inhibidores, que disminueixen l'excitació neuronal, principalment, a

través de canals de potassi. Existeixen diferents conductivitats per potassi, importants per la regulació del balanç excitació-inhibició¹².

- Conductivitat de filtració (*leak conductance*): determinant principal del potencial de repòs de membrana.
- Rectificador d'internalització (*inward rectifier*): regula l'influx d'altres ions mitjançant la hiperpolarització.
- Rectificadors retardats: implicats en la finalització del potencial d'acció i la repolarització del potencial de membrana de les neurones.
- Corrent A: determina l'interval entre pics d'excitació (*interspike interval*) que afecta l'activació de la cèl·lula.
- Corrent M: activada per agonistes de receptors muscarínics colinèrgics que afecta tant al potencial de repòs de membrana com a l'activació de la neurona.
- Conductivitat de potassi activada per calci: sensible a concentracions intracel·lulars de calci afectant l'activació de la cèl·lula i l'interval de conjunts de pics (*interburst interval*).

La inhibició sinàptica, clau per al control de l'excitabilitat neuronal, està determinada per dos circuits bàsics. En primer lloc, una inhibició retrògrada (*feedback*) que té lloc quan les neurones excitatòries principals, sobretot glutamatèrgiques, estableixen sinapsis activant interneurons inhibidores, especialment GABAèrgiques. Aquestes, alhora, presenten projeccions inhibidores cap a les neurones principals (bucle de *feedback* negatiu). Un segon mecanisme és el la inhibició de l'activació progressiva (*feed-forward inhibition*) consistent en la sinapsi directa les interneurons inhibidores amb els axons, aturant la propagació del potencial d'acció a les següents neurones principals.

Tot i la importància del sistema glutamatèrgic i GABAèrgic en el control de l'excitabilitat, hi ha un ampli ventall de receptors i canals implicats també en la correcta transmissió del senyal nerviós, raó per la qual, per a molts d'ells es postula un paper important en el desenvolupament de l'epilèpsia (Taula 2). Amb tot això, si aquest esquema de connexions sinàptiques s'extrapola a milers de contactes sinàptics, és

fàcil dibuixar un sistema fàcilment alterable per un grup de neurones, o inclús una neurona sola, que en estat d'hiperexcitabilitat, propagui ràpidament per les zones adjacents l'impuls elèctric anormal sobreposant-se al poder dels sistemes inhibitoris que normalment mantenen l'excitabilitat aberrant controlada¹². Els mecanismes fisiopatològics específics de l'epilèpsia estan implicats en cada un dels estadis de l'evolució de les crisis epilèptiques: transició del patró normal d'activació neuronal a trens interictals epileptiformes, transició de l'activació neuronal interictal a l'activitat convulsiva, i finalment, transició de la crisi a l'estat postictal.

Taula 2 | Rols dels canals i receptors implicats en la transmissió de l'impuls nerviós de forma fisiològica i en el desenvolupament epilèptic (Adaptada del llibre *Pediatric Epilepsy: An Overview*¹²)

Receptor o canal	Rol fisiològic	Rol en l'epilèpsia
Canal de sodi activat per voltatge	Llindar per al potencial postsinàptic excitatori; promoció del potencial d'acció	Activació repetitiva del potencial d'acció
Canal de potassi activat per voltatge	Atenuació del potencial d'acció	Repolarització anormal del potencial d'acció
Canal de potassi dependent de calci	Potencial d'acció després de hiperpolarització; fixa el període refractari	Limita l'activació repetitiva
Canal de calci activat per voltatge	Alliberament dels transmissors; porta la càrrega despolaritzant de les dendrites al soma	Alliberament excessiu de transmissors; activa processos intracel·lulars fisiopatològics
Receptor No-NMDA	Potencial postsinàptic excitatori ràpid	Inicia el canvi de despolarització paroxística
Receptor NMDA	Potencial postsinàptic excitatori lent i prolongat	Mante el desplaçament de despolarització paroxística; activa processos intracel·lulars fisiopatològics a través del calci
Receptor GABA_A	Potencial postsinàptic inhibitori	Limita l'excitabilitat
Receptor GABA_B	Potencial postsinàptic inhibitori prolongat	Limita l'excitabilitat
Sinapsis elèctriques	Transmissió excitatòria ultraràpida	Sincronització de l'activació neuronal
Bomba sodi-potassi	Restableix l'equilibri iònic	Prevenició de la despolarització induïda per potassi

L'EEG és el procediment clínic a través del qual es pot obtenir gràficament una representació de l'activitat elèctrica cerebral superficial. En l'estudi d'un cervell sense activitat anòmla, l'activitat cortical sol ser de baix voltatge i no sincrònica entre neurones, és a dir, no s'activen totes a la vegada sinó que hi ha una transmissió del senyal progressiu entre cèl·lules. El potencial d'acció anòmla amb capacitat de generar

una crisi epilèptica pot tenir una traducció elèctrica a l'EEG. En una fase interictal es veurien pics grans d'activació focal que representarien l'activació sincrònica d'una àmplia població de neurones hiperexcitables²⁹.

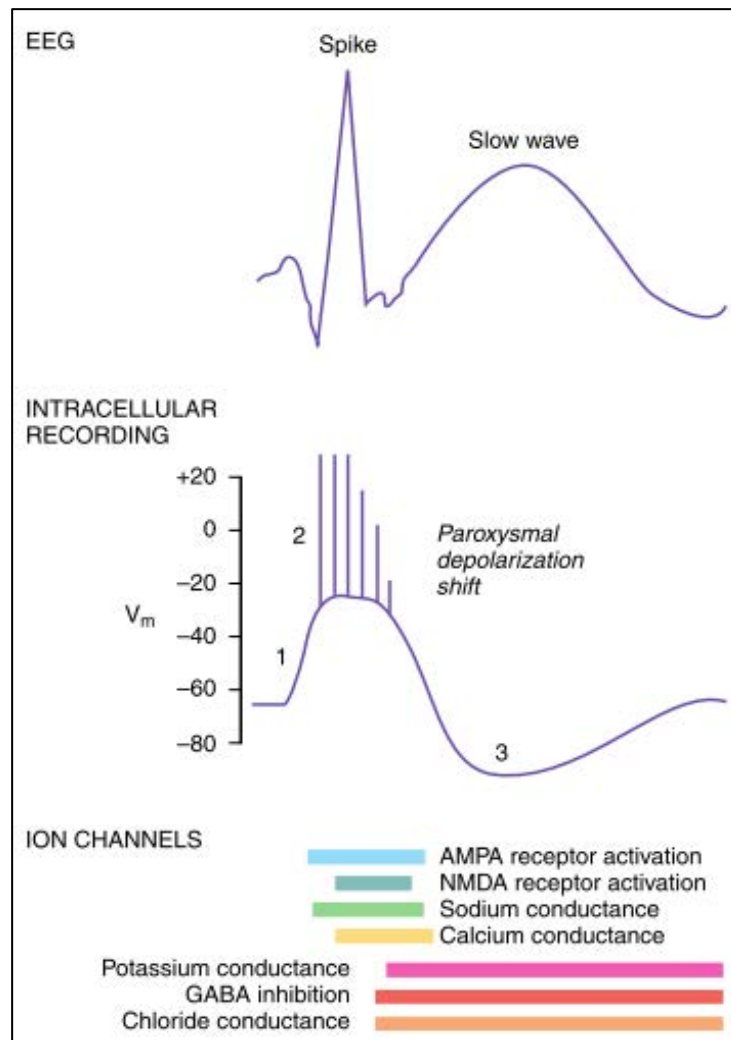


Figura 2 | El desplaçament de despolarització paroxíctic (PDS) és la correlació intracel·lular dels pics interictals registrats pel EEG de la superfície. Representació de la correlació temporal entre la descàrrega epileptiforme interictal captada per l'EEG, el potencial de membrana registrat intracel·lularment i els canvis de conductàncies iòniques. Els diferents punts del registre intracel·lular corresponen a la fase inicial de despolarització EPSP (1), seguida d'un tren de potencials d'acció per a superar el llindar de despolarització (2) i repolarització i posterior hiperpolarització (3) per recuperar el potencial de repòs (Extreta del llibre *Pediatric Epilepsy: An Overview*¹²)

Aquesta activació s'expandeix en el temps de forma prolongada en comparació amb l'excitació neuronal fisiològica que se sincronitza progressivament. Si al finalitzar aquesta fase la inhibició falla, pot donar lloc a una fase ictal consistent en una ona de propagació marcada per una cadena de pics d'activació. La correlació intracel·lular de la descàrrega epilèptica interictal focal observada a l'EEG s'anomena desplaçament de despolarització paroxíctic (PDS). Aquest és iniciat per un potencial excitatori postsinàptic (EPSP) ràpid mediat per receptors no-NMDA, i sostingut per un EPSP més llarg i lent dependent de NMDA, generant així un tren repetitiu de potencials d'acció durant centenars de mil·lisegons (Figura 2). A continuació, la neurona s'estabilitza de forma temporal gràcies a la hiperpolarització post-PDS, però si aquesta falla, s'iniciaria una descàrrega ictal fins a recuperar el potencial de repòs, on dependent dels tipus de conductivitat inhibidòria implicada s'estableix un període refractari de determinada duració¹².

Existeixen altres mecanismes independents de la transmissió sinàptica química capaços de sincronitzar l'activació neuronal sota determinades circumstàncies. Alguns d'aquests mecanismes moduladors no sinàptics són:

- Gap junctions: permeten el pas directe dels senyals elèctrics entre cèl·lules. S'han descrit com a sobreregulades en el cervell epilèptic, i el seu bloqueig afecta la durada de l'activitat epilèptica de forma significativa.
- Efectes del camp elèctric: el flux de corrent a l'espai extracel·lular influeix el comportament de la neurona fins al punt que podria potenciar una sincronització neuronal epileptogènica.
- Canvis en la concentració de ions extracel·lulars: l'exemple més clar, potser, és el cas del potassi. Increments en la seva concentració extracel·lular afecten l'excitabilitat epilèptica i la sincronització, fins al punt que el bloqueig dels seus canals origina clars efectes epilèptics.

En aquesta mateixa línia s'ha reportat la contribució de mecanismes gials per a modular l'epileptogènesi, sobretot degut a la necessitat de restablir l'homeòstasi iònica dels compartiments intracel·lular i extracel·lular després de qualsevol potencial d'acció. Els astròcits concretament, regulen els nivells de potassi extracel·lular i com a conseqüència modulen les descàrregues neuronals, ja que el bloqueig dels canals de potassi gials resulten en hiperexcitabilitat. Un segon mecanisme glial que regula

l'epileptogènesi és l'eliminació de glutamat extracel·lular de l'espai sinàptic, paper essencial per a aturar l'excitació sinàptica que aquest neurotransmissor produeix. La regulació del pH a través d'intercanviadors de protons o transportadors de bicarbonat també és un mecanisme important ja que hi ha receptors, com els NMDA, que en són molt sensibles. Finalment, la secreció d'altres factors relacionats amb la glia podrien afectar el nivell d'excitabilitat neuronal¹².

2.2. L'hipocamp i l'excitabilitat neuronal

Cada regió del cervell té diferents propietats intrínseques de membrana, una organització sinàptica i densitat cel·lular pròpia i un patró característic d'interconnectivitat cel·lular. Aquestes propietats resulten en una predisposició diferencial de cada zona per a generar crisis epilèptiques. El neocòrtex i l'hipocamp són regions particularment propenses a generar-ne, però especialment la xarxa hipocampal implicada en circuits d'aprenentatge espacial i processos de memòria, ha estat extensament estudiada gràcies a la seva relació amb l'epileptogènesi³⁰.

La formació hipocampal, situada al lòbul temporal, està formada per quatre regions principals: el gir dentat, l'hipocamp (que conté entre d'altres estructures la banya d'Ammon), el subículum i el còrtex entorhinal. A més, la regió de l'hipocamp es caracteritza per estar dividida en subregions laminars de neurones piramidals anomenades CA1, CA2 i CA3. Les quatre regions de la formació estan íntimament connectades per múltiples bucles excitatoris *feed-forward*, és a dir, llargues connexions unidireccionals excitatòries, restringides per mecanismes inhibitoris tant *feedforward* com *feedback*. D'aquesta manera es crea l'anomenat circuit trisinàptic de projecció anterògrada (*forward-projecting trisynaptic circuit*) (Figura 3). Aquest, s'inicia a les neurones de la segona capa del còrtex entorhinal, el qual projecta els axons a través de la via perforant (*perforant pathway*) cap al gir dentat, on estableixen sinapsis amb les cèl·lules granulars i les dendrites de les interneurones. El gir dentat és responsable tant de la filtració dels estímuls excitatoris arribats del còrtex entorhinal, com de la prevenció de l'activitat hipersincrònica de l'elevada densitat de neurones piramidals de l'hipocamp. L'activació del gir dentat depèn de diversos mecanismes, els quals inclouen propietats electrofisiològiques intrínseques de les cèl·lules granulars d'aquesta estructura així com la propietat única d'integrar els senyals aferents a les seves dendrites, i també la inhibició a través del sistema GABAèrgic³⁰. Les cèl·lules granulars, neurones més abundants al gir dentat, envien els seus axons, anomenats fibres *mossy*, a generar sinapsis amb les cèl·lules de l'*hilus* dentat. Aquest conté tant neurones piramidals inhibitoris com diferents classes d'interneurones inhibitoris

encarregades de modular l'activitat neuronal en desenvolupament. Les fibres *mossy* de les cèl·lules granulars també sinapten amb les neurones piramidals i les interneurons inhibidores de la regió CA3 de la banya d'Ammon, que projecten connexions a diferents regions utilitzant diverses vies. En primer lloc projecten cap a altres CA3 piramidals a través de col·laterals locals; també ho fan amb col·laterals de Schaffer a la regió CA1 de la banya d'Ammon, i per últim, projecten cap a l'hipocamp contralateral. Aquestes connexions, alhora, generen més connexions, i en concret, les neurones piramidals CA1 dirigeixen els seus axons al complex subicular, les neurones del qual tenen projeccions tant cap al còrtex entorhinal com altres dianes corticals i subcorticals¹².

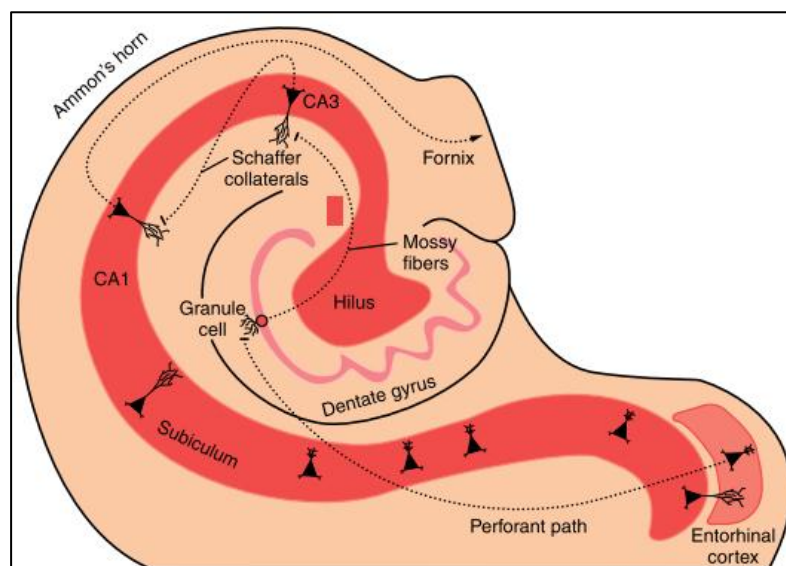


Figura 3 | Esquema de les vies principals de la transmissió sinàptica excitatòria a la formació hipocampal. (Extreta del llibre *Pediatric Epilepsy: An Overview*¹²)

L'hipocamp té la capacitat, en condicions fisiològiques, de filtrar els diferents senyals aferents que li arriben del còrtex entorhinal. L'activitat neuronal sincrònica resultant d'aquests senyals és un efecte intrínsec al mecanisme que utilitza de forma fisiològica l'hipocamp per a realitzar la seva funció, però un excés de sincronia entre les neurones hipocampals podrien generar crisis epilèptiques de forma directa. Les claus del control de la correcta sincronització neuronal hipocampal són les múltiples projeccions divergents de les interneurons inhibidores juntament amb el potencial efecte inhibitori dels receptors GABA_A sobre les conduccions establertes¹². Per aquesta raó, l'alteració de la capacitat inhibidora hipocampal, ja sigui per la pèrdua d'interneurons hipocampals inhibidores, com per canvis en la composició de receptors GABA en les

diferents localitzacions subcel·lulars, afectaria la capacitat de les neurones per atenuar una excessiva excitabilitat donada pels senyals aferents. També s'ha de considerar, però, que modificacions en la connectivitat o funció e la formació hipocampal com podria ser un augment anormal en la neurogènesis i maduració de cèl·lules granulars o una acumulació de fibres *mossy* al gir dentat, podrien contribuir a la hiperexcitabilitat de la xarxa³⁰.

2.3. Classificació de les crisis epilèptiques

La classificació dels diferents tipus de crisis epilèptiques va ser actualitzada l'any 2017 pel grup d'experts en terminologia de la ILAE (Figura 4)³¹. Aquesta classificació, tot i que per ara no respon a la fisiopatologia de cada tipus, ja que és un aspecte encara bastant desconegut, és útil per a diferents aspectes. En primer lloc permet fer agrupacions per a aplicar i testar teràpies en funció de crisis epilèptiques. També proporciona una unificació per a la recerca bàsica, clínica i per a estudis epidemiològics, així com un mateix llenguatge per als clínics que participen en la cura d'un mateix pacient. Finalment, també proporciona un nom a la malaltia que pateixen els pacients i les seves famílies, aspecte psicològicament important per a ells. La classificació proposada per la ILAE divideix les crisis en funció de les característiques que presenten a l'inici de l'esdeveniment, ja que aquestes aniran evolucionant a mesura que es propaguin, implicant un major nombre de xarxes cerebrals en relació a les d'origen.

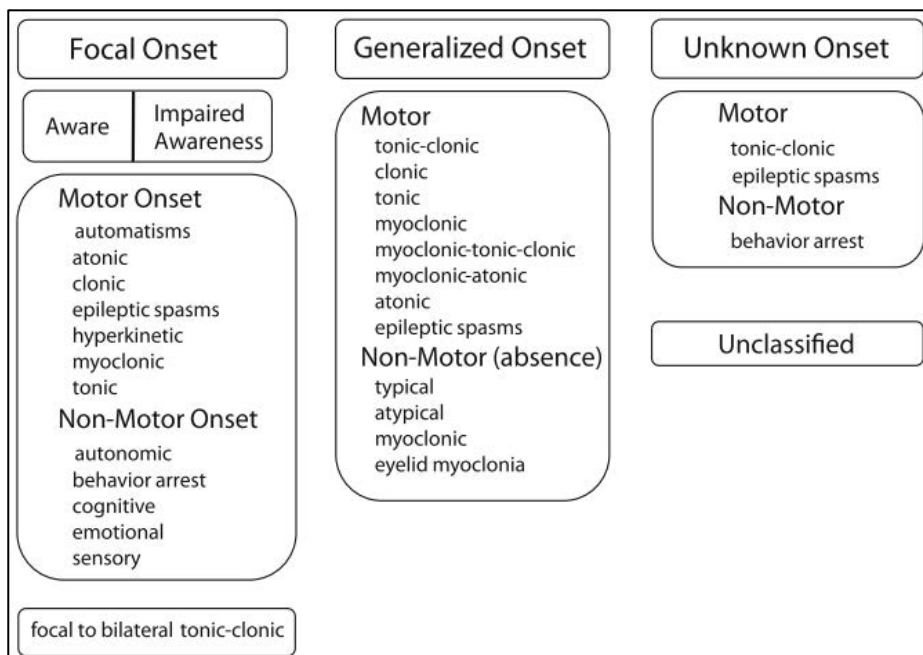


Figura 4 | Classificació de les crisis epilèptiques definida per la ILAE l'any 2017. (Modificada de Fisher, 2017³¹)

La primera gran divisió de les crisis epilèptiques ve determinada per l'origen cerebral, és a dir, es diferencien aquelles que comencen de forma focal (en una sola àrea o hemisferi cerebral), d'aquelles que tenen un inici generalitzat en els dos hemisferis. L'origen es coneix gràcies a la manifestació clínica i/o a l'EEG, tot i que existeix un tercer grup d'origen desconegut. Tot i això, les crisis agrupades en aquest últim estrat poden ser reclassificades a mesura que apareix nova informació del pacient.

Taula 3 | Descripció dels tipus de crisis epilèptiques en funció de la manifestació principal.
Classificació definida a la Figura 4 (*Extreta de Fisher, 2017* ³²)

Tipus de crisi	Descripció
Clonic	Sacsejades rítmiques sostingudes de les extremitats i/o cap durant la convulsió
Myoclònic	Sacsejades irregulars breus de les extremitats, cara o ulls
Hyperkinetic	Sinònim de convulsió hipermotora; implica moviments desordenats amb els braços i amb les cames
Epileptic spasms	Flexió o extensió del tronc juntament amb flexió o extensió dels braços, normalment en clústers
Autonomic	Efecte sobre funcions del sistema nerviós autònom (pressió sanguínea, batec cardíac, etc)
Behavior arrest	Aturada sobtada del moviment, anomenada congelació o pausa, com a efecte dominant de la crisi
Cognitive	Alteració de l'estat cognitiu durant la crisi (llenguatge, percepció...)
Emotional	Sensacions involuntàries no provocades per cap estímul emocional previ (por, ansietat, emoció...)
Sensory	Percepcions no causades per cap estímul (formigueig o adormiment d'una part del cos, percepcions visuals, ...)
Tonic-clonic	Pèrdua immediata de consciència acompanyada de rigidesa de les extremitats (fase tònica), seguida per sacsejades rítmiques sostingudes a les mateixes extremitats i a la cara (fase clònica)
Myoclonic-tonic-clonic	Convulsions tònico-clòniques precedides per sacsejades mioclòniques a ambdós costats del cos
Myoclonic-atonic	Sacsejades mioclòniques seguides d'una caiguda de tò muscular de les extremitats
Typical absence	Aturada sobtada de l'activitat, sovint amb oscil·lacions visuals i balanceig del cap, i altres comportaments automàtics. Recuperació immediata
Atypical absence	Aturada progressiva de l'activitat, sovint amb oscil·lacions visuals i balanceig del cap, i altres comportaments automàtics. Canvis en el tò muscular i recuperació lenta
Eyelid myoclonia	Moviments involuntaris repetitius de la parpella i desviació superior dels ulls

Pel que fa al comportament, dins de les crisis d'origen focal, es diferencien aquelles en les que hi ha una alteració del nivell de consciència de les que la consciència queda preservada. En canvi, les crisis generalitzades per definició van associades a una

pèrdua de la consciència. Per altra banda, a nivell motor, tant en les crisis focals com les generalitzades es diferencien subgrups segons la manifestació clínica entre motores i no motores.

Finalment, l'última subdivisió classifica les crisis en funció de la manifestació principal que ha tingut el pacient (Taula 3), i la descripció es pot complementar amb descriptors addicionals que assenyalin altres signes i símptomes no considerats en la classificació tabulada per la ILAE³².

2.4. Trastorns epilèptics

La classificació de les epilèpsies proposada el 2017 per la ILAE, no només té en compte el tipus de crisis, descrites a l'apartat anterior, sinó que també l'etiologia, les comorbiditats i el quadre clínic ampliat del pacient (Figura 5)³¹.

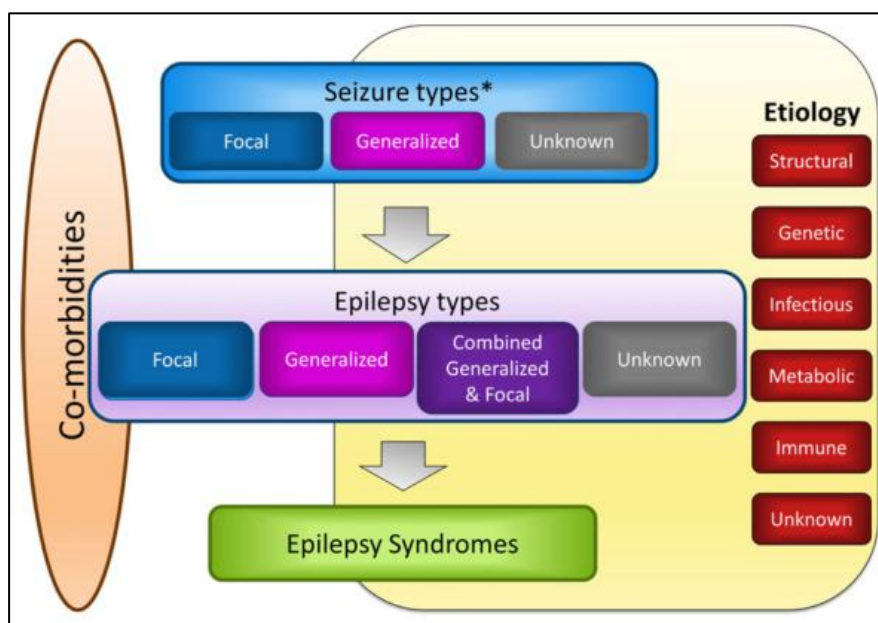


Figura 5. Classificació de epilèpsies segons la definició de la ILAE l'any 2017. (Extreta de Scheffer, 2017³³)

2.4.1. Tipus d'epilèpsia

L'última classificació de la ILAE el 2017³³ va dividir les epilèpsies en quatre grups: focals, generalitzades, combinació de generalitzada i focal i desconeguda. Cada tipus d'epilèpsia pot incloure múltiples tipus de crisis.

El diagnòstic d'epilèpsia és únicament clínic, suportat per les troballes de l'EEG, no sempre presents, per ajudar a la subclassificació, origen i localització, procés en el qual també contribuiran altres exploracions complementàries. En aquest aspecte, les epilèpsies generalitzades es caracteritzen per una activitat elèctrica anòmala amb origen i propagació generalitzada, que es pot veure representada a l'EEG, i que clínicament es pot presentar com a crisis d'absència, mioclòniques, atòniques, tòniques i tònico-clòniques. Les epilèpsies focals, en canvi, inclouen tant trastorns unifocals o multifocals com crisis restringides a un únic hemisferi. Igual que en les generalitzades, les dades clíniques suportades per l'EEG s'utilitzen per a la seva aproximació diagnòstica. L'EEG sol mostrar descàrregues epileptiformes focals.

La nova classificació afegeix les epilèpsies combinades generalitzades i focals com a nou grup, les quals, com el seu nom indica, es caracteritzen per presentar crisis dels dos tipus. L'EEG, en aquest cas, mostra una combinació d'ones i pics característics dels dos grups anteriors, tot i això, l'activitat epileptiforme no es requereix per al seu diagnòstic.

Finalment, el terme desconegut s'utilitza per a denominar aquells pacients afectes d'epilèpsia però on, degut a la disponibilitat insuficient d'informació, el clínic no és capaç de determinar quin tipus pateix.

2.4.2. Etiologia

L'origen de l'epilèpsia en cada pacient és important, especialment de cara al tractament de les crisis³³. Per aquesta raó, l'epilèpsia també es pot classificar segons la seva etiologia:

- Etiologia estructural: anomalies a l'estructura cerebral, de causa genètica o adquirida, que poden ser visibles o no en la neuroimatge. L'assessorament electroclínic juntament amb les troballes a la imatge condueixen a una associació raonable entre l'anormalitat i la causa de les crisis. Exemples en són l'esclerosi hipocampal, els hamartomes hipotalàmics, la síndrome de Rasmussen o hemiplègica -hemiconvulsió-epilèpsia (HHE).
- Etiologia genètica: epilèpsia directament resultant d'una mutació genètica en què les crisis són el principal símptoma de l'alteració. Els criteris que compleixen aquestes epilèpsies són la història familiar, a excepció de les mutacions *de novo*, la implicació de mutacions en un determinat gen en altres pacients amb la

mateixa síndrome i la patogenicitat de la variant. Tot i això, en molts casos s'ha descrit una elevada heterogeneïtat fenotípica i genètica en les síndromes amb aquesta etiologia, molts cops donada per modificadors ambientals o genètics.

- Etiologia infecciosa: es tracta de l'etiologia més freqüent arreu del món, en que les crisis són el símptoma principal resultant d'una infecció coneguda, com ara neurocisticercosi, tuberculosi, VIH, malària cerebral, toxoplasmosi cerebral, infecció congènita pel virus del Zika o citomegalovirus.
- Etiologia metabòlica: casos en què l'epilèpsia resulta directament d'una alteració metabòlica on les crisis en són la principal manifestació. Les causes metabòliques fan referència a defectes metabòlics definits amb manifestacions o canvis bioquímics com per exemple la urèmia, les aminoacidopaties o les crisis dependents de piridoxina. La majoria d'aquests trastorns són genètics tot i que alguns podrien ser adquirits com la deficiència cerebral de folat.
- Etiologia immune: alteracions on les crisis són conseqüència directa de trastorns immunes. Un gran nombre d'epilèpsies d'aquest tipus han estat reconegudes amb presentacions característiques tant en adults com en nens.
- Etiologia desconeguda: com el nom indica, la causa de l'epilèpsia encara es desconeix, degut a impossibilitat d'arribar a un diagnòstic específic a part de la semiologia electroclínica bàsica.

Tot i això, l'epilèpsia de cada pacient pot estar classificada sota més d'una etiologia, com podria ser el cas de l'esclerosi tuberosa, la qual té un component genètic donat per variants que afecten els gens *TSC1* i *TSC2* implicats en la via que regula la divisió cel·lular (mTOR), important de cara a un possible tractament farmacològic, però a la vegada té un component etiològic estructural de malformacions cerebrals, crucial per a possibles aproximacions quirúrgiques.

2.4.3. Comorbiditats

Cada cop va creixent més la certesa que la majoria d'epilèpsies van associades a comorbiditats com ara d'aprenentatge (retard intel·lectual), psicològiques (trastorn de l'espectre autista o depressió) i problemes de comportament.

En epilèpsies més greus es poden observar un rang de comorbiditats més ampli que inclouen dèficits motors com ara paràlisi cerebral o deteriorament de l'activació neuronal, trastorns del moviment, escoliosi, alteracions del son i gastrointestinals. És important la consideració de la presència de comorbiditats per part del clínic, permetent una identificació precoç, un diagnòstic millor i un tractament apropiat.

2.4.4. Síndromes epilèptiques

La síndrome epilèptica es defineix com un conjunt de característiques incloent tipus de crisis epilèptiques, resultats d'EEG i trets d'imatge que tendeixen a donar-se junts. Acostumen a tenir propietats dependents de l'edat com ara l'edat de debut o de remissió, el desencadenant de les crisis i variacions diürnes. Alhora poden presentar diferents tipus de comorbiditats, etiologies, prognosis i respostes al tractament.

Hi ha moltes síndromes epilèptiques reconegudes, com ara l'epilèpsia amb absència de la infantesa, la síndrome de West o la síndrome de Dravet, entre d'altres, però la ILAE no disposa de cap classificació formal actualitzada de totes elles en funció del tipus de crisis i tipus d'epilèpsia. Tot i això, el 2010 es va publicar una classificació de les síndromes electroclíniques i altres epilèpsies conegudes (Taula 4)³⁴, i en els últims anys, la ILAE ha proporcionat eines per a donar suport al diagnòstic clínic, on classifica les diferents síndromes, segons l'edat de debut i l'etiologia de les crisis.

3. Encefalopaties epilèptiques

Les encefalopaties epilèptiques (EE) engloben les entitats on s'accepta que l'activitat epilèptica que per ella mateixa contribueix a alteracions severes a nivell cognitiu i de comportament que poden empitjorar amb el temps, més enllà del que s'esperaria per la patologia de base. Aquestes alteracions poden donar-se tant a nivell global com més específic i presenten una gran variabilitat de severitat³⁴. Una de les característiques comunes més rellevants de les EE és que solen ser refractaries als tractaments antiepilèptic estàndard (FAEs), dificultant-ne l'abordatge. Per això, altres autors han ampliat la definició oficial de la ILAE considerant les EE com un grup concret d'epilèpsies extremadament intractables i sovint relacionades amb l'edat que es caracteritzen per convulsions menors generalitzades i anomalies epilèptiques massives a l'EEG. Ambdues característiques causarien un estancament o deteriorament en les funcions mentals i cognitives, a part d'un desenvolupament deficitari com a conseqüència d'un dany orgànic al cervell³⁵.

En la seva definició hi va implícit el fet que les crisis empitjoren el curs clínic en el desenvolupament del cervell, ja sigui per causes adquirides com podria ser un ictus o una encefalopatia hipoxicoisquèmica, o bé per causes genètiques, el que sembla ser el rerefons de la causa de l'epilèpsia. A partir d'aquest concepte, és important diferenciar entre dos tipus d'EE per tal d'estudiar correctament els diferents casos. En primer lloc, existeixen les epilèpsies en què la disfunció cognitiva i del desenvolupament és resultat directe de canvis continuats en l'EEG. Dins d'aquest grup s'hi engloben, entre d'altres, la síndrome Landau-Kleffner o l'epilèpsia amb absències de la infantesa tardana. Aquestes es podrien considerar com a EE primàries en què l'activitat epilèptica condueix directament a un empitjorament cognitiu i de comportament en pacients amb un desenvolupament previ normal. Un segon grup inclouria pacients on l'alteració cognitiva ja és present en el moment de debut de les crisis i on els aspectes cognitius són conseqüència de l'etiologia desencadenant que altera el correcte desenvolupament de la xarxa neuronal. En aquest cas, l'activitat epilèptica empitjoraria les habilitats intel·lectuals amb el pas del temps generant un empitjorament neurològic. Dins aquest grup s'hi troben les encefalopaties epilèptiques lligades a l'edat amb característiques electroclíniques típiques, com per exemple la síndrome d'Otahara o l'encefalopatia mioclònica precoç³⁶.

Taula 4. Classificació de les síndromes electroclíniques i altres epilèpsies en funció de l'edat de debut, definida per la ILAE l'any 2010. (Adaptada de Berg 2010³⁴)

Síndromes electroclíniques segons l'edat d'inici	Període neonatal	Epilèpsia neonatal benigna familiar (BFNE) Encefalopatia mioclònica precoç (EME) Síndrome d'Otahara	
	Primera infantesa	Epilèpsia de la infància amb crisis focals migratòries Síndrome de West Epilèpsia mioclònica de la infància (MEI) Epilèpsia benigna infantil Epilèpsia benigna infantil familiar Síndrome de Dravet Encefalopatia mioclònica en trastorns no progressius	
	Infantesa tardana	Convulsions febrils <i>plus</i> (FS+) Síndrome Panayiotopoulos Epilèpsia amb crisis mioclòniques atòniques Epilèpsia benigna amb pics centrotemporals (BECTS) Epilèpsia autosòmica dominant nocturna del lòbul frontal Epilèpsia occipital de la infantesa tardana Epilèpsia amb absències mioclòniques Síndrome Lennox-Gastaut EE amb punxa-ona contínua durant el son (CSWS) Síndrome Landau-Kleffner (LKS) Epilèpsia amb absències de la infància tardana	
		Adult	Epilèpsia amb absències juvenil (JAE) Epilèpsia mioclònica juvenil (JME) Epilèpsia amb crisis soles tonico-clòniques generalitzades Epilèpsia mioclònica progressiva (PME) Epilèpsia autosòmica dominant amb trets auditius (ADEAF)
			Sense edat específica
Constel·lacions distintives	Epilèpsia del lòbul temporal medial amb esclerosi hipocampal Síndrome de Rasmussen Convulsions gelàstiques amb hamartoma hipotalàmic Síndrome hemiconvulsió-hemiplègia-epilèpsia (HHE) Epilèpsies desconegudes amb convulsions d'origen conegut		
Epilèpsies de causa estructural i metabòlica	Malformacions corticals del desenvolupament Síndromes neurocutànies (Complex d'esclerosi tuberosa, Sturge-Weber) Tumor Infecció Trauma		
Angioma	Dany perinatal Ictus		
Epilèpsies de causa desconeguda			
Altres crisis	Convulsions neonatals benignes (BNS) Convulsions febrils (FS)		

El concepte d'encefalopatia epilèptica s'hauria d'aplicar a les epilèpsies de qualsevol edat de forma més extensa, i no només per aquelles epilèpsies greus amb inici a l'infantesa³³. No obstant això, les EE més greus són les de l'inici de la vida, ja que ocorren sobre el cervell en desenvolupament i tenen un espectre de comorbiditats molt més enllà del retard en el desenvolupament o l'autisme. Aquestes inclouen un ampli ventall de trastorns del comportament, del son, alteracions sensorials de visió i auditiva, disautonomies, disfunció gastrointestinal, trastorns neuromusculars i alteracions del creixement i endocrines. És important remarcar que qualsevol combinació d'aquestes generen una càrrega encara major que les convulsions per si soles, tant pel pacient com per la família. A tot això, cal afegir com a problema a aquesta malaltia, la dificultat de tractament mencionada anteriorment, així com l'elevada taxa de mortalitat precoç en els casos més greus³⁷. Per aquesta raó, la necessitat d'identificar el mecanisme fisiopatològic en cada cas és important tant de cara a l'abordatge clínic del pacient com a nivell psicològic per a la família.

3.1. Encefalopaties epilèptiques d'inici precoç

Les encefalopaties epilèptiques d'inici precoç (EIEE) són formes rares d'epilèpsia amb origen als primers mesos de vida caracteritzades per convulsions intractables, espasmes tòncics o crisis parcials freqüents, juntament amb un patró força característic a l'electroencefalograma. Aquestes epilèpsies solen anar acompanyades d'un pronòstic greu³⁸. Les EIEE representen la via comuna final a partir d'un grup heterogeni de condicions genètiques, metabòliques i estructurals. De fet, la cerca d'etiologies per a qualsevol d'aquestes condicions considera com a potencials causes anomalies cerebrals estructurals, migracions i vasculars, efectes tardans d'infeccions del SNC, condicions genètiques o trastorns metabòlics. Tot i això, es postula que gran part de les epilèpsies englobades en aquest grup serien de causa genètica. D'aquesta manera les EIEE es defineixen com a un grup de síndromes epilèptiques fenotípicament i genèticament heterogeni, ja que no només són causades per alteracions en múltiples gens, sinó que també, poden presentar un extens espectre neurològic associat a mutacions en un mateix gen. Això dificulta les associacions genotip-fenotip de la malaltia, convertint el correcte diagnòstic molecular d'aquests pacients en un repte³⁹.

3.1.1. Predisposició a l'epilèpsia en el desenvolupament

El primer any de vida és un període on el cervell està sotmès a grans canvis per a desenvolupar-se de forma ràpida cap a un estat madur amb funcions pròpies del cervell adult. La fase postnatal precoç és un moment on processos com la

sinaptogènesi, la ramificació dendrítica, l'apoptosi de la mielinització i l'eliminació de processos i sinapsis no rellevants tenen lloc de forma ràpida i simultània. De la mateixa manera, la maduració del cervell i les seves funcions requereix grans canvis en l'expressió genètica³⁷.

La incidència de les convulsions és més elevada durant la primera dècada, i especialment durant el primer any de vida. Múltiples factors fisiològics contribueixen a l'augment de la susceptibilitat a patir crisis epilèptiques en el cervell en desenvolupament. Cadascun d'aquests factors de susceptibilitat altera l'equilibri d'excitació-inhibició de la xara neuronal cerebral a favor de l'augment d'excitabilitat i l'hipersincronia, implicant en el procés múltiples substrats i mediadors com canals iònics, neurotransmissors i receptors, canvis estructurals i gradients iònics¹².

▪ **Desenvolupament de canals iònics**

El temps establert per al desenvolupament dels canals iònics en el cervell immadur juga un paper fonamental en el control de l'excitabilitat, i es creu que els canvis que pateix l'expressió d'aquests durant el desenvolupament és específic de l'edat i el gènere⁴⁰.

Els canals de sodi, mediadors de l'excitació neuronal, es desenvolupen relativament aviat. Això genera una persistència dels potencials d'acció que desencadenen un fort corrent de calci als terminals sinàptics promocionant l'alliberació de neurotransmissors, i com a conseqüència incrementa l'excitabilitat. No obstant això, s'assoleix un equilibri crític per tal que tingui lloc un desenvolupament normal. Els canals de potassi, responsables d'estabilitzar l'excitabilitat neuronal, es desenvolupen poc després que els de sodi i els de calci, donant una finestra temporal on el flux de ions predisposa a l'excitabilitat. El conjunt d'aquests canals determinen les propietats intrínseques de la membrana que marcaran la resposta neuronal a un estímul sinàptic.

Durant el desenvolupament, les neurones tenen major resistència de membrana i menors constants de temps que en les neurones madures, provocant que un mateix estímul d'amplitud i duració determinada tingui un major efecte en les neurones immadures. Alteracions en els factors responsables de l'equilibri entre canals i propietats de membrana durant el desenvolupament, com ara mutacions als canals de sodi o potassi, podrien produir convulsions, i com a resultat, un dany neuronal.

▪ **Desenvolupament del sistema de neurotransmissors**

Les sinapsis excitatòries glutamatèrgiques tendeixen a formar-se abans que les inhibidores afavorint la despolarització, les convulsions i l'excitotoxicitat, tot i que cada tipus de receptor té el seu perfil d'expressió propi al llarg de les fases inicials del desenvolupament.

El receptor GABA també presenta un perfil de desenvolupament consistent en l'expressió diferencial de cada subunitat de GABA_A segons l'estadi del procés. Tot i que en el cervell madur GABA és el principal neurotransmissor inhibitori, durant les primeres fases del desenvolupament juga un paper excitatori degut a la distribució diferencial dels ions clorur. Aquesta és diferent de la que trobem en les neurones madures a causa d'una bomba transmembrana anomenada cotransportador 1 (*symporter*) de sodi, potassi i clorur (NKCC1), la qual utilitza el gradient de sodi transmembrana per introduir a la cèl·lula ions potassi acompanyats de sodi i clor. Aquest fenomen genera una alta concentració de clorur intracel·lular en comparació a la fisiològica en la cèl·lula madura que implica la sortida massiva de ions clorur cada cop que s'activen els receptors GABA o glicina de les sinapsis amb interneurons i per tant, la despolarització de la membrana. No obstant això, GABA és capaç al mateix temps d'augmentar la conductivitat de membrana a través del mecanisme anomenat *shunting*, i dissipar aquesta despolarització per clorur, mantenint un cert potencial inhibitori tot i el seu paper excitatori inicial⁴⁰. Amb la maduració, les bombes NKCC1 es substitueixen pel cotransportador 2 de potassi i clorur (KCC2) el qual augmenta la concentració de clor extracel·lular, proporcionant així el potencial inhibitori de la sinapsi GABAèrgica per hiperpolarització de la membrana per entrada de ions clorur quan GABA s'uneix al seu receptor ionotòpic. La resposta inhibidora generada pels receptors metabotrópics GABA_B apareix en fases posteriors a la transició excitació-inhibició de GABA_A.

La màxima susceptibilitat del cervell en fase de maduració a patir hiperexcitabilitat es produeix en l'interval de temps on es dona la transició entre el canvi del paper de GABA_A, la falta de maduració de la via glutamatèrgica i l'incomplet establiment de la inhibició per GABA_B. Aquest període sol donar-se durant el primer trimestre postnatal, coincidint amb la màxima taxa d'aparició de crisis neonatals.

▪ **Plasticitat neuronal i ambient iònic**

Les connexions entre neurones es van creant i eliminant al llarg del desenvolupament cerebral, i és l'activitat neuronal qui determina l'estabilitat de cada

una d'elles. Aquest procés rep el nom de plasticitat i es tracta d'un fenomen que influencia tant les capacitats d'aprenentatge del cervell, com la resposta a l'entorn.

Fins que les sinapsis no són estables, es donen moments en què l'equilibri entre connexions excitatòries i inhibidores es perd, generant una alta probabilitat que la xarxa neuronal se sincronitzi de fora epileptiforme en associació amb alguna patologia o dany cerebral. Aquest augment de la susceptibilitat a patir una hiperexcitabilitat i hipersincronia neuronal deguda a propietats úniques del sistema nerviós central durant el desenvolupament, generen canvis significatius en les acumulacions de ions intracel·lulars i extracel·lulars, els quals també poden intervenir en la prolongació de la despolarització, i per tant, en l'augment de la susceptibilitat a patir epilèpsia.

Per tal d'estudiar i entendre millor els mecanismes involucrats en la maduració cerebral i totes aquelles alteracions, especialment genètiques, que alteren el correcte desenvolupament neural s'han general diversos tipus de models. Per una banda s'han desenvolupat models *in vitro* a partir de cèl·lules mare pluripotents (iPSCs) derivades del pacient⁴¹ o a partir de línies cel·lulars estables modificades genèticament. D'aquesta manera es poden estudiar els mecanismes cel·lulars fisiològics i els defectes associats d'alteracions en peces clau de les diferents vies intracel·lulars. Per altra banda, existeixen models animals en què s'intenta reproduir el defecte del pacient per tal d'analitzar en un organisme viu els efectes fenotípics de qualsevol alteració del desenvolupament. Els models animals que s'utilitzen de forma majoritària per a l'estudi de l'hiperexcitabilitat cerebral són models en rosegadors i en peix zebra⁴².

3.1.2. Classificació de les EIEE

Les síndromes epilèptiques precoces existeixen en un espectre molt ampli, cosa que genera que molts pacients puguin ser classificats sota múltiples categories de la malaltia. Tot i això, les encefalopaties epilèptiques d'inici precoç tenen una classificació general, segons la terminologia definida per la ILAE, que engloba quatre síndromes epilèptiques, a les quals se'ls hi han afegit dues síndromes més posteriorment³⁵.

▪ **Síndrome d'Ohtahara**

També anomenada encefalopatia epilèptica d'inici precoç amb brot-supressió, la síndrome d'Ohtahara va ser la primera EIEE descrita l'any 1976. Els símptomes apareixen durant els tres primers mesos de vida, tot i que normalment ja hi són presents abans dels 10 dies o fins i tot poques hores després del part. El patró

principal de crisis sol ser espasmes tòncics, tot i que també s'inclouen patrons tonico-clònics, clònics, mioclònics, atònics, d'absències, parcials o parcials complexos. L'EEG en aquests pacients es caracteritza per supressió de brots (Figura 6), és a dir, té tendència a mostrar períodes de molt poca activitat elèctrica cerebral seguida per un brot d'activitat amb moltes punxes, i finalment un retorn a la baixa activitat. El pronòstic per aquests pacients és, en general, bastant pobre, amb un retard psicomotor greu i dificultats d'aprenentatge significatives. Molts dels casos amb la síndrome d'Ohtahara progressen a una síndrome de West o epilèpsia parcial durant la infància, i inclús, en edats més avançades, alguns casos desenvolupen encefalopaties epilèptiques de la infantesa tardana com la síndrome de Lennox-Gastaut.

Mutacions en el gen de la Sintaxina-binding-protein 1 (*STXBP1*) s'han descrit com a causa genètica principal per a la Síndrome d'Ohtahara⁴¹, seguit de variants en els gens codificants per al canal de potassi dependent de voltatge tipus 2 (*KCNQ2*) o el canal de sodi dependent de voltatge tipus 2A (*SCN2A*)³⁶.

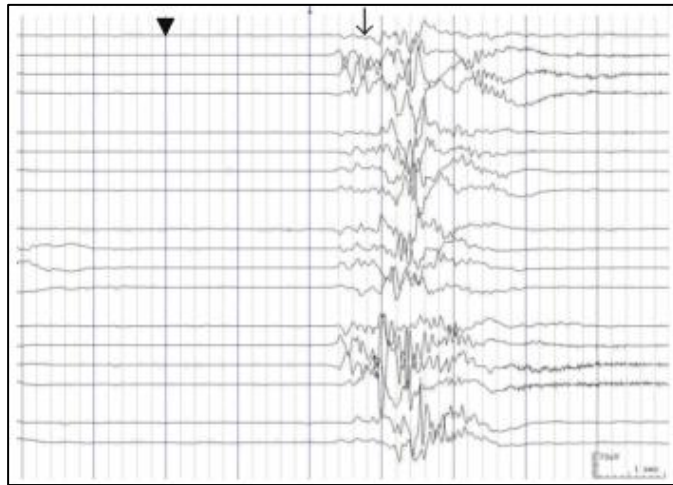


Figura 6 | EEG caracteritzat per un patró de supressió de brots. Brots de pics, ones intenses i ones lentes (fletxa), les quals estan interrompudes de forma irregular i separades per períodes de silenci elèctric (cap de fletxa). (Extreta de Khan, 2012³⁵)

- **Encefalopatia Mioclònica precoç (EME)**

Síndrome epilèptica de debut en el període neonatal o durant els primers mesos de vida caracteritzada per crisis parcials erràtiques, fragmentàries o mioclòniques massives i espasmes tòncics tardans. Clínicament, aquesta síndrome, ve

determinada per l'aparició de la primera crisi mioclònica, parcial erràtica, que sol donar-se hores després del naixement. La mioclònia normalment implica la cara o les extremitats i sol estar restringida a la parpella o a una sola extremitat o dit. Les sacsejades es produeixen tant en vigília com durant el son, i es defineixen com erràtiques perquè s'expandeixen per les diferents parts del cos de forma aleatòria i no sincrònica. L'electroencefalograma en aquesta síndrome es caracteritza, de forma semblant a la síndrome d'Ohtahara, per un patró de brot-supressió amb brots de punxes, ones agudes i ones lentes, separats entre ells per períodes de silenci elèctric (Figura 6). Tot i això, el patró de brot-supressió a l'EME persisteix en la infantesa tardana i resulta més evident durant els períodes de son³⁶.

Les anormalitats neurològiques són constants en l'encefalopatia mioclònica precoç incloent un retard molt sever a nivell psicomotor amb marcada hipotonia amb un nivell d'alerta alterat que pot portar, a vegades, a un estat vegetatiu. En alguns casos excepcionals poden aparèixer signes neurològics perifèrics. Els errors congènits en el metabolisme són l'etiologia que es postula principalment per a l'EME donant lloc a un quadre típic per a aquesta síndrome tant a nivell d'EEG com metabòlic.

Aquesta última també representa, en molts casos, una causa genètica de la malaltia. No obstant això, la causa genètica més coneguda per a aquesta síndrome són alteracions en el gen del transportador de glutamat a la mitocòndria (*SLC25A22*), tot i que mutacions en altres gens com *PIGA* i *SIK1* han estat també associats al fenotip. El pronòstic per a aquests pacients sol ser pobre i no existeixen teràpies efectives per al seu tractament.

▪ Síndrome de West

La síndrome de West sol donar-se durant el primer any de vida i es caracteritza per la tríada d'espasmes infantils, deteriorament del desenvolupament i un patró d'hipsarrítmia a l'EEG. Els espasmes epilèptics són crisis breus i generalitzades amb flexions i/o extensions tant axials com de les extremitats. Tot i que poden ser subtils i aïllats a l'inici, solen agrupar-se més tard en el curs de la malaltia donant lloc a bastants clústers per dia, especialment en estat de somnolència. L'hipsarrítmia, característica en l'electroencefalograma d'aquests pacients, mostra un patró desorganitzat amb punxes i ones asincròniques, d'elevat voltatge i amb punxes freqüents multifocals. Això, en conjunt, genera un EEG típic amb ones lentes generalitzades seguides per una atenuació difusa de voltatge (Figura 7).

El desenvolupament es veu afectat en la majoria dels pacients, i la majoria d'infants pateixen un alentiment, estancament o regressió de la trajectòria del seu desenvolupament. En general, el pronòstic dels pacients amb aquesta síndrome sol ser pobre, generant una alta taxa de mortalitat prematura⁴³. De fet, es coneix que la prognosi del desenvolupament en cada pacient depèn de l'etiologia, tot i que en el 40% dels casos, aquesta no és del tot clara. No obstant això, es postula que en els pacients refractaris al tractament, les etiologies principals serien estructurals, metabòliques i genètiques.

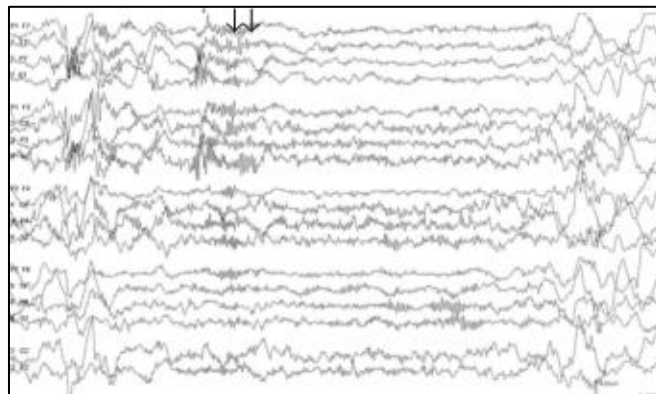


Figura 7 | EEG de la síndrome de West. Ones lentes generalitzades seguides per atenuació difusa de voltatge. (Extreta de Khan 2012³⁵)

Entre les lesions que originarien la síndrome de West, les més comunes serien l'encefalopatia hipoxic-isquèmica i el complex d'esclerosi tuberosa³⁶, però en el 15-20% dels casos, l'origen estaria potencialment lligat a alteracions de diversos gens, com ara al gen *ARX* del cromosoma X, al gen *CDKL5* codificant per una serina-treonina quinasa o al gen de la fosfolipasa C-beta-1 (*PLCB1*) implicat en la senyalització de les vies lligades a receptors dependents de proteïna G⁴¹.

▪ **Epilèpsia maligna amb convulsions parcials migratòries a la infància**

L'inici d'aquesta síndrome rara, abreuja com a MMPSI, té el seu inici durant el primer any de vida i, especialment, en el període neonatal. Es caracteritza, en comparació amb les altres EIEE, per patir crisis parcials freqüents d'origen multifocal, juntament amb alteracions autonòmiques i motores. Aquestes crisis epilèptiques aniran incrementant-se en freqüència fins a convertir-se en gairebé contínues. La clínica associada inclou desviació lateral del cap i els ulls, crisis clòniques focals dels ulls, crisis tòniques focals de la cara i les extremitats unilaterals o bilaterals, moviments automàtics, trets autonòmics i crisis secundàries

tónico-clòniques generalitzades. L'EEG mostra activitat epileptiforme multifocal i una activitat residual difusament alentida i asimètricament fluctuant entre els diferents registres.

L'etiologia d'aquest tipus d'EIEE es creu principalment genètica, on mutacions en el gen del canal de potassi activat per sodi (*KCNT1*) en són la causa més coneguda⁴¹. La conseqüència clínica més comuna de la MMPSI és un profund retard en el desenvolupament, i en bastants casos es produeix un èxitus durant la infantesa.

▪ **Estatus mioclònic en encefalopaties no progressives**

Trastorn amb debut durant el primer any de vida, caracteritzat per iniciar-se amb crisis parcials motores principalment. En alguns casos, però, es pot donar un estatus mioclònic multifocal d'inici, que pot ser recurrent, amb absències mioclòniques, mioclònies massives i, més rarament, crisis generalitzades o hemiclòniques. El patró d'EEG interictal consisteix en descàrregues multifocals epileptiformes potenciades durant el son, amb un fons lent, mentre que l'ictal mostra punxa-ona lenta generalitzada o un patró d'absències en funció del tipus de crisis.

Tot i que danys hipòxic-isquèmics o displàsia cortical en poden ser l'origen, la causa d'aquest trastorn és genètica en el 50% dels pacients, incloent-hi la síndrome d'Angelman amb reordenaments al cromosoma 15 i la síndrome del 4p. La prognosi dels infants afectes és bastant pobre i pateixen regressió en el desenvolupament i retard mental, donat principalment per un deteriorament cognitiu degut als repetits episodis d'estatus mioclònic.

▪ **Síndrome de Dravet**

La Síndrome de Dravet o epilèpsia mioclònica severa a la infància (SMEI) debuta clàssicament el primer any de vida com a convulsions febrils tònic-clòniques generalitzades o clòniques unilaterals. A mesura que la síndrome progressa, les crisis es converteixen en mioclòniques, focals afebrils i absències atípiques, que de forma freqüent poden dur a un *status epilepticus* entre el primer i el quart any de vida³⁶. L'electroencefalograma sol ser normal a l'inici de la malaltia, però amb el temps és fan evidents les descàrregues de punxa-ona o de trens de punxes, ja sigui de forma individual o en brots, indicant activitat epilèptica al cervell. El desenvolupament dels infants sol ser normal fins que apareixen les primeres crisis parcials i mioclòniques, punt on el pacient comença a perdre habilitats, especialment de llenguatge i parla, i a alentir al seu progrés del desenvolupament.

A més, els pacients amb SMEI presenten un alt risc de patir mort sobtada de forma inexplicable per epilèpsia (SUDEP).

La síndrome de Dravet és, potser, l'encefalopatia epilèptica d'inici precoç amb una arquitectura genètica relativament homogènia, ja que en el 70-80% dels casos la causa és una alteració en el gen *SCN1A*, subunitat formadora de por alfa-1 del canal de sodi activat per voltatge $Na_v1.1$ ⁴¹.

3.1.3. Genètica de les EIEE

La classificació de les encefalopaties epilèptiques d'inici precoç en funció de la clínica, tot i existir els diferents tipus establerts descrits en l'apartat anterior, resulta molt confusa. L'elevada heterogeneïtat fenotípica i genètica fan inevitable que cada cop més la genètica guanyi un paper important en la catalogació de les diferents síndromes epilèptiques, ja que la complexa relació entre genètica, epigenètica, fisiologia cel·lular i interaccions del circuit neuronal poden convertir un simple canvi genètic en un ampli espectre de manifestacions neuroclíniques⁴¹. És per aquesta raó que la base de dades de l'OMIM classifica les EIEE en funció de la seva genètica (Taula 5). L'expansió de l'ús de les tècniques de seqüenciació massiva han augmentat de forma exponencial els gens associats a les EIEE, elevant la xifra al voltant de 300 gens implicats en la malaltia. No obstant això, només aquells gens que han estat estudiats i demostrats com a causants d'epilèpsia, són afegits com a nova encefalopatia epilèptica d'inici precoç.

Taula 5 | Classificació de les EIEE segons l'OMIM. Gens implicats en cada tipus d'EIEE amb la seva funció, herència (MH) de la malaltia i clínica principal observada als pacients afectes.

EIEE	Gen	Funció	MH	Fenotip més comú	Ref.
1	ARX	Desenvolupament i regulació de les interneurons	XLR	Lisencefàlia, IS, ID i ME	Scheffer IE, 2002 ⁴⁴
2	CDKL5	Quinasa implicada en la maduració neuronal i sinaptogènesi	XLD	Sd. Rett atípic, IS, TE o ME, ID, AM, NP, DM	Weaving LS, 2004 ⁴⁵
3	SLC25A22	Transportador de glutamat i protons a través de la membrana mitocondrial	AR	ME neonatal, HT, DD	Molinari F, 2009 ⁴⁶
4	STXBP1	Regulació de la formació i fusió de la vesícula sinàptica	AD	IS, ID, HM	Saitsu H, 2008 ⁴⁷

AD: autosòmic dominant; AR: autosòmic recessiu; XLD: dominant lligada al X; XLR: recessiva lligada al X; SMO: mosaïcisme somàtic; IS: espasmes infantils; ID: discapacitat/retard intel·lectual; ME: epilèpsia mioclònica; TE: epilèpsia tònica; Sd: síndrome; AM: alteració motora; NP: absència de parla; DM: trets dismòrfics; HT: hipotonia; DD: retard en el desenvolupament; HM: hipomielinització; CF: convulsions febrils; DT: distonia; PD: retard psicomotor; TCE: epilèpsia tònic-clònica, GE: epilèpsia generalitzada; SE: *status epilepticus*; (Informació extreta del'OMIM; última consulta 25 de juny de 2018)

Taula 5 | Continuació

EIEE	Gen	Funció	MH	Fenotip més comú	Ref.
5	SPTAN1	Proteïna filamentosa del citoesquelet que regula la unió entre receptors i actina per a distribuir-los correctament al llarg de la membrana	AD	IS, ID, HM central	Writzl K, 2012 ⁴⁸
6	SCN1A	Subunitat del canal de sodi activat per voltatge essencial per a la generació i propagació de potencial d'acció	AD	Sd. Dravet o SMEI	Fujiwara T, 2003 ⁴⁹
7	KCNQ2	Canal de potassi depenent de voltatge responsable del control de l'excitabilitat neuronal a través de la corrent M	AD	CF, DD, HT, DT, lesions ganglis de la base	Dedek K, 2003 ⁵⁰
8	ARHGEF9	Codifica per la colibistina, proteïna amb un paper important en la formació dels clústers de receptors de glicina i GABA als terminals postsinàptics	XLR	Crisis prolongades, hiperreflexia, PD, polimicrogíria frontal	Shimajima K, 2011 ⁵¹
9	PCDH19	Molècules d'adhesió cel·lular dependent de calci, implicades en el desenvolupament del SNC, especialment de l'hipocamp i el còrtex	XL	Crisis múltiples, DD, ID, signes psicològics	Dibbens LM, 2009 ⁵²
10	PNKP	Reparació del DNA en precursors neuronals de la zona ventricular del còrtex i en neurones postmitòtiques de la placa del còrtex	AR	Crisis múltiples, microcefàlia, DD	Shen J, 2010 ⁵³
11	SCN2A	Subunitat del canal de sodi activat per voltatge encarregat de la generació i propagació de potencial d'acció	AD	TCE, DD, ID, HT	Baasch AL, 2014 ⁵⁴
12	PLCB1	Catalitza la transducció de senyal a través de la generació de IP3 i DAG a partir de l'activació dels receptors muscarínics d'acetilcolina per tal d'activar diverses vies de regulació de la hiperexcitabilitat hipocampal	AR	TE, IS, hipsarrítmia, HT	Kurian MA, 2010 ⁵⁵
13	SCN8A	Canal de sodi depenent de voltatge responsable de la despolarització de membrana de les dendrites	AD	GE, NP, DD, ID, HT, AM	Veeramah KR, 2012 ⁵⁶

AD: autosòmic dominant; AR: autosòmic recessiu; XLD: dominant lligada al X; XLR: recessiva lligada al X; SMO: mosaïcisme somàtic; IS: espasmes infantils; ID: discapacitat/retard intel·lectual; ME: epilèpsia mioclònica; TE: epilèpsia tònica; Sd: síndrome; AM: alteració motora; NP: absència de parla; DM: trets dismòrfics; HT: hipotonia; DD: retard en el desenvolupament; HM: hipomielinització; CF: convulsions febrils; DT: distonia; PD: retard psicomotor; TCE: epilèpsia tònica-clònica; GE: epilèpsia generalitzada; SE: *status epilepticus*; (Informació extreta del OMIM; última consulta 25 de juny de 2018)

Taula 5 | Continuació

EIEE	Gen	Funció	MH	Fenotip més comú	Ref.
14	KCNT1	Canal de potassi activat per sodi implicat en la hiperpolarització lenta que segueix a un tren de potencials d'acció	AD	Crisis focals motores, manifestacions autonòmiques, DD, HT axial	Barcia G, 2012 ⁵⁷
15	ST3GAL3	Codifica per una proteïna intermembrana de l'aparell de Golgi que forma un epítip d'acid siàlic a les glicoproteïnes, important per al reconeixement cel·lular i processos de comunicació	AR	IS, contacte visual pobre, HT, reflexes primitius i irritabilitat, ID	Edvardson S, 2013 ⁵⁸
16	TBC1D24	Coordina el correcte transport intracel·lular de les vesícules	AR	Crisis múltiples, SE, PD, signes extrapiramidals, HT, DT	Milh M, 2013 ⁵⁹
17	GNAO1	Subunitat alfa de les proteïnes Go, abundants a cervell, que intervenen en la inhibició dels corrents de calci	AD	TE multifocal, IDI, DD, DT, corea	Nakamura K, 2013 ⁶⁰
18	SZT2	Proteïna implicada en el control upstream de la senyalització de la via mTOR	AR	PD, DM, crisis refractaries, cos callós prim	Basel-Vangaite L, 2013 ⁶¹
19	GABRA1	Subunitat α del receptor GABA associat a canals de clorur i responsable de la inhibició de l'impuls nerviós	AD	Crisis múltiples, SE, sensitivitat febril a les crisis, ID	Carvill GL, 2014 ⁶²
20	PIGA	Catalitzador de la biosíntesis de l'anclatge de GPI a la membrana, involucrat en el neurodesenvolupament	XLR	ME, DM, HT, anomalies congènites variables	Kato M, 2014 ⁶³
21	NECAP1	Codifica per una proteïna accessòria implicada en l'endocitosis a través de la clatrina a les sinapsis	AR	HT axial amb hipertonia apendicular, PD, manca de control cefàlic	Alazami AM, 2014 ⁶⁴
22	SLC35A2	Transportador de galactosa implicat en la galactosidació dels components de les neurones	SMo, XLD	Hipsarrítmia, DM, extremitats curtes, defectes de coagulació	Kodera H, 2013 ⁶⁵
23	DOCK7	Factor intercanviador de guanines per a RHO GTPases implicat en la neurogènesis dels axons a l'hipocamp	AR	Crisis multifocals, hipsarrítmia, PD, problemes visuals, NP, DM	Perrault I, 2014 ⁶⁶
24	HCN1	Canal de cations activat per hiperpolarització que contribueix a l'activitat rítmica espontània del cervell	AD	Absències, SE, ID, trastorn del comportament, trets autístics	Nava C, 2014 ⁶⁷

AD: autosòmic dominant; AR: autosòmic recessiu; XLD: dominant lligada al X; XLR: recessiva lligada al X; SMO: mosaïcisme somàtic; IS: espasmes infantils; ID: discapacitat/retard intel·lectual; ME: epilèpsia mioclònica; TE: epilèpsia tònica; Sd: síndrome; AM: alteració motora; NP: absència de parla; DM: trets dismòrfics; HT: hipotonia; DD: retard en el desenvolupament; HM: hipomielinització; CF: convulsions febrils; DT: distonia; PD: retard psicomotor; TCE: epilèpsia tònic-clònica, GE: epilèpsia generalitzada; SE: *status epilepticus*; (Informació extreta del OMIM; última consulta 25 de juny de 2018)

Taula 5 | Continuació

EIEE	Gen	Funció	MH	Fenotip més comú	Ref.
25	SLC13A5	Transportador de tricarboxilat amb preferència de citrat que està implicat en el metabolisme energètic cel·lular	AR	SE, DD, NP, HT axial, hipertonia perifèrica, DT, corea	Thevenon J, 2014 ⁶⁸
26	KCNB1	Canal de potassi que contribueix de forma majoritària a rectificar de forma retardada els corrents de potassi a les neurones piramidals de l'hipocamp i el còrtex	AD	Hipsarrítmia, PD, ID i agitació intermitent	Torkamani A, 2014 ⁶⁹
27	GRIN2B	Receptor de glutamat NMDA que és un canal iònic permeable a ions de sodi, potassi i calci responsable de les sinapsis excitatòries al cervell, especialment a l'hipocamp i al còrtex cerebral	AD	ME, PD, ID, HT, AM, DT, trets autístics, malformacions corticals	Lemke R, 2014 ⁷⁰
28	WWOX	Proteïna implicada en el neurodesenvolupament	AR	ME, hiperreflexia, hipoplasia lòbul temporal, HT axial, espasticitat i hipercinesia	Mignot C, 2015 ⁷¹
29	AARS	Proteïna encarregada d'eliminar les proteïnes mal plegades acumulades a l'interior de les neurones	AR	ME, microcefalia, espasticitat, discinesia, DT, corea	Simons C, 2015 ⁷²
30	SIK1	AMP quinasa implicada en la transducció de la senyal que regula l'expressió gènica nuclear	AD	Crisis múltiples, IS, PD, trets autístics, NP	Hansen J, 2015 ⁷³
31	DNM1	GTPasa amb un rol crític en el reciclatge de les vesícules sinàptiques al cervell, especialment durant el període postnatal	AD	IS, absències múltiples, ID, NP i HT	Appenzeller S, 2014 ⁷⁴
32	KCNA2	Canal de potassi que permet la repolarització neuronal eficient després d'un potencial d'acció	AD	Crisis múltiples, ID, NP, atàxia, tremolor, mioclonus	Syrbe S, 2015 ⁷⁵
33	EEF1A2	Factor d'elongació amb un paper important en la síntesi proteica	AD	Hipsarrítmia, HT, DD, microcefalia, falta de coordinació, trets autístics	Veeramah KR, 2013 ⁷⁶
34	SLC12A5	Canal KCC2 de les neurones madures que actua de transportador de K ⁺ i Cl ⁻ . Hiperporització per entrada de clor intracel·lular en resposta a la inhibició per GABA o glicina	AR	MMPSI, DD, atrofia cerebral, retard maduració mielina, HT	Stodberg T, 2014 ⁷⁷

AD: autosòmic dominant; AR: autosòmic recessiu; XLD: dominant lligada al X; XLR: recessiva lligada al X; SMO: mosaïcisme somàtic; IS: espasmes infantils; ID: discapacitat/retard intel·lectual; ME: epilèpsia mioclònica; TE: epilèpsia tònica; Sd: síndrome; AM: alteració motora; NP: absència de parla; DM: trets dismòrfics; HT: hipotonia; DD: retard en el desenvolupament; HM: hipomielinització; CF: convulsions febrils; DT: distonia; PD: retard psicomotor; TCE: epilèpsia tònic-clònica; GE: epilèpsia generalitzada; SE: *status epilepticus*; (Informació extreta de l'OMIM; última consulta 25 de juny de 2018)

Taula 5 | Continuació

EIEE	Gen	Funció	MH	Fenotip més comú	Ref.
35	ITPA	Elimina l'ITP de la neurona evitant el seu efecte tòxic per a la senyalització cel·lular	AR	HM, atrofia cerebral progressiva, microcefalia, DD, HT	Kevelam SH, 2015 ⁷⁸
36	ALG13	Forma part de la UDP-GlcNAc transferasa que catalitza la N-glicosilació de les proteïnes al reticle endoplasmàtic. Regula el plegament i estabilitat proteica.	XLD	Hipsarrítmia, crisis multifocals, HT, PD, hidrocefalia, HM, DM	Smith-Packard BI, 2015 ⁷⁹
37	FRRS1L	Codifica per un component del receptor AMPA de glutamat implicat en l'excitació neuronal	AR	Crisis múltiples, hiperinètics, DD, ID, HT, hiperreflexia	Madeo M, 2016 ⁸⁰
38	ARV1	Transportador de lípids del reticle endoplasmàtic	AR	Hipsarrítmia, HT central, hipertonia perifèrica, DT, defectes visuals	Palmer EE, 2016 ⁸¹
39	SLC25A12	Codifica per la proteïna transportadora <i>aralar</i> encarregada del pas d'aspartat de la mitocondria al citosol a canvi de la captació mitocondrial de glutamat gràcies a la unió amb calci	AR	PD, HT, hipomielinització, espasticitat, hiperreflexia	Molinari F, 2009 ⁴⁶
40	GUF1	Factor de traducció implicat en la síntesi de proteïnes mitocondrials	AR	Hipsarrítmia, PD, poc contacte visual, HT, espasticitat, corea, DT, atrofia cortical	Alfaiz AA, 2016 ⁸²
41	SLC1A2	Transportador de glutamat que l'elimina activament de l'espai sinàptic	AD	Crisis multifocals, DD, hipomielinització, HT, ID	Candace T, 2016 ⁸³
42	CACNA1A	Codifica per la subunitat transmembrana formadora del por del canal de calci activat per voltatge, regulant l'alliberament de neurotransmissors	AD	Crisis múltiples, SE, DD, ID, HT, hiperreflexia, tremolor, trets autístics	Candace T, 2016 ⁸³
43	GABRB3	Receptor de la família GABA _A implicats en la inhibició de la transmissió de l'impuls nerviós	AD	Absències, DD, trastorn comportament, ID	Moller RS, 2017 ⁸⁴
44	UBA5	Enzim activador de la proteïna UFM1 relacionada amb la viabilitat neuronal i la via de la neurotransmissió per acetilcolina	AR	ME, hipsarrítmia, irritabletat, PD, HT, espasticitat, DT, microcefalia	Colin E, 2016 ⁸⁵
45	GABRB1	Receptor de la família GABA _A implicats en la inhibició de la transmissió de l'impuls nerviós	AD	Hipsarrítmia, DD, alteració cortical visual, cos callós prim	Espen L, 2016 ⁸⁶
46	GRIN2D	Subunitat formadora dels receptors ionotròpics de glutamat implicats en l'excitació neuronal	AD	Hipsarrítmia, SE, DD, disfagia, HT axial, DM	Li D, 2016 ⁸⁷

AD: autosòmic dominant; AR: autosòmic recessiu; XLD: dominant lligada al X; XLR: recessiva lligada al X; SMO: mosaïcisme somàtic; IS: espasmes infantils; ID: discapacitat/retard intel·lectual; ME: epilèpsia mioclònica; TE: epilèpsia tònica; Sd: síndrome; AM: alteració motora; NP: absència de parla; DM: trets dismorfics; HT: hipotonia; DD: retard en el desenvolupament; HM: hipomielinització; CF: convulsions febrils; DT: distonia; PD: retard psicomotor; TCE: epilèpsia tònic-clònica; GE: epilèpsia generalitzada; SE: *status epilepticus*; (Informació extreta del'OMIM; última consulta 25 de juny de 2018)

Taula 5 | Continuació

EIEE	Gen	Funció	MH	Fenotip més comú	Ref.
47	FGF12	Factor de creixement de fibroblasts implicat en neurodesenvolupament	AD	Hipsarrítmia, PD, ID, NP, microcefalia, HT axial, ataxia extremitats	Siekierska A, 2016 ⁸⁸
48	AP3B2	Complex proteic de cobertura de la vesícula específic de la neurona implicat en l'alliberació de neurotransmissors	AR	Hipsarritmia, SE, HT, dificultats per menjar, DD, ID, NP	Assoum M, 2016 ⁸⁹
49	DENND5A	Factors intercanviadors que activen GTPases que controlen el tràfic de membranes, i en concret, frenen el creixement de les dendrites a l'hipocamp	AR	Crisis múltiples, DD, ID, NP, HT, espasticitat, calcificació cerebral	Han C, 2016 ⁹⁰
50	CAD	Enzim implicat en la síntesi de nucleòtids pirimidínics per a la proliferació cel·lular	AR	SE, PD, HT, incapacitat de comunicació	Koch J, 2017 ⁹¹
51	MDH2	Deshidrogenasa del cicle de Krebs mitocondrial implicada en la cadena respiratòria cel·lular	AR	ME, GE, HT, no subjecció del cap, PD, NP, DT	Ait-El-Mkadem S, 2017 ⁹²
52	SCN1B	Modulació de l'activació i de la dependència de voltatge dels canals de sodi, de l'expressió dels canals a la superfície cel·lular i de l'adhesió cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu	AR	CF, ME, absències, ID, PD, HT	Ogiwara I, 2012 ⁹³
53	SYNJ1	Fosfatasa implicada en la cobertura de clatrina i la dinàmica de les vesícules sinàptiques	AR	Hipsarritmia, SE, HT, PD, espasticitat, ID, no contacte visual	Hardies K, 2016 ⁹⁴
54	HNRNPU	Proteïna d'unió al RNA implicada en metabolisme i transport cel·lular	AD	Crisis múltiples, SE, ID, microcefalia i trets autístics, malformació ventricular, HM	Bramswig NC, 2017 ⁹⁵
55	PIGP	Catalitzador de la biosíntesis de l'anclatge de GPI a la membrana, involucrat en el neurodesenvolupament	AR	Hipsarritmia, HT, hiperreflexia, defectes visió cortical	Johnstone DL, 2017 ⁹⁶
56	YWHAG	Proteïna de la família 14-3-3 implicats en la proliferació i migració neuronal	AD	Crisis múltiples, ID, NP, TDAH, trets autístics, ataxia, hiperlaxitud	Guella I, 2017 ⁹⁷
57	KCNT2	Canal de potassi que contribueix a la sortida de K ⁺ intracel·lular per a reduir i regular l'excitabilitat neuronal	AD	Crisis múltiples, hipsarritmia, DD, HT	Gururaj s 2018 ⁹⁸
58	NTRK2	Interacciona amb neurotrofines que regulen les funcions sinàptiques a curt termini i la potenciació de sinapsis cerebrals a llarg termini	AD	ID, DD, ID, NP, atrofia òptica, HT, espasticitat	Hamdan FF, 2017 ⁹⁹

AD: autosòmic dominant; AR: autosòmic recessiu; XLD: dominant lligada al X; XLR: recessiva lligada al X; SMO: mosaïcisme somàtic; IS: espasmes infantils; ID: discapacitat/retard intel·lectual; ME: epilèpsia mioclònica; TE: epilèpsia tònica; Sd: síndrome; AM: alteració motora; NP: absència de parla; DM: trets dismòrfics; HT: hipotonia; DD: retard en el desenvolupament; HM: hipomielinització; CF: convulsions febrils; DT: distonia; PD: retard psicomotor; TCE: epilèpsia tònica-clònica; GE: epilèpsia generalitzada; SE: *status epilepticus*; (Informació extreta del OMIM; última consulta 25 de juny de 2018)

Taula 5 | Continuació

EIEE	Gen	Funció	MH	Fenotip més comú	Ref.
59	GABBR2	Receptor GABAB inhibidor de l'activitat neuronal	AD	IS, hipsarrítmia, ID, HT, NP	Yongjin Y, 2017 ¹⁰⁰
60	CNPY3	Xaperona del reticle endoplasmàtic implicada en la maduració de proteïnes relacionades amb el creixement cel·lular	AR	ME, hipsarrítmia, tetraparèsia espàstica, IF, atrofia cerebral, malformació hipocamp	Mutoh H, 2018 ¹⁰¹
61	ADAM22	Complex de la membrana postsinàptica que regula la maduració i la funció sinàptica	AR	GE, DD, ID, HT, espasticitat, DM, atrofia supratentorial	Muona M, 2016 ¹⁰²
62	SCN3A	Subunitat del canal de sodi activat per voltatge que intervé en la generació i propagació de potencial d'acció	AD	TE, ME, hipsarrítmia, ID, DD, HT, microcefalia, tetraparèsia espàstica	Zaman T, 2018 ¹⁰³
63	CPLX1	Proteïna soluble que regula la funció del complex SNARE durant la fusió de la membrana vesicular amb la presinàptica	AR	ME, TE, GE, IF, atrofia cortical, HT, DM	Redler S, 2017 ¹⁰⁴
64	RHOBTB2	Rho GTPasa implicada en el desenvolupament d'èrtric	AD	ID, PD, absència de parla, HT, DM, TCE, SE	Belal H, 2018 ¹⁰⁵
65	CYFIP2	Proteïna de la família WAVE implicada en la regulació de la remodelació de l'actina, elongació de l'axó, morfogènesi de l'espina dendrítica i plastisitat sinàptica	AD	GE, TCE, ME, PD, DD, HT, DM	Mitsuko N, 2018 ¹⁰⁶

AD: autosòmic dominant; AR: autosòmic recessiu; XLD: dominant lligada al X; XLR: recessiva lligada al X; SMO: mosaïcisme somàtic; IS: espasmes infantils; ID: discapacitat/retard intel·lectual; ME: epilèpsia mioclònica; TE: epilèpsia tònica; Sd: síndrome; AM: alteració motora; NP: absència de parla; DM: trets dismòrfics; HT: hipotonia; DD: retard en el desenvolupament; HM: hipomielinització; CF: convulsions febrils; DT: distonia; PD: retard psicomotor; TCE: epilèpsia tònic-clònica; GE: epilèpsia generalitzada; SE: *status epilepticus*; (Informació extreta del'OMIM; última consulta 25 de juny de 2018)

La complexitat genètica de les encefalopaties epilèptiques recau, en gran part, en la implicació de múltiples gens que codifiquen per una gran varietat de funcions diferents: canals iònics, receptors activats per lligand, transportadors de soluts, proteïnes del tràfic sinàptic, quinases, factors de transcripció o molècules d'adhesió (Taula 5)⁴¹. La definició d'aquesta arquitectura genètica condueix a un major coneixement de la fisiopatologia de les síndromes EIEE, poden agrupar en tres grans grups els mecanismes causants del fenotip en funció de la causa genètica que els ha desencadenat (Figura 8)³⁶.

▪ **Alteració de l'excitabilitat neuronal**

Mutacions en gens codificants per canals iònics afecten l'excitabilitat neuronal, per això aquest grup també rep el nom de **canalopaties**. Els canals iònics controlen

l'homeostasis electrofisiològica de la membrana neuronal, i per tant, l'excitabilitat a través de la generació i propagació dels potencials d'acció. La disrupció d'algun d'aquests canals alteraria el correcte mecanisme de generació i transmissió de l'impuls nerviós donant hiperexcitabilitat, ja sigui reduint l'excitació d'interneurons inhibidores o impedit la correcta inhibició del potencial d'acció.

▪ **Alteració de la transmissió sinàptica**

Un altre gran grup associat al fenotip de les EIEE són les disrupcions en els gens codificants per elements implicats en la transmissió sinàptica. Aquests englobarien tant proteïnes implicades en el procés de vesiculització i segregació dels propis neurotransmissors a nivell pre-sinàptic, com receptors de neurotransmissors a nivell post-sinàptic. En molts casos es fa referència a aquest tipus d'alteracions com a **sinaptopaties**.

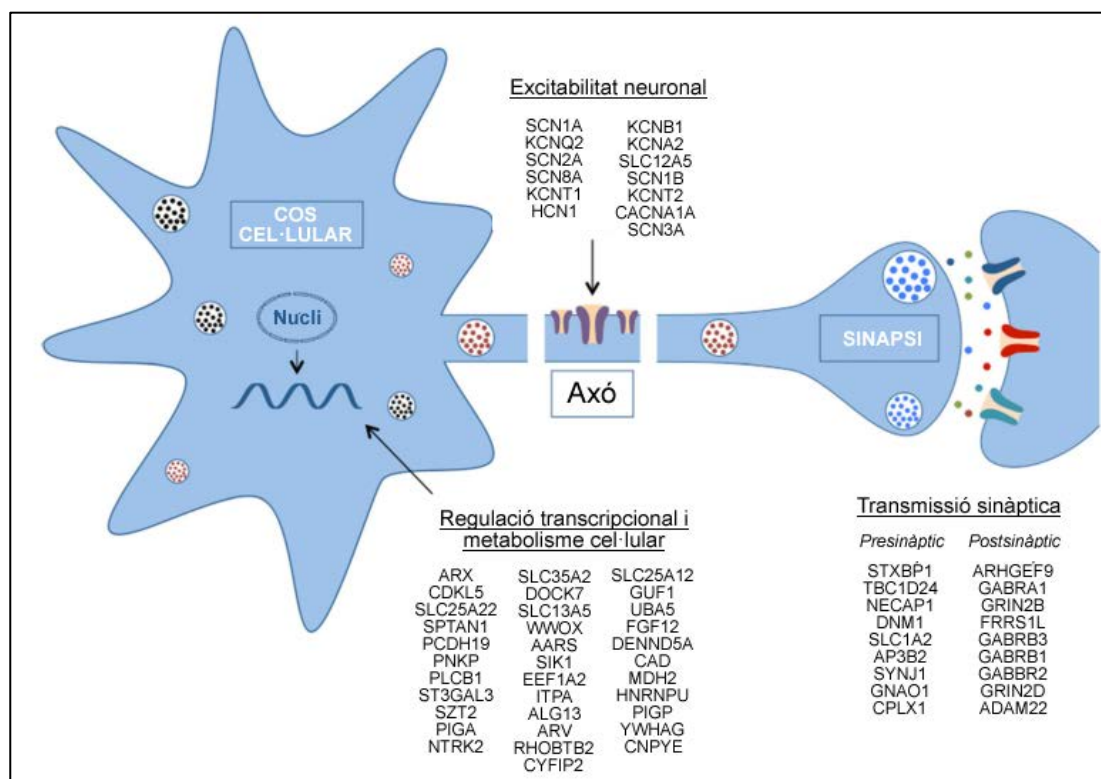


Figura 8 | Gens i mecanismes implicats en les EIEE. Classificació dels gens classificats a l'OMIM segons els tres mecanismes fisiopatològics descrits (Adaptada de Von Deimling, 2017 ³⁶)

▪ **Alteracions en els mecanismes fisiològics cel·lulars**

Gens implicats en la regulació transcripcional i metabolisme cel·lular també s'han associat a les epilèpsies quan es troben afectats per mutacions. En molts casos, el

funcionament incorrecte dels processos fisiològics de la cèl·lula al SNC, especialment durant el període de desenvolupament, deriven en problemes de formació de la xarxa neural, ja sigui per incorrecta neurogènesis o per errors en la migració neuronal. Els trastorns causats per aquests defectes també s'anomenen **interneuronopaties**, ja que tots aquests problemes es fan evidents a nivell d'hiperexcitabilitat, sobretot, quan afecten el sistema d'interneurones inhibidores. La manca d'aquestes a la xarxa neural inhabilita un dels sistemes principals reguladors de l'equilibri excitació-inhibició, crític per al control de l'excitabilitat al SNC.

4. Diagnòstic de les Encefalopaties Epilèptiques d'Inici Precoç

Les encefalopaties epilèptiques d'inici precoç afecten de forma molt greu a la qualitat de vida dels pacients i les seves famílies. Per aquesta raó diagnosticar-les el més precoçment possible és important, no només per a la correcta atenció del pacient i la cerca d'un tractament adequat, sinó que també psicològicament per a les famílies, tant de cara a poder identificar la causa de la malaltia com per a conèixer el risc de recurrència en un futur embaràs¹⁰⁷. El seu diagnòstic, però, és complex degut a la elevada heterogeneïtat fenotípica i genètica que les caracteritzen. Per aquesta raó, diversos autors han definit diferents diagrames de diagnòstic per a unir la informació clínica amb la genètica per a poder arribar a explicar la causa de la malaltia de cada pacient (Figura 9).

4.1. Diagnòstic clínic

El diagnòstic de les EIEE des del punt de vista clínic es molt complicat, ja que, tal com s'ha comentat en apartats anteriors, es tracta d'una malaltia amb una alta variabilitat fenotípica solapada entre els diferents tipus de síndromes descrits (Taula 5). Addicionalment, no acostuma a haver-hi cap biomarcador clar com a potencial indicador per determinar un tipus de síndrome concreta.

L'electroencefalograma (EEG) és l'instrument més important del que disposen avui en dia els clínics per a avaluar l'epilèpsia a través del registre cortical de l'excitabilitat del cervell. Aquesta és potser l'única eina que permet detectar crisis epilèptiques molt breus, que com a conseqüència poden o no tenir efectes motors¹⁰⁸. La principal limitació de l'EEG ambulatori és que molts cops el pacient no pateix una crisi durant la consulta, i per tant, és complicat conèixer el comportament durant la crisi, ja que aquests tenen poca capacitat per adonar-se'n i descriure-les. Per aquesta raó, existeix la tècnica de video-electroencefalograma (VEEG) consistent en el monitoratge per a detectar i diagnosticar les crisis epilèptiques, ja que combina la possibilitat de registrar corticalment la crisi juntament amb la gravació del comportament i fenòmens indicatius durant l'episodi.

En els últims anys s'han desenvolupat noves tècniques de registre cerebral consistents en sistemes EEG implantats de forma subdural o epicranial que permeten el registre fàcil i constant de les crisis sense necessitat d'estar a la consulta. A més, altres tècniques per a l'anàlisi del moviment s'estan implantant per a substituir el VEEG, com ara diferents equips petits de registre de moviment o acceleració del cos sencer o extremitats que porten els pacients subjectats al cos.

Els marcadors fisiològics i bioquímics també podrien ser factors importants, per això, per a intentar determinar-los i poder-los considerar com a un determinant més de diagnòstic d'EIEE, s'han desenvolupat mesures fisiològiques com la freqüència cardíaca, la temperatura corporal i la pressió sanguínia. Per altra banda, la determinació de concentració de components bioquímics al plasma i al líquid cefaloraquídi també s'utilitza per provar d'identificar biomarcadors de la malaltia.

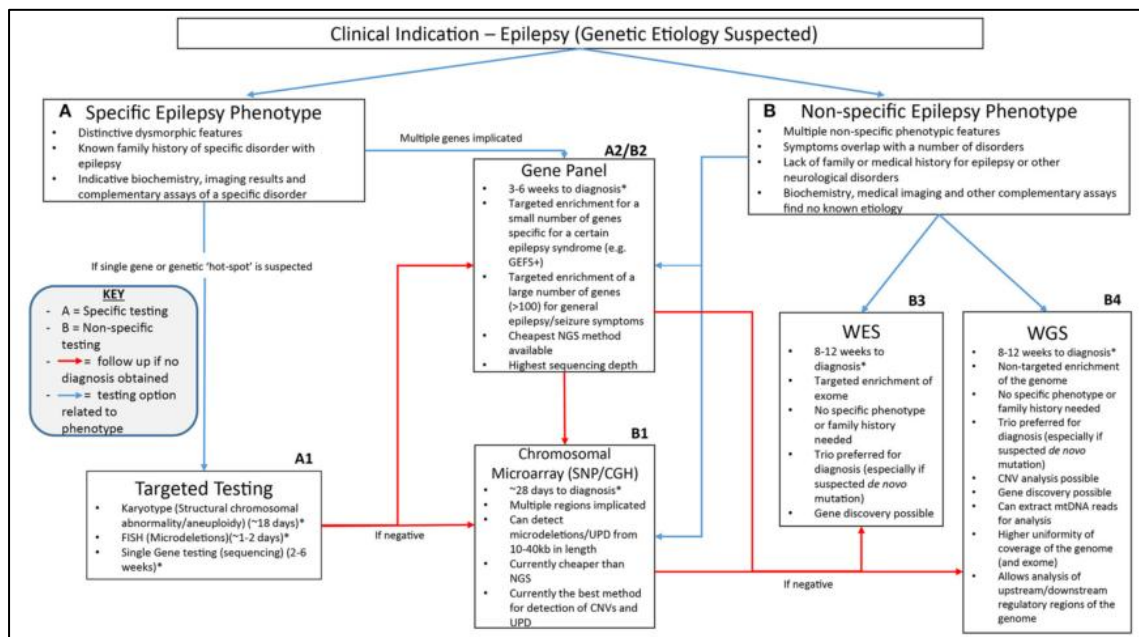


Figura 9 | Proposta de diagrama per al diagnòstic de les encefalopaties epilèptiques d'inici precoç. (Extreta de Dunn, 2018¹⁶)

Finalment, per intentar suplir el paper del VEEG, s'han dissenyat sistemes per a proporcionar al pacient eines que els permetin indicar el tipus de comportament que pateixen en mig d'una crisi epilèptica. Tot i això, cal desenvolupar-los millor, ja que quan la crisi va associada a pèrdua de consciència, només el registre per un observador extern és efectiu.

Malgrat els avanços en aquest camp de determinació de factor clínics és rellevant, el problema del solapament fenotípic entre síndromes impliquen que les dades obtingudes de tots aquests sistemes de mesura siguin útils principalment en combinació amb el diagnòstic genètic (Figura 9). A més, les EIEE se solapen simptomàticament amb altres encefalopaties, com ara el dèficit de Glut1 o el Complex d'esclerosi Tuberosa (ET), tot i tenir entitats genètiques separades. L'anàlisi d'una cohort de pacients ET s'ha desenvolupat al laboratori coincidint amb la durada de la tesi doctoral que aquí es presenta (Veure Annex III).

4.2. Diagnòstic molecular

La identificació de gens responsables de les encefalopaties epilèptiques d'inici precoç fa possible el diagnòstic molecular de cada pacient. En conseqüència, proporciona la possibilitat d'optimitzar la manipulació clínica d'aquests individus, ja que conèixer l'origen de la malaltia permet determinar de forma més acurada el pronòstic i definir programes de control i prevenció adaptats a cada cas¹⁰⁹. A més, en malalties com les EIEE on la majoria de síndromes no responen a cap tractament antiepilèptic estàndard, la identificació de la causa molecular permet entendre millor el mecanisme fisiopatològic desencadenant del fenotip, donant opció al desenvolupament de noves eines terapèutiques. L'estudi de gens implicats en una malaltia se sol dur a terme amb mètodes de seqüenciació, però la identificació de gens candidats sobre els qui dirigir l'estudi es realitzava tradicionalment per dues estratègies principals: estudi de regions alterades a través de mapejat o estudi dirigit específicament a gens associats tant a malalties similars com a mecanismes fisiopatològics potencialment desencadenants del fenotip d'estudi¹¹⁰.

Les estratègies tradicionals més rellevants de mapejat són el cariotipatge, l'anàlisi de lligament, el mapejat d'homozigositat, l'anàlisi de variants de nombre de còpia (CNV) i les anàlisis basades en polimorfismes de nucleòtid únic (SNP). Aquestes tècniques consisteixen en cribratges generals del genoma, el que dificulta molt poder diferenciar entre canvis de nucleòtids únics (SNV) o variacions genòmiques estructurals que impliquin una regió més gran, raó per la qual s'apliquen de forma seqüencial amb l'objectiu de delimitar una regió afectada. La contribució de les variants estructurals a l'epilèpsia s'ha fet evident a mesura que les tècniques anteriorment anomenades s'han desenvolupat. Aquestes variacions consisteixen en delecions i duplicacions de fragments de DNA genòmic majors a 1kb¹¹¹. Les variants de nombre de còpies (CNVs) en són un exemple, i de fet, expliquen aproximadament el 8% de les encefalopaties epilèptiques. L'*array* d'hibridació genòmic comparatiu (aCGH)¹⁰⁹ és el test diagnòstic més utilitzats per a la detecció de CNVs, que poden afectar des d'un fragment d'un gen concret a un conjunt de gens diferents¹¹².

El mètode Sanger de seqüenciació de DNA es considera la tècnica estàndard d'elecció per a detectar variants en gens d'interès, ja que té la capacitat d'estudiar seqüències bastant llargues i proporciona uns resultats molt acurats i fiables¹¹³. Aquest mètode pertany a la primera generació de tècniques que implementen la inhibició de l'acabament de seqüència amb dideoxinucleòtids per a llegir la seqüència del DNA, i va ser inventada per Sanger l'any 1977¹¹⁴. Un dels gens que s'ha estudiat més sovint

amb aquesta tècnica és el canal de sodi SCN1A, gen bastant específic i candidat primari en casos de síndrome de Dravet. No obstant això, el test genètic seguint aquest procediment està disponible per a molts altres gens, tot i que té com a principal limitació el fet que es tracta d'una tècnica llarga i cara si tenim en compte cada gen de forma individual¹¹⁵. Aquesta limitació es fa més evident a l'hora d'analitzar múltiples seqüències per a identificar-ne possibles variants, convertint-la en una tècnica poc encertada per al diagnòstic molecular de malalties amb elevada heterogenitat de locus¹¹³.

En casos com l'epilèpsia on la variabilitat genètica és elevada, s'acostuma a realitzar aCGH i, en cas de sospita de gens concrets, se sol combinar amb el mètode Sanger. No obstant això, tenint en compte que les EIEE presenten una al nivell de solapament fenotípic entre síndromes, resulten en una baixa efectivitat d'aquesta estratègia d'hipòtesi dirigida per a obtenir un diagnòstic molecular¹⁰⁹

4.2.1. Tecnologies de seqüenciació massiva

Les tecnologies de seqüenciació massiva o de nova generació (NGS) són mètodes desenvolupats en els últims anys que s'han començat a aplicar per al diagnòstic genètic com a alternativa al mètode Sanger en els casos de malalties amb elevada variabilitat fenotípica i genètica, com les EIEE¹⁰⁷. Les NGS són capaces de seqüenciar un conjunt gran de gens, l'exoma complet corresponent a les regions codificants per a proteïna o el genoma complet en una sola reacció. D'aquesta manera es poden detectar variants potencialment causants del fenotip, incloent-hi mutacions de nova aparició (*de novo*) i familiars. L'ús d'aquestes noves tecnologies tant per a recerca com per a diagnòstic ha donat lloc a una identificació exponencial de gens associats al fenotip de les EIEE, augmentant encara més la heterogeneïtat de locus característica d'aquesta malaltia¹¹⁶.

El procés de les tècniques NGS consta de diversos passos iguals per als diferents mètodes¹¹⁵. Qualsevol de les tècniques comença amb un procés de fragmentació del DNA total del pacient per a crear una llibreria i la posterior NGS dels fragments obtinguts, procés que es modifica en funció de la plataforma que s'utilitza per a seqüenciar¹¹⁷ (Figura 10). Després del procés, les dades crues resultants són alineades sobre el genoma de referència i, posteriorment, les variants són cridades i anotades a partir de les bases de dades disponibles. Diferents *softwares* s'utilitzen per a realitzar tot aquest processament de les dades. Finalment, les variants són filtrades i analitzades per tal de trobar-ne aquelles potencialment causals de la malaltia, les

quals seran validades amb el mètode Sanger per eliminar els falsos positius que puguin sorgir.

Amb els mètodes NGS el repte de la identificació de gens de la malaltia es trasllada a la interpretació de les dades obtingudes, ja que s'identifiquen mils de variants per a cada pacient. Només una o dues, però, poden explicar el fenotip del pacient en estudi. Per tant, la prioritització de variants és crucial en el procés d'identificació del gen causal.

En general, la major part d'estudis fets fins al moment assumeixen que les variants amb major probabilitat d'impacte en malalties Mendelianes són aquelles que no es troben o són rares en la població general, que afecten regions dels gens que codifiquen per a proteïna o que afecten directament a la funció final d'aquesta¹¹⁰. Tot i això, en els últims anys s'han començat a considerar variants que no compleixen estrictament aquests criteris com a potencialment patogèniques, gràcies a l'evolució de les tècniques i del millor coneixement del funcionament de les regions no codificants del genoma^{118,119}.

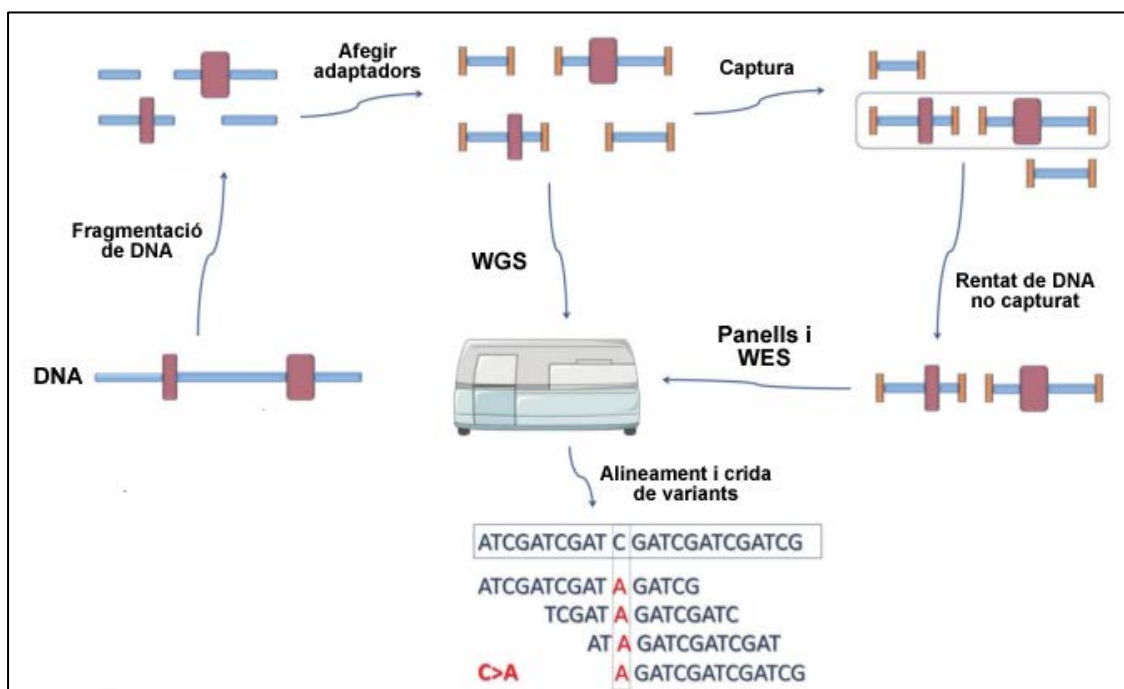


Figura 10 | Esquema del protocol general NGS. Partint del DNA total del pacient, es procedeix a la fragmentació i posterior unió d'adaptadors necessaris per a la posterior unió dels diferents fragments a la *flowcell* del seqüenciador. Tant els panells com el mètode WES requereixen d'un pas de captura de la regió d'interès mitjançant hibridació o *multiplex* PCR amb el posterior rentat de totes aquelles regions no capturades, obtenint la llibreria final. Per al mètode WGS la llibreria no requereix del pas de captura, i aquesta es carrega directament a la plataforma NGS. Les dades crues obtingudes del seqüenciador s'alineen amb el genoma de referència i finalment es realitza la crida de variants per a iniciar l'anàlisi de filtrat i prioritització de variants (Adaptada de Jiang, 2014¹²⁰).

Múltiples estudis utilitzant tècniques NGS en els últims anys¹²⁰, tant per a EIEE com per a altres malalties neurològiques severes han reportat un gran nombre de nous diagnòstics. En concret, reculls d'estudis realitzats específicament en cohorts de pacients d'encefalopaties epilèptiques d'inici precoç, estableixen una taxa de diagnòstics entre el 22,6 i el 44,8%, indicant que l'ús de les aproximacions NGS podrien postular-se com a potencials eines diagnòstiques d'aquesta malaltia¹²¹.

▪ **Panell de gens**

La seqüenciació NGS d'un panell de gens consisteix a seqüenciar un grup de gens diana concret a una alta profunditat de lectura (nombre de vegades que es llegeix cada base) i a un preu més reduït, en comparació amb altres tècniques que abarquen una major part del genoma¹¹⁶. Existeixen panells comercials o personalitzats, els quals permeten un disseny en funció de les malalties d'interès, per tant, donen la possibilitat d'estudiar gens potencialment rellevants clínicament per a un fenotip concret.

El factor crucial dels panells és el disseny del mètode en què es basarà la captura de les regions d'interès (Figura 10). Les dues aproximacions en què es poden basar són la hibridació o la *multiplexed* PCR. El primer cas consisteix en la hibridació dels fragments de DNA amb sondes complementàries a les regions d'interès, a partir de la qual es purifica la mostra per a obtenir els fragments d'interès. La purificació es pot realitzar o bé per unió de les sondes a un *microarray* o bé amb una solució de boles magnètiques marcades¹²². L'estratègia de *multiplex* PCR, consisteix en un conjunt de reaccions d'amplificació (PCR) simultànies que amplifiquen els diferents fragments d'interès per a ser seqüenciats posteriorment.

Els panells de gens són la metodologia NGS que més s'aproxima al que s'ha estat realitzant amb el mètode Sanger, però facilitant l'anàlisi de diversos gens a la vegada, reduint-ne el cost i la duració¹¹⁶. Aquesta opció és adequada per a aquelles malalties que tenen un nombre limitat de gens associats al fenotip, com ara l'esclerosi tuberosa, un trastorn multisistèmic amb afectació neurològica i epilèpsia associat a dos únics gens: TSC1 i TSC2.

▪ **Exoma complet**

La seqüenciació de l'exoma complet (WES) té com a regió diana aquelles zones del genoma que codifiquen per a proteïnes. Això tan sols representa entre un 1 i un 2%

del total del genoma, però es tracta de la regió a la qual se li atribueixen aproximadament el 85% de mutacions associades a malaltia¹¹¹.

El procés per a la captura de l'exoma consisteix en sondes d'oligonucleòtids que s'hibriden a les seqüències exòniques diana del DNA genòmic total fragmentat, seguit per un enriquiment i NGS de les seqüències capturades (Figura 10). El procés de captura exòmica, però, implica diferents nivells de representació de cada regió en funció de l'èxit d'hibridació de cada sonda, donant com a conseqüència una gran variabilitat en la profunditat de lectura en els diferents exons seqüenciats¹¹⁷. Els *kits* que s'utilitzen per a realitzar WES estan dissenyats per a capturar tots els exons i les seves seqüències flanquejants, i alguns també inclouen sondes per a microRNAs i altres regions d'interès¹²³. Les últimes versions de diferents kits de captura, també inclouen la possibilitat de detectar variants a nivell e DNA mitocondrial. Dintre de les regions cobertes en el WES, en alguns casos, també es poden detectar CNVs amb *softwares* específics¹²⁴

El desenvolupament d'estudis WES ha augmentat de forma exponencial per a l'estudi de casos en trastorns complexos a nivell genètic. No obstant això, quan la malaltia està poc caracteritzada a nivell molecular, l'alt nombre de variants que s'identifiquen requereixen dissenys d'estratègies de filtratge i prioritziació més elaborats per a reduir-ne el nombre¹²⁵. La informació sobre l'herència de les diferents variants resulta de gran ajuda en aquests casos, raó per la qual els estudis familiars WES són cada cop més freqüents i necessaris per a arribar a identificar la causa genètica de la malaltia¹¹⁵.

▪ **Genoma complet**

La seqüenciació del genoma complet (WGS) proporciona informació per a poder caracteritzar tot tipus de variants genètiques en qualsevol part del genoma¹⁰⁹. D'aquesta manera permet accedir a la informació obtinguda amb el mètode WES i, addicionalment, a totes aquelles regions no traduïdes del 99% restant del genoma. Aquestes solen tenir rols reguladors sobre les regions codificants de proteïna, com ara RNAs no codificants o punts d'unió a factors de transcripció. El problema d'aquestes regions desconegudes del genoma és la poca informació disponible sobre la seva funció i rellevància, i per tant, detectar variants que podrien tenir impacte en un fenotip concret en aquestes zones del genoma suposa un repte addicional per a la prioritziació de variants¹¹⁶.

El protocol del mètode WGS segueix el mateix esquema que la resta de protocols NGS però la diferència principal és l'eliminació de la fase de captura (Figura 10), i per tant, permet una cobertura uniforme de totes les regions, encara que més baixa que l'obtinguda amb la seqüenciació de l'exoma complet. Aquesta uniformitat en la cobertura permet la detecció de variants estructurals i CNVs de forma més eficient que en el WES¹¹⁵.

Totes aquestes propietats aportades pel mètode WGS, combinen en una sola tècnica el mètode tradicional de seqüenciació i mapejat de genoma. Però la implantació d'aquesta tècnica presenta encara molts reptes i problemes pendents de millora, entre els quals hi ha moltes ambigüitats i errors en l'anotació de les variants i en la capacitat d'interpretació dels canvis¹²⁶. El conjunt d'aquestes carències, sumat a l'elevat cost de la tècnica en comparació amb la resta de tècniques NGS, suposen un balanç cost-benefici poc rentable actualment, en comparació amb els panells i el WES.

La integració i valoració de totes aquestes tècniques és important per tal d'establir un protocol d'actuació per a cada fenotip concret. S'estan duent a terme múltiples estudis en els últims anys^{116,120,121} per a establir el cost-benefici de cada tècnica per a les EIEE i moltes altres malalties minoritàries. L'objectiu és poder definir la millor estratègia per tal d'augmentar el percentatge diagnòstic en cada cas, per així refinar l'abordatge clínic dels pacients i dissenyar potencials teràpies per a cada un dels casos, especialment per a malalties que no responen als tractaments actuals, com és el cas de les encefalopaties epilèptiques d'inici precoç.

A l'inici de la tesi que aquí es presenta, el diagnòstic habitual de les EIEE es basava en l'estudi de paràmetres de neuroimatge i bioquímics específics, juntament amb la seqüenciació gradual d'un nombre reduït de gens causals coneguts en aquell moment com SCN1A, STXBP1 o CDKL5. Coincidint amb el creixement exponencial de la disponibilitat de tècniques NGS, es va plantejar estudiar el rendiment diagnòstic i la potencialitat del descobriment de nous gens associats al fenotip EIEE mitjançant la seqüenciació de l'exoma complet. Amb aquesta finalitat es van establir els objectius detallats a continuació.

OBJECTIUS

El Servei de Neurologia Pediàtrica de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron porta el seguiment d'un gran nombre de pacients afectes per encefalopaties epilèptiques d'inici precoç. La majoria d'aquests infants no disposen de diagnòstic molecular, ja que aquest és difícil d'obtenir amb les tècniques tradicionals de seqüenciació degut a l'elevada variabilitat fenotípica i genètica que caracteritza aquesta patologia.

L'**objectiu principal** d'aquesta tesi doctoral és estudiar l'aplicabilitat de les noves tècniques de seqüenciació massiva per a la millora del diagnòstic molecular de pacients EIEE, tant en la detecció de variants patogèniques en gens associats al fenotip com en el descobriment de nous gens contribuïdors a la malaltia.

Per tal d'assolir aquesta fita, s'han desenvolupat els següents **objectius específics**:

1. Anàlisi de la seqüenciació exòmica d'una cohort de 81 pacients per a comprovar l'aplicació de les tècniques NGS per al diagnòstic de les EIEE.

Dels resultats obtinguts d'aquest primer objectiu, han sorgit tres objectius addicionals en relació al tipus de gens afectats en els diferents pacients estudiats:

2. Estudi de la correlació genotip-fenotip de diversos gens prèviament associats a la malaltia: *GNAO1* i *KCNQ2*.
3. Determinació de la utilitat d'un model de sobreexpressió de RNA en peix zebra com a estratègia per a la selecció ràpida de variants potencialment patogèniques per al fenotip epilèptic.
4. Demostració de la potencial contribució de gens nous al fenotip EIEE: validació funcional de la variant P380L del gen codificant pel receptor muscarínic d'acetilcolina tipus 1.

MATERIALS I MÈTODES

1. Individus

Aquest estudi s'ha realitzat a partir de mostres de 80 pacients afectes d'encefalopatia epilèptica severa, la majoria d'ells (92,5%) amb debut durant el primer any de vida i majoritàriament (80%) sense antecedents familiars d'epilèpsia (Taula 6). El 90% dels pacients estudiats presenten discapacitat intel·lectual o retard en el neurodesenvolupament. En 38 pacients es va poder determinar la presència de T.E.A, essent positiu en un 47,37% dels casos. El 70% de pacients de la cohort estudiada presenten encefalopatia, és a dir, un deteriorament cogintiu a causa de les crisis. Pel que fa alteracions motores, el 70% dels pacients en presenten, sent la tetraparèsia espàstica (16,05%), la tetraparèsia hipotònica (12,35%) i l'atàxia (7,41%) les formes majoritàries. L'electoencefalograma i la ressonància magnètica (IRM) son les dues proves més realitzades en pacients epilèptics. A la nostra cohort, s'han realitzat ambdues al 99% dels pacients, resultant en alteracions a l'EEG en el 96,3% dels pacients i a la IRM cerebral en el 38,8% els pacients estudiats. Les anomalies en les proves d'imatge, no obstant, han estat en general inespecífiques i no indicatives de processos adquirits de destrucció cerebral. Malgrat que alguns dels pacients evolucionen favorablement, en un 10% hi ha remissió de les crisis i en un 4,94% es recupera la normalitat en l'activitat elèctrica cerebral, el pronòstic per aquests pacients és bastant pobre, i concretament en aquesta cohort referim una taxa de mortalitat del 5%.

Gran part dels pacients inclosos a l'estudi, han estat visitats per l'equip del servei de Neurologia Pediàtrica de l'Institut Universitari de la Vall d'Hebron (HUVH). No obstant això, gràcies a col·laboracions amb altres equips de neuropediatres espanyols també s'han inclòs pacients d'altres hospitals: Hospital Universitario Reina Sofia de Córdoba (8) en col·laboració amb el Dr. López.Laso, Hospital CUV Arrixaca de Múrcia (4) en col·laboració amb la Dra, Domingo, Hospital Universitario Miguel Servet de Saragosa (7) en col·laboració amb el Dr. López Pisón, Hospital Universitario Donostia (3) en col·laboració amb la Dra. Martí i Hospital Universitari de Saarlandes, Alemanya (1) en col·laboració amb la Dra. Flotats.

Tots els tutors legals dels pacients han signat el consentiment informat, aprovat prèviament pel comitè ètic de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron, per tal de ser inclosos a l'estudi.

Taula 6 | Descripció clínica dels 80 pacients afectes per encefalopatia epilèptica d'inici precoç, inclosos en el present estudi

P	G	DN	Edat debut	AF	Tipus de crisis	DCpCE	DI/RPM	TEA	Alteració motora	FD	EEG	IRM	Diagnòstic i evolució
1	H	27/01/2003	3m	Si	Clòniques, Tòniques	Si	CA	NV	Tetraparèsia espàstica	Si	Basal adequada, signes disfunció neuronal frontals bilaterals, multifocal en l'evolució	Normal	EIEE
2	D	23/07/2013	NN	Si	Tòniques	Si	Greu	No	Tetraparèsia distònica	No	Discontinuu i multifocal	Normal	EIEE
3	H	14/03/2000	NN	No	Espasmes, Tòniques, estatus convulsius	ND	Si	NV	Tetraparèsia espàstica	No	Hipsarrítmia, crisis parcials amb activitat canviant	Atròfia progressiva, retard mielinització	MMPSI, EIEE i tetraparèsia espàstica (Èxitus 9a)
4	H	05/05/2003	NN	No	Tónico-clòniques, hipomotors	No	Si	No	Atàxia lleu, torpesa motriu, hipertonia aquília	No	Mala organització basal, paroxismes generalitzats	Dismòrfa ventricular, lleu atròfia cerebel·losa i lesió SB	Epilepsia neonatal amb RM i trastorn de conducta
5	D	21/05/2011	7m	No	Espasmes	Transitòria	Lleu - moderat	No	Hipotonia de fons	Si	Hipsarrítmia	Normal	Sd West amb RM
6	H	24/11/2004	2m	No	Tòniques, espasmes	Si	Greu	NV	Tetraparèsia espàstica, hiperinèsia, moviments coreoatetòtics	No	Afectació encefàlica difusa sense anomalies epileptiformes	Hipogènèsia CC i atròfia progressiva	EIEE
7	D	14/04/2012	4,5m	No	Tòniques, mioclòniques, espasmes	Si	Si	NV	Hipotonia de fons	No	Mal estructurat, descàrregues multifocals, espasmes	Lleu dilatació dels espais subaracnoïdals	EIEE (Èxitus 9m)

P (pacient), G (gènere), DCpCE (deteriorament cognitiu per crisis epilèptiques), NN (neonatal), m (mes), a (any), AF (antecedents familiars d'epilepsia), FD (fenotip dismòrfic), CA (cap adquisició), NV (no valorable), TEA (trastorn de l'espectre autista), ND (no descrit), SB (substància blanca), CC (cos callós), TE (trunc de l'encèfal), RM (retard mental), RGD (retard generalitzat del desenvolupament), LOIS (espasmes infantils d'inici tardà), BFNS(espasme neonatal benignes), Sd (síndrome), TCG (tónico-clònic generalitzades), LC (lliure de crisis), MMPSI (epilepsia parcial migratòria de la infància)

Taula 6 | Continuació

P	G	DN	Edat debut	AF	Tipus de crisi	DCpCE	DI/RPM	TEA	Alteració motora	FD	EEG	IRM	Diagnòstic i evolució
8	H	27/11/2012	NN	No	Tòniques, mioclòniques	Si	CA	NV	Tetraparèsia hipotònica	No	Multifocal, supressió de brots, patró migratori	Retard mielinització, atrofia cortical	EIEE (Èxitus 16m)
9	H	19/01/2001	3m	Si	Estatus focal, tòniques	Si	CA	NV	Tetraparèsia hipotònica-espàstica	No	Basal alterada, paroxismes temporals drets	Disgenèsia CC, hipoplàsia vermis cerebel·lós i de TE, ventriculomegàlia, déficit mielinització, atrofia global	EIEE, RM i tetraparèsia espàstica greu
10	D	03/10/2010	5m	No	Tòniques	No	Si	Si	Hipotonia de fons	No	Basal alterada lenta	Normal	Epilèpsia criptogènica i RGD (LC > 9m)
11	H	13/08/2009	5m	No	Estatus tònic	No	Si	Lieu	No	No	Paroxismes bilateral	Normal	Sd Dravet
12	D	09/02/2001	12m	No	Mioclòniques, astàtiques	Si	Si	No	Atàxia, distonia multifocal	No	Anomalias multifocals generalitzades i basal desestructurada	Normal	EIEE
13	D	12/11/2009	5m	No	Espasmes, tòniques	Si	CA	NV	Tetraparèsia hipotònica	No	Multifocal, basal desestructurada	Normal	EIEE
14	H	25/10/2005	17m	No	Espasmes, Tòniques, absències atípiques, hipomotors	Si	Si	Greu	No	No	Multifocal, basal desestructurada	Normal	EIEE, epilèpsia refractària i TEA
15	H	31/03/2001	12m	No	Espasmes	Primers anys	Si	Si	Atàxia lleu	No	Paroxismes generalitzats, basal mal estructurada	Normal	Epilèpsia refractària, RGD i TEA (LC > 5a)

P (pacient), G (gènere), DCpCE (deteriorament cognitiu per crisis epilèptiques), NN (neonatal), m (mes), a (any), AF (antecedents familiars d'epilèpsia), FD (fenotip dismòrfic), CA (cap adquisició), NV (no valorable), TEA (trastorn de l'espectre autista), ND (no descrit), SB (substància blanca), CC (cos callós), TE (trunc de l'encèfal), RM (retard mental), RGD (retard generalitzat del desenvolupament), LOIS (espasmes infantils d'inici tardà), BFNS(espasme neonatal benignes), Sd (síndrome), TCG (tónico-clònic generalitzades), LC (lliure de crisis), MMPSI (epilèpsia parcial migratòria de la infància)

Taula 6 | Continuació

P	G	DN	Edat debut	AF	Tipus de crisis	DCpCE	DI/RPM	TEA	Alteració motora	FD	EEG	IRM	Diagnòstic i evolució
16	D	27/12/2007	4m	No	Espasmes, tòniques	Si	Si	No	Hipotonia de fons	No	Hipsarrítmia, paroxísmes centroparietals bilaterals i multifocals	Normal	Sd West i RGD
17	D	10/10/1994	1m	No	Espasmes, TCG	Si	Greu	Si	Tetraparèsia espàstica i atàxia	No	Multifocal i basal amb disfunció neuronal	Normal	Sd West, EIEE, RM
18	D	30/03/2006	7m	No	Espasmes, tòniques	Si	Si	Si	Torpesa motriu	No	Paroxísmes generalitzats	Normal	Espasmes infantils, TEA i RGD
19	D	11/08/2011	2m	No	Hemiclòniques hipermotores, espasmes, TCG	Si	Si	Si	Hipotonia marcada	No	Focalitat centrotemporals, multifocal, hipsarrítmia	Normal	Epilepsia focal i Sd West criptogènica
20	H	10/05/2013	NN	No	Tòniques, TCG	Si	CA	NV	Tetraparèsia hipotònica	Si	Discontínu, multifocal, basal alterada	CC prim	EIEE (Èxitus 14 m)
21	D	04/01/2006	2m	No	Tòniques	Si	Profund	NV	Tetraparèsia espàstica	No	Multifocal i basal desestructurada	Atròfia cerebral i cerebel·losa progressiva i lleu hipomielinització	EIEE i RGD
22	D	25/09/2002	1,5m	No	Clonies multifocals, tòniques	Si	Si	Si	Atàxia, torpesa motriu	No	Anomalies lentes irritatives esquerres, paroxísmes frontals bilaterals	Normal	EIEE
23	D	20/06/2005	7m	No	Espasmes, focals generalitzades	No	Si	Si	Torpesa motriu	No	Descàrregues generalitzades	Normal	Epilepsia generalitzada criptogènica

P (pacient), G (gènere), DCpCE (deteriorament cognitiu per crisis epilèptiques), NN (neonatal), m (mes), a (any), AF (antecedents familiars d'epilèpsia), FD (fenotip dismòrfic), CA (cap adquisició), NV (no valorable), TEA (trastorn de l'espectre autista), ND (no descrit), SB (substància blanca), CC (cos callós), TE (tronc de l'encèfal), RM (retard mental), RGD (retard generalitzat del desenvolupament), LOIS (espasmes infantils d'inici tardà), BFNS(espasmes neonatals benignes), Sd (síndrome), TCG (tónico-clònic generalitzades), LC (lliure de crisis), MMPSI (epilepsia parcial migratòria de la infància)

Taula 6 | Continuació

P	G	DN	Egat debut	AF	Tipus de crisi	DCpCE	DI/RPM	TEA	Alteració motora	FD	EEG	IRM	Diagnòstic i evolució
24	D	09/09/2010	1,5m	No	Tòniques, espasmes	Si	Greu	NV	Tetraparèsia espàstica severa	No	Multifocal, base alterada	Atròfia global sobretot a vermis cerebel·lós i sospita de displasia cortical temporal dreta	EIEE
25	D	03/04/2008	4m	No	Espasmes	Si	CA	NV	Tetraparèsia hipotònica	No	Proximes temporal drets, multifocal, afectació encèfàlica difusa	Hipoplàsia vermis cerebel·lós i atròfia progressiva	EIEE
26	D	10/08/2011	NN	No	Clòniques, espasmes	Si	CA	NV	Tetraparèsia espàstica	No	Afectació encèfàlica difusa, multifocal	Atròfia global severa progressiva i afectació bitlàmica	Encefalopatia metabòlica, epilèpsia refractària tipus espasmes
27	D	26/06/2013	5m	No	Mioclòniques	Si	Greu	NV	Hipotonia	No	Anomalies epilèptiques generalitzades, multifocal	Normal	EIEE epilèpsia mioclònica
28	D	26/05/2009	5m	No	Espasmes en flexió	No	Lleu - no	No	no	No	Hipsarrítmia	Normal	Sd West (LC > 8m)
29	H	31/07/2003	NN	No	Tòniques, espasmes, mioclòniques	Si	CA	NV	Tetraparèsia espàstica greu	No	Afectació encèfàlica difusa sense anomalies epilèptiformes	Atròfia progressiva severa amb dilatació ventricular severa	EIEE
30	H	28/11/2007	4m	No	Espasmes, tòniques	Si	Profund	NV	Tetraparèsia hipotònica	No	Paroxístic multifocal	Atròfia cerebral generalitzada	EIEE

P (pacient), G (gènere), DCpCE (deteriorament cognitiu per crisis epilèptiques), NN (neonatal), m (mes), a (any), AF (antecedents familiars d'epilèpsia), FD (fenotip dismòrfic), CA (cap adquisició), NV (no valorable), TEA (trastorn de l'espectre autista), ND (no descrit), SB (substància blanca), CC (cos callós), TE (tronc de l'encèfal), RM (retard mental), RGD (retard generalitzat del desenvolupament), LOIS (espasmes infantils d'inici tardà), BFNS(espasmes neonatals benignes), Sd (síndrome), TCG (tónico-clònic generalitzades), LC (lliure de crisis), MMPSI (epilèpsia parcial migratòria de la infància)

Taula 6 | Continuació

P	G	DN	Edat debut	AF	Tipus de crisis	DCpCE	DI/RPM	TEA	Alteració motora	FD	EEG	IRM	Diagnòstic i evolució
31	D	29/03/2014	NN	No	Tòniques, espasmes	Si	Si	NV	Tetraparèsia espàstica	No	Supressió de brots en son-vigília i paroxismes generalitzats, basal desestructurada	Normal	Sd Ohtahara
32	H	10/12/2004	NN	Si	Espasmes	Lactant	Greu	Si	Atàxia	No	Hipsarrítmia	Normal	Sd West, RGD i TEA
33	D	11/02/2012	1,5m	No	TCG, tòniques	Si	Si	NV	Hipotonia	No	Anomalies bifrontals, multifocal, signes irritatius	Normal amb diatació espais subaracnoidals	EIEE
34	D	26/07/2011	4m	Si	TCG	No	Si	Si	Torpesa motriu	No	Normal	Normal	Sd. Dravet
35	D	03/01/2001	18m	No	Espasmes, tòniques	No	Si	Si	No	No	Puntes rolàndiques sobre basal desestructurada i lenta	Normal	LOIS, transtorn greu de conducta
36	D	12/08/2014	NN	No	Clòniques, espasmes	Si	Si	NV	No	No	Multifocal, basal desestructurada	Normal	EIEE
37	D	06/02/2014	NN	No	Tòniques	Si	CA	NV	Tetraparèsia espàstica i hipotonia axial	No	Basal difusa, multifocal ventroparietal	Atròfia cerebral, CC prim i retard mielinització	EIEE
38	D	19/03/2013	NN	No	ND	ND	ND	NV	ND	ND	Punta-ona frontotemporals	Dismorfia ventricular, hipogenesia CC	EIEE (LC > NN)
39	D	14/09/2002	4m	No	Espasmes	Si	Greu	NV	Tetraparèsia espàstica i hipotonia	No	Hipsarrítmia	Normal	EIEE

P (pacient), G (gènere), DCpCE (deteriorament cognitiu per crisis epilèptiques), NN (neonatal), m (mes), a (any), AF (antecedents familiars d'epilèpsia), FD (fenotip dismòrfic), CA (cap adquisició), NV (no valorable), TEA (trastorn de l'espectre autista), ND (no descrit), SB (substància blanca), CC (cos callós), TE (tronc de l'encèfal), RM (retard mental), RGD (retard generalitzat del desenvolupament), LOIS (espasmes infantils d'inici tardà), BFNS(espasmes neonatals benignes), Sd (síndrome), TCG (tónico-clònic generalitzades), LC (lliure de crisis), MMPSI (epilèpsia parcial migratòria de la infància)

Taula 6 | Continuació

P	G	DN	Edat debut	AF	Tipus de crisi	DCpCE	DI/RPM	TEA	Alteració motora	FD	EEG	IRM	Diagnòstic i evolució
40	H	09/10/2012	NN	No	ND	Si	CA	NV	Hipotonia cervicoaxial, hipertonia EE	No	Basal desorganitzada	Dilatació ventricular, CC prim, atrofia frontal lleu, retard mielinització	EIEE
41	D	16/04/2013	2,5m	No	Tònico-clòniques, hipomotors	Si	Greu	NV	NA	No	NA	Atrofia cerebral severa	EIEE
42	D	02/06/2008	NN	No	Epilepsia refractària	Si	CA	NV	Hipotonia cervicoaxial, hipertonia EE	Si	Episodis electroclínic generalitzats	Normal	EIEE
43	D	15/06/1997	4,5m	No	Mioclòniques	No	Si	NV	Retard en el desenvolupament	No	Normal	Normal	Epilepsia miclònica
44	H	12/01/2013	NN	No	ND	Si	ND	NV	NA	No	Alterat	Normal	EIEE (Èxitus > 4m)
45	D	11/09/2014	5m	No	Espasmes infantils	No	Lieu	No	No	Si	Focal parietal bilateral i afectació cefàlica difusa amb evolució normal	Normal	Espasmes infantils
46	H	08/06/2015	NN	No	Tòniques, espasmes, TCG	Si	CA	NV	Tetraparèsia hipotònica	Si	Anomalies epileptiques rolàndiques dretes i temporals biaterals, afectació cefàlica difusa	Hipoplasia de vermis cerebel·lós i CC prim	EIEE
47	H	28/01/2015	NN	No	Clòniques, espasmes, tòniques	Si	CA	NV	Tetraparèsia hipotònica	No	Basal discontinua i desorganitzada, focal esquerra, status i multifocal	Normal	EIEE

P (pacient), G (gènere), DCpCE (deteriorament cognitiu per crisis epileptiques), NN (neonatal), m (mes), a (any), AF (antecedents familiars d'epilepsia), FD (fenotip dismòrfic), CA (cap adquisició), NV (no valorable), TEA (trastorn de l'espectre autista), ND (no descrit), SB (substància blanca), CC (cos callós), TE (tronc de l'encèfal), RM (retard mental), RGD (retard generalitzat del desenvolupament), LOIS (espasmes infantils d'inici tardà), BFNS(espasmes neonatals benignes), Sd (síndrome), TCG (tónico-clònic generalitzades), LC (lliure de crisis), MMPSI (epilepsia parcial migratòria de la infància)

Taula 6 | Continuació

P	G	DN	Edat debut	AF	Tipus de crisi	DCpCE	DI/RPM	TEA	Alteració motora	FD	EEG	IRM	Diagnòstic i evolució
48	H	01/07/2015	3m	No	Tòniques versives	Si	Greu	NV	Tetraparèsia espàstica	No	Basal desestructurada	Disminució volum SB	EIEE
49	D	26/08/2015	2m	No	Mioclòniques, tòniques, tònico-clòniques	Si	CA	NV	Hipotonia generalitzada	No	Multifocal generalitzat	Pèrdua volum parènquima	EIEE
50	D	26/08/2015	2m	No	Mioclòniques, tòniques, tònico-clòniques	Si	Profund	NV	Hipotonia generalitzada	No	Multifocal generalitzat	ND	EIEE
51	H	05/10/2009	1m	Si	Clòniques, convulsives, espasmes	Si	CA	NV	Tetraparèsia hipotònica asimètrica	Si	Basal alterada, afectació neuronal difusa, anomalies epilèptiques multifocals	Atròfia, retard mielinització, CC prim	EIEE
52	H	19/08/2013	6m	No	Espasmes	Si	Moderat	Si	No	No	Hipsarrítmia, paroxismes multifocals	Ventriculomegàlia, lleu augment espais pericerebrals	Sd. West
53	D	01/10/2009	4a	No	Atòniques, tòniques, absències, TCG	Si	Moderat	No	No	No	Descarrega generalitzada, basal alterada	Normal	EIEE
54	H	22/08/2009	4m	No	Espasmes	Si	Moderat	NV	Torpesa motriu	No	Multifocal	Discreta atròfia cerebral	EIEE

P (pacient), G (gènere), DCpCE (deteriorament cognitiu per crisis epilèptiques), NN (neonatal), m (mes), a (any), AF (antecedents familiars d'epilèpsia), FD (fenotip dismòrfic), CA (cap adquisició), NV (no valorable), TEA (trastorn de l'espectre autista), ND (no descrit), SB (substància blanca), CC (cos callós), TE (tronc de l'encèfal), RM (retard mental), RGD (retard generalitzat del desenvolupament), LOIS (espasmes infantils d'inici tardà), BFNS(espasmes neonatals benignes), Sd (síndrome), TCG (tónico-clònic generalitzades), LC (lliure de crisis), MMPSI (epilèpsia parcial migratòria de la infància)

Taula 6 | Continuació

P	G	DN	Edat debut	AF	Tipus de crisi	DCpCE	DI/RPM	TEA	Alteració motora	FD	EEG	IRM	Diagnòstic i evolució
55	H	17/03/2016	NN (4ddv)	Si	Tòniques versives	Si	Lieu-moderat	No	No	No	Inici focal amb evolució multifocal	Normal	EIEE
56	D	04/07/2011	18m	No	Absència, tòniques, convulsives	Transitòria	No	No	No	No	Anomalies inicials epileptiformes generalitzades i focals rolàndiques bilaterals amb basal normal	Normal	EIEE (LC)
57	D	18/01/2011	NN (3ddv)	Si	Tòniques	No	Moderat	No	Torpesa motriu i hipotonia	No	Multifocal	Normal	EIEE
58	D	03/01/2013	3m	No	Miclòniques	Si	Moderat	NV	Hipotonia	No	Transtorn irritatiu paroxíctic	Normal	EIEE
59	D	10/12/2014	NN	No	Tòniques	Si	CA	NV	Tetraparèsia espàstica i hipotonia axial	Si	Hipsarrítmia	Normal	EIEE (Sd. Ohtahara)
60	H	28/11/2012	1m	Si	Tòniques espasmes	No	Lieu	Si	Hemiplegia dreta inicial; evolució normal	No	Anomalies focals rolàndiques esquerres i bifrontals poc incidents; evolució normal	Retard lleu mielinització	Espases infantils i TEA (LC)
61	H	23/11/2013	18m	Si	Espasmes	No	Lieu - moderat	No	No	No	Anomalies generalitzades i focals temporals biaterals amb basal deficient	Pèrdua de volum cerebral global i hipocampal bilateral	LOIS
62	H	08/10/2014	3m	No	Espasmes	Si	Si	NV	ND	No	Punta-ona lenta generalitzada	Normal	West, Lennox-Gastaut
63	D	15/09/2011	3m	No	ND	ND	ND	NV	ND	ND	Punta-ona frontotemporal	Normal	EIEE

P (pacient), G (gènere), DCpCE (deteriorament cognitiu per crisis epileptiques), NN (neonatal), m (mes), a (any), AF (antecedents familiars d'epilèpsia), FD (fenotip dismòrfic), CA (cap adquisició), NV (no valorable), TEA (trastorn de l'espectre autista), ND (no descrit), SB (substància blanca), CC (cos callós), TE (tronc de l'encèfal), RM (retard mental), RGD (retard generalitzat del desenvolupament), LOIS (espasmes infantils d'inici tardà), BFNS(espasmes neonatals benignes), Sd (síndrome), TCG (tónico-clònic generalitzades), LC (loure de crisis), MMPSI (epilèpsia parcial migratòria de la infància)

Taula 6 | Continuació

P	G	DN	Edat debut	AF	Tipus de crisi	DCpCE	DI/RPM	TEA	Alteració motora	FD	EEG	IRM	Diagnòstic i evolució
64	H	14/08/2010	5m	No	Espasmes	No	Lleu	No	Torpesa motriu	No	Hipsarrítmia	Normal	Sd. West
65	D	26/11/2003	1m	No	Tòniques generalitzades	ND	Lleu	NV	ND	ND	Lentificació difusa	Normal	EIEE
66	H	24/07/2014	NN (1ddv)	No	Tòniques generalitzades	Si	Greu	Si	Paràlisi cerebral distònica	ND	Punta-ona aguda frontotemporal	Hiperintensitat talàmica	EIEE
67	D	17/05/2013	6m	No	Espasmes	No	Lleu-moderat	No	Torpesa motriu lleu	No	Hipsarrítmia, evolució normal	Normal	Sd. West Idiopàtic (LC)
68	H	18/08/2015	6m	No	Espasmes	No	Lleu-moderat	No	no	No	Lleugerament lentificat	CC prim	Espasmes infantils
69	H	18/07/2012	5m	Si	Espasmes	No	No	No	No	No	Hipsarrítmia	Normal	Espasmes infantils
70	D	20/10/2012	5m	No	Espasmes	No	Lleu	No	No	No	Basal desorganitzat i activitat àmplia temporal esquerra	Normal	Espasmes infantils
71	H	09/03/2012	5m	No	Espasmes	Si	Greu	NV	Hipotonia cervicoaxial i hipertonia EE	No	Basal difusa i lenta	Dilatació sistema ventricular supratentorial	Sd. West
72	H	16/12/2012	22m	Si	Tónico-clòniques, tòniques	Transitòria	Lleu	No	Torpesa motriu	No	Anomalies epileptiformes generalitzades	Normal	EIEE
73	D	19/09/2015	11m	Si	Espasmes	No	Lleu	Si	No	No	Anomalies epileptiformes temporals focals, evolució normal	Normal	LOIS (LC per tractament)
74	D	18/06/2014	NN	No	Clòniques inici i estatus epilèptics	Si	Moderat	Lleu	No	No	Supressió de brots i crisis focals; intercrític normal	Lesions NN focals SB, evolució normal	EIEE

P (pacient), G (gènere), DCpCE (deteriorament cognitiu per crisis epilèptiques), NN (neonatal), m (mes), a (any), AF (antecedents familiars d'epilèpsia), FD (fenotip dismòrfic), CA (cap adquisició), NV (no valorable), TEA (trastorn de l'espectre autista), ND (no descrit), SB (substància blanca), CC (cos callós), TE (tronc de l'encèfal), RM (retard mental), RGD (retard generalitzat del desenvolupament), LOIS (espasmes infantils d'inici tardà), BFNS (espasmes neonatals benignes), Sd (síndrome), TCG (tónico-clònic generalitzades), LC (lliure de crisis), MMPSI (epilèpsia parcial migratòria de la infància)

Taula 6 | Continuació

P	G	DN	Edat debut	AF	Tipus de crisis	DCpCE	DI/RPM	TEA	Alteració motora	FD	EEG	IRM	Diagnòstic i evolució
75	D	17/11/2016	NN	Si	Tòniques	Si	Moderat	No	No	No	Seriat amb anomalies multifocals i basal deficient	Normal	EIEE
76	H	11/06/2006	4m	NA	Espasmes, tòniques i tònico-clòniques	No	Moderat	Si	Torpesa motriu, hipotonia lleu basal	No	Basal deficient	Normal	TEA i epilepsia
77	H	20/05/2015	3m	No	Espasmes, hipomotors, tòniques	Si	CA	NV	Tetraparèsia hipotònica i moviments diskineïtics	No	Activitat desestructurada i anomalies epileptiformes multifocals	Atròfia global severa asimètrica supratentorial i cortical i destrucció massiva SB	EIEE
78	H	01/05/2009	NN	Si	Clòniques	Si	No	No	Hipotonia muscular, hiperreflexia	No	Normal	Normal	EIEE
79	H	01/06/2017	NN	No	Tòniques	Si	ND	NV	Hipotonia	ND	Supressió de brots i basal alterada	Normal	EIEE
80	H	17/11/2017	NN	No	Clòniques, tòniques	No	No	NV	No	No	Anomalies epileptiformes multifocals	Lesions de SB ense patró leucomalaic periventricular clar	Epilepsia precoç

P (pacient), G (gènere), DCpCE (deteriorament cognitiu per crisis epilèptiques), NN (neonatal), m (mes), a (any), AF (antecedents familiars d'epilèpsia), FD (fenotip dismòrfic), CA (cap adquisició), NV (no valorable), TEA (trastorn de l'espectre autista), ND (no descrit), SB (substància blanca), CC (cos callós), TE (tronc de l'encèfal), RM (retard mental), RGD (retard generalitzat del desenvolupament), LOIS (espasmes infantils d'inici tardà), BFNS (espasmes neonatals benignes), Sd (síndrome), TCG (tónico-clònic generalitzades), LC (lliure de crisis), MMPSI (epilepsia parcial migratòria de la infància)

2. Tècniques genètiques

L'estudi relacionat amb la seqüenciació genètica dels diferents individus de l'estudi s'ha desenvolupat, de forma principal, al laboratori de Neurologia Pediàtrica de l'Institut de Recerca de la Vall d'Hebron.

2.1. Extracció de DNA

Les mostres dels pacients i dels seus pares (trio) s'envien al laboratori de Neurologia Pediàtrica de l'Institut de Recerca de la Vall d'Hebron (VHIR), o bé a través de comunicació interna del recinte hospitalari o bé a través de missatgeria externa en els casos de mostres d'un altre hospital. Un cop al laboratori les mostres es processen per tal d'extreure'n el DNA.

2.1.1. Extracció de DNA a partir de sang total

En general les mostres solen arribar com a sang total a temperatura ambient, i es procedeix a realitzar-ne l'extracció de DNA mitjançant una adaptació del protocol estàndard *salting out*¹²⁷.

1. Lisi d'eritròcits: dissoldre la mostra de sang en un 45mL de solució de lisi d'eritròcits (TRIS 2M, MgCl₂ 1M, H₂O_{milliQ}), barrejar vigorosament i centrifugar a 3500rpm durant 15 minuts a 4°C. Decantar el sobrenedant i repetir el procés dissolent i homogeneïtzant el *pellet*.
2. Lisi de leucòcits i obtenció dels nuclis cel·lulars: Afegir al *pellet* sol·lució de lisi de leucòcits (WLCB: NaCl 5M, EDTA 0.5M, TRIS 2M, H₂O_{milliQ}), SDS al 10% i proteïnassa K. Incubar en agitació a 37°C tota la nit.
3. Lisi dels nuclis cel·lulars: A la solució anterior se li afegeix 1mL de clorur de sodi saturat a 5,5M i es deixa reposar a 4°C durant 15 minuts. A continuació se centrifuga a 3500rpm durant 15 minuts a 4°C i es recupera per decantació el sobrenedant en un tub nou. Aquest es torna a centrifugar i decantar per a eliminar les restes de sals.
4. Desproteïnitació: el sobrenedant obtingut es barreja amb un volum de cloroform per a separar les proteïnes i membranes del DNA, a partir de l'agitació i posterior centrifugació a 3500rpm durant 15 minuts a 4°C. La fase aquosa superior es recupera en un tub nou.

5. Precipitació del DNA: s'afegeixen dos volums d'etanol absolut per a precipitar el DNA en forma de *medusa*, la qual es recupera en un tub nou i es deixa assecat per a evaporar les restes d'etanol.
6. Segona precipitació de DNA: tant per a les mostres on s'ha obtingut medusa com per a les que no, el tub amb etanol absolut es manté a -20°C tota la nit. Al dia següent, el tub es centrifuga a 3500rpm durant 10 minuts per a precipitar les restes de DNA dissolt. El volum es decanta i es deixa assecat el *pellet* per a evaporar les restes d'etanol.
7. Resuspensió el DNA: el DNA obtingut, un cop sec, es resuspen en TE (TRIS2M, EDTA 0,5M, H₂O_{milliQ}), una solució salina que ajuda al manteniment de la mostra al llarg del temps. La mostra final es quantifica amb el nanodrop i s'emmagatzema a -20°C.

2.1.2. Extracció de DNA a partir de saliva

En aquells casos que l'extracció de sang no és possible, especialment en casos on l'individu no pot assistir a cap centre assistencial, s'obté el DNA a partir de la mostra de saliva enviada per correu amb els *kits* de la casa comercial DNA Genotek (Canada).

1. Recol·lecció de la mostra: la saliva de l'individu es recull en un recipient del *kit* Oragene^R-DNA, el qual conté una sol·lució que es barreja amb la mostra. El contingut s'incuba durant la nit a l'estufa a 50°C.
2. Eliminació de restes cel·lulars: el processament de la mostra es duu a terme amb el protocol del kit prepITTM-L2P, solució que conté els components necessaris per a extreure el DNA. S'afegeixen 40µl del *kit* per cada mil·lilitre de saliva, es barreja vigorosament i s'incuba 10 minuts en gel. Posteriorment se centrifuga la mostra a màxima velocitat durant 5 minuts, per separar el DNA dissolt de la resta de fragments cel·lulars.
3. Precipitació del DNA: Es recupera la fase superior on hi ha el DNA dissolt i es precipita barrejant amb dos volums d'etanol absolut per a precipitar-lo. La *medusa* resultant es recupera, s'asseca per evaporar el DNA.

4. Segona precipitació: els tubs es posen tota la nit a -20°C , i aleshores se centrifuguen per a precipitar un *pellet* de DNA, el qual es deixarà assecar.
5. Resuspensió del DNA: el DNA resultant, igual que en el protocol d'extracció a partir de sang, es dissol en TE, es quantifica i s'emmagatzema a -20°C .

2.2. Panell d'epilèpsies

L'equip del laboratori de Neurologia Pediàtrica del VHIR ha col·laborat amb l'empresa Sistemas Genómicos per a dissenyar i desenvolupar un panell per al diagnòstic genètic de l'epilèpsia: Epilepsy GeneProfile®. Aquest panell cobreix 200 gens, dels quals 32 són de síndromes associades a epilèpsia, 12 gens de malformacions del sistema nerviós central, 26 de trastorns metabòlics i 17 de neurodegeneratius, 75 gens de diferents tipus d'epilèpsies infantils, 4 gens de trastorns congènits de glicosilació, 5 gens de trastorns mitocondrials i 16 d'encefalopatia neonatal.

El servei de neurologia pediàtrica de l'HUVH, en casos de sospita diagnòstica clara d'un gen ha enviat mostra de pacients per a realitzar-ne l'estudi. L'empresa s'encarrega de preparar la llibreria mitjançant hibridació de sondes que inclouen els exons i regions intròniques adjacents als gens del panell. La seqüenciació es duu a terme en una plataforma Illumina *HiSeq* seguint l'estratègia *paired-ends*.

Finalment, l'empresa realitza l'anàlisi bioinformàtica de les dades i proporciona una proposta de diagnòstic, basant-se tant en aspectes genètics, per al pacient estudiat. Un cop obtingut el resultat al laboratori de Neurologia Pediàtrica del VHIR es relaciona la variant obtinguda amb el fenotip del pacient i, en cas de concordar, es confirma la variant per seqüenciació Sanger en el pacient, i també en els pares per a analitzar-ne la segregació.

2.3. Exoma complet

L'exoma complet (WES) es realitza per a tots aquells pacients amb clara sospita d'EIEE però que després de sotmetre's a diverses proves genètiques (aCGH, seqüenciació dirigida d'un gen concret pel mètode Sanger o panells de gens reduïts) segueixen sense diagnòstic genètic que n'expliqui el fenotip.

2.3.1. Preparació de les mostres

Les mostres de DNA dels tríos (pacient i progenitors) per a enviar als centres de seqüenciació es preparen a 100ng/μL en TE, per a tenir 4μg de DNA totals. Totes les mostres van identificades amb un codi propi del centre NGS, el qual va associat al codi del centre d'origen a través d'un manifest, on hi ha, a més, informació rellevant per a l'anàlisi de les diferents mostres (origen de pacient, *pedigree*, qualitat de la mostra, ...)

Per a determinar la qualitat de les mostres es quantifiquen tant per absorbància amb el NanoDrop (ThermoFisher Scientific, MA, USA) per comprovar les ratios de puresa 260/280 i 260/230, com pel mètode fluorimètric Quibit (ThermoFisher Scientific, MA, USA) per ajustar la concentració de DNA de doble cadena. Alhora, es realitza una electroforesi en gel d'agarosa de 50ng de DNA per a determinar-ne l'estat de degradació. Aquelles mostres que passin el control de qualitat seran processades amb NGS, les que queden fora són reemplaçades per noves mostres de major qualitat.

2.3.2. WES i dades crues

La seqüenciació de l'exoma complet en les mostres incloses en aquest projecte s'ha dut a terme en diferents centres, i per tant, el protocol de captura i d'anàlisi bioinformàtic utilitzat (*pipeline*) ha anat modificant-se en funció de les eines utilitzades a cadascun d'aquests laboratoris (Figura 11).

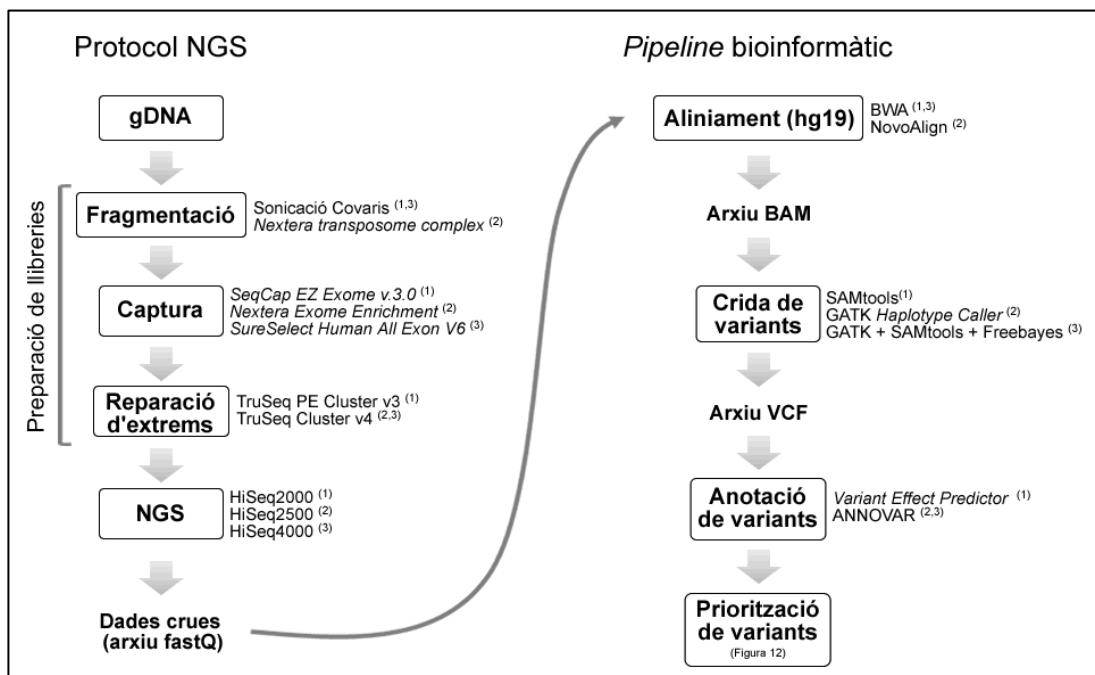


Figura 11 | Esquema protocols WES i *pipelines* d'anàlisi utilitzats. Descripció del procés general i especificació de les diferents tècniques, instruments o *softwares* utilitzats per a cada pas, segons el centre de seqüenciació: (1) CNAG, (2) UCL-SYNaPs, (3) CentoGene.

▪ **Centre Nacional d'Anàlisi Genòmica (CNAG)**

La fragmentació del DNA genòmic (1µg) es realitza per sonicació amb un aparell Covaris (MA, USA) seguit de l'enriquiment de les regions exòniques per desnaturalització i hibridació amb el *kit* de captura *NimbleGen SeqCap EZ Exome v.3.0* (Roche, WI, USA) i boles paramagnètiques conjugades amb estreptavidina. La posterior reparació d'extrems, l'addició de cues poliA, la lligació d'adaptadors i l'amplificació es realitza amb el *kit TruSeq PE Cluster v3* (Illumina, CA, USA). La seqüenciació de la llibreria es duu a terme en un instrument HiSeq2000 obtenint una cobertura del 80% de la regió. Aquests exomes es van realitzar entre els anys 2013 i 2015.

L'alineament sobre el genoma de referència hg19 (GRCh37) es duu a terme amb el *software* BWA¹²⁸. Per a la crida de variants s'utilitza el *software* SAMtools¹²⁹ i el vcf resultant s'anota a partir del *Variant Effect Predictor*¹³⁰.

▪ **Grup d'estudi SYNAPS (Univerity College of London; UCL)**

La tagmentació de 1µg de gDNA (fragmentació i etiquetatge) es realitza amb el *kit Nextera transposome complex* (Illumina, CA, USA) generant fragments de DNA lligats a adaptadors i a índexs identificadors. Per a la captura de les regions exòniques d'aquests fragments s'utilitza el mètode *Nextera Exome Enrichment* d'Illumina, seguit de boles paramagnètiques conjugades amb estreptavidina. A continuació, la reparació d'extrems, l'addició de cues poliA, la lligació d'adaptadors i l'amplificació es realitza amb el *kit TruSeq Cluster v4* (Illumina, CA, USA) i la seqüenciació de la llibreria es desenvolupa en un instrument HiSeq2500 cobrint el 89% de la regió d'interès. Aquests exomes es van realitzar entre els anys 2016 i 2017.

L'alineament sobre el genoma de referència hg19 (GRCh37) es duu a terme amb el *NovoAlign software* (NovoCraft, Malàisia) i el *software* Picard s'utilitza per a l'eliminació de duplicats i seqüències de mala qualitat. La crida de variants es realitza amb el paquet GATK *Haplotype Caller*¹³¹ i les variants resultants s'anoten amb ANNOVAR¹³².

▪ **Centogene (Rostock, Alemanya)**

La fragmentació de 1µg de DNA genòmic té lloc mitjançant un aparell Covaris i la captura de les regions exòniques es realitza amb el *kit SureSelect Human All Exon V6* (Agilent, Ca, USA), seguit de boles paramagnètiques conjugades amb

estreptavidina. A continuació, el *kit TruSeq Cluster v4* d'Illumina s'utilitza per a reparar els extrems, afegir cues poliA, lligar els adaptadors i amplificar les seqüències capturades. La plataforma HiSeq4000 es carrega per a la seqüenciació de la llibreria cobrint el 97% de la regió d'interès. Aquests exomes s'han realitzat entre els anys 2017 i 2018.

El *software* BWA s'utilitza per a l'alineament del fastQ sobre el genoma de referència hg19 (GRCh37) i l'eliminació de duplicats es fa amb Picard. La crida de variants es realitza, paral·lelament, amb tres *callers* diferents: GATK *Haplotype Caller*, SamTools i Freebayes¹³³ i els vcf resultants es combinen posteriorment. Finalment, les variants s'anoten mitjançant ANNOVAR.

2.3.3. Priorització de variants

L'anàlisi de les variants dels exomes d'EIEE es realitza en dues fases, en primer lloc s'estudien les variants que afecten gens descrits per la seva contribució al fenotip, i en cas de ser negatiu, l'anàlisi s'amplia a tots els gens capturats per l'exoma.

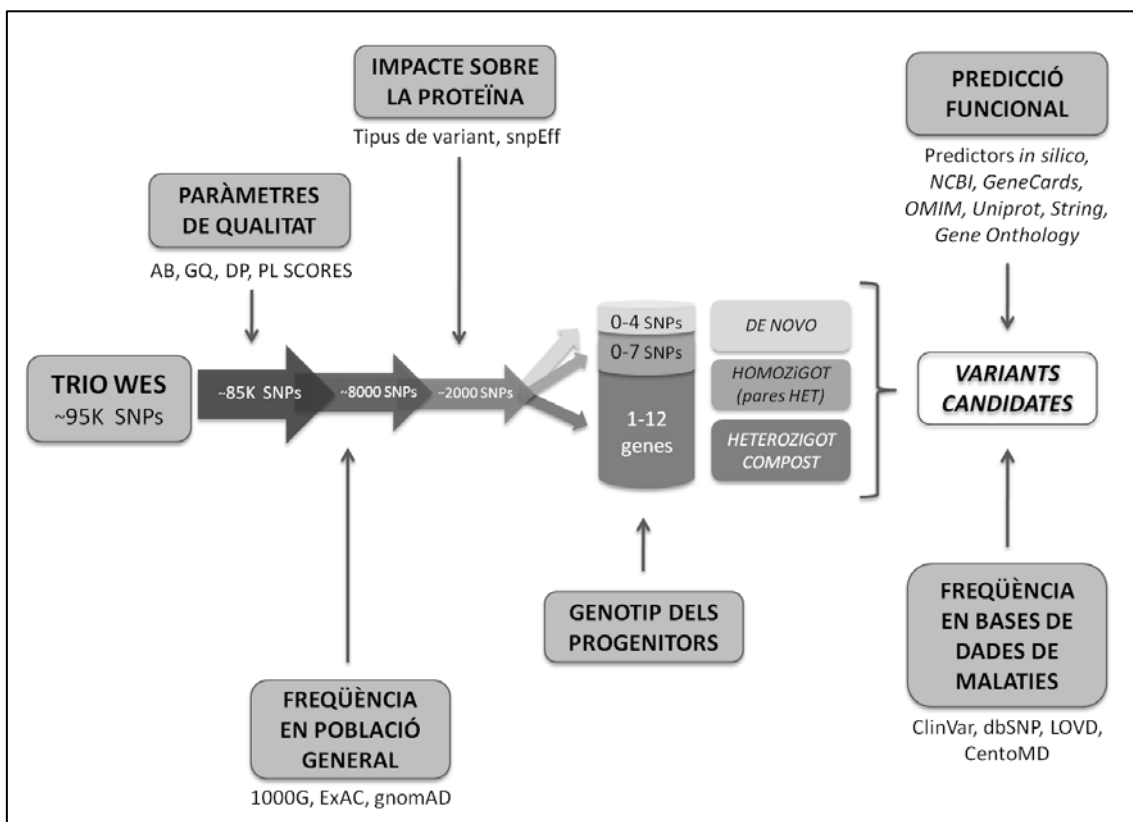


Figura 12 | Pipeline de prioritització de variants in house. Els valor de variants obtingudes en cada estadi del filtratge es aproximat i s'ha extret considerant els resultats de diversos WES analitzats.

El resultat de l'exoma d'un trio detecta entre noranta i cent mil variants que han de ser filtrades i prioritzades per a trobar la probable causa del fenotip de cada pacient. Per a tal fi s'utilitzen diferents paràmetres i eines (Figura 12) que permetran classificar les diferents variants segons el seu interès clínic i fisiopatològic en les EIEE.

▪ **Qualitat de la seqüenciació**

El procés de seqüenciació és determinant per a la correcta interpretació de les variants, ja que es pot estudiar la certesa de cada variant en funció de diferents paràmetres especificats a l'arxiu vcf anotat: qualitat de seqüència ($QC > 20$), nombre de lectures de la seqüència i de cada base ($DP \geq 10$), balanç al·lèlic o freqüència al·lèlica amb què es descriu la proporció de lectures de cada al·lel ($35 < AB < 65$) i probabilitat que la lectura sigui correcta o probabilitat *phred likelihood* (*PL scores*; consta de tres valors, els quals corresponen a les tres lectures possibles de cada base *homozigot per la referència*, *heterozigot*, *homozigot per l'alternatiu*. Es considera que la lectura és real quan només un dels tres valors és inferior a 20).

Finalment, a partir del fitxer *bam* resultant de l'alineament de la seqüència amb el genoma de referència, s'inspecciona visualment amb el *software* IGV (*Broad Institute*, MA, USA) per a detectar regions mal cobertes on la crida de variants hagi pogut generar un fals negatiu o un fals positiu.

▪ **Freqüència poblacional**

En l'anàlisi de la patogenicitat de les diferents variants, també és rellevant tenir en compte la presència d'aquesta a escala poblacional, en diferents condicions:

- Població general sana: existeixen bases de dades que recullen tots els exomes generats de població general no afecta de malalties mendelianes greus. En ser les EIEE malalties rares, esperaríem que la freqüència poblacional fos inferior a l'1% per a malalties dominants i al 5% per a recessives. Aquestes bases de dades són:
 - 1000Genomes¹³⁴: base de dades que inclou els resultats de 2504 genomes de 26 poblacions diferents.
 - ExAC¹³⁵: base de dades que inclou els resultats de les seqüències de 60706 individus no relacionats entre ells.
 - gnomAD¹³⁵: base de dades que inclou 123136 seqüències WES i 15496 seqüències WGS d'individus no relacionats entre ells.

- Bases de dades de pacients: dels estudis genètics en poblacions de pacients s'han desenvolupat bases de dades que recullen les variants associades a diferents patologies i les seves característiques. Les bases de dades d'accés públic principals són ClinVar¹³⁶, dbSNP¹³⁷, LOVD¹³⁸. A més, existeixen bases de dades privades d'empreses especialitzades en diagnòstic NGS que permeten l'accés sota un registre específic, com ara HGMD^{® 139} de Qiagen (Hilden, Alemanya) o CentoMD^{®140} de CentoGene (Rostock, Alemanya).

▪ Efecte de la variant

A partir de les diferents característiques d'una variant es pot predir l'efecte que tindrà sobre la funció de la proteïna final. Segons la predicció del *software* snpEff¹⁴¹, en general la classificació es sol donar de la següent manera:

- Variants d'efecte elevat
 - *Nonsense* o sense sentit: variants que canvien l'aminoàcid de la posició afectada per un codó *STOP* o de terminació
 - *Frameshift* o de canvi de pauta de lectura: delecions o insercions curtes que canvien la seqüència d'aminoàcids generant un nou codó *STOP* de forma prematura.
 - *Splice donor* o *splice acceptor*: canvis que afecten les regions d'*splicing* que flanquegen els exons
 - *Start lost*: variants que canvien la metionina d'inici de traducció
- Variants d'efecte moderat
 - *Missense*: variants no sinònimes que canvien l'aminoàcid *wildtype* per un de diferent
 - Variants que alteren la pauta de lectura eliminant el codó *STOP* i desplaçant-lo cap a 3' de la seqüència generant una proteïna més llarga.
- Variants de baix efecte: en aquest cas s'inclouen els canvis sinònims, és a dir, aquells que no modifiquen l'aminoàcid o delecions o insercions que no modifiquen la pauta de lectura (*in frame*).
- Variants d'efecte modificador: aquestes inclouen tots aquells canvis detectats que tenen significat incert degut al desconeixement de la funció que realitzen les regions on es donen: canvis intrònics (*deep intronic*), canvis en les regions reguladores UTR o canvis en promotors.

Altres *softwares* de predicció *in silico*, utilitzen diferents algorismes per a classificar les mutacions en funció de la seva patogenicitat, i per tant, donen informació sobre la probabilitat que sigui la causa del fenotip del pacient estudiat. En general els predictors de variants exòniques més utilitzats són el Polyphen-2¹⁴², el PROVEAN¹⁴³ i el MutationTaster¹⁴⁴. Per a les variants intròniques, tant les considerades d'*splicing* com les *deep intronic* o de regions reguladores, s'han desenvolupat predictors específics com el *HumanSpliceFinder v.3.0*¹⁴⁵, el *NetGene2*¹⁴⁶ i el *GeneSplicer*¹⁴⁷.

La conservació de las seqüències, tant a nivell de l'evolució de les espècies (gens ortòlegs) com entre gens d'una mateixa família (gens paràlegs), dóna informació sobre la rellevància de cada nucleòtid. Aquest és un paràmetre que també s'utilitza per a la prioritització de variants a través de la puntuació PhyloP¹⁴⁸.

▪ Patró d'herència

La informació dels gens descrits fins al moment i la seva implicació en el fenotip d'EIEE proporciona, entre altres aspectes, el tipus d'herència que afecta cada gen (Taula 5). L'exoma per trios permet fer ús d'aquestes dades com a filtre addicional a la prioritització de variants, ja que en la mateixa anàlisi coneixem el genotip de cada una de les variants per al pacient i progenitors (Taula 7).

Taula 7 | Filtratge segons la segregació esperada.

Tipus d'herència		Pacient	Mare	Pare
<i>De novo</i>		0/1	0/0	0/0
Heterozigot ¹		0/1	0/1	0/0
Lligat al X dominant		0/1	0/1	0/0
Homozigot		1/1	0/1	0/1
CHET	Variant 1	0/1	0/1	0/0
	Variant 2	0/1	0/0	0/1
Lligat al X recessiu ²		0/1	0/1	0/0
Lligat al X inusual ³		0/1	0/0	1/1

¹Patró de segregació implicat en fenotips benignes; ²Fenotips que només afecten al sexe masculí; ³Patró característic del gen PCDH19.

▪ Informació funcional

En el cas de gens no descrits prèviament associats a EIEE, tot i prioritzar amb les eines anteriorment esmentades, es requereix de més informació addicional per tal de poder generar una hipòtesis suficientment argumentada que els postuli com a probables causants del fenotip:

- Bases de dades amb informació funcional: el coneixement generat sobre els gens i les seves funcions es recull en diverses bases de dades públiques que es consulten per a analitzar la potencial contribució d'un candidat nou a les EIEE. El Centre Nacional d'Informació Biotecnològica (NCBI) gestiona múltiples bases de dades públiques amb tota la informació bibliogràfica publicada¹⁴⁹. Altres bases de dades com l'OMIM¹⁵⁰, Uniprot¹⁵¹ i GeneCards¹⁵² també recullen informació genètica i proteica associada a malalties.
- Anàlisi d'interaccions proteiques: el *software* STRING¹⁵³ permet analitzar la xarxa d'interaccions proteïna-proteïna en què participa el gen en estudi. D'aquesta manera, es poden detectar relacions funcionals amb altres gens associats al fenotip de les EIEE.
- Anàlisi d'enriquiment de vies: el *Gene Ontology Consortium*^{154,155} gestiona un portal on recull les funcions moleculars, els components cel·lulars i els processos biològics en que està implicat cada gen. Això és útil per a fer anàlisis d'enriquiment amb el *software* PANTHER¹⁵⁶ per als gens implicats en les EIEE, de manera que els nous candidats es poden relacionar amb el fenotip en funció de la seva ontologia.

2.3.4. Reanàlisi de dades NGS

L'evolució de les tècniques NGS i les eines d'anàlisi impliquen la necessitat d'actualitzar periòdicament els resultats de protocols NGS, per tal de detectar noves variants que amb *pipelines* anteriors s'haguessin omès. En aquest projecte s'han realitzat dos tipus de reanàlisi per tal de millorar l'anàlisi prèviament dut a terme:

- **Aplicació d'un nou *pipeline* d'anàlisi**

El laboratori de Neurologia Pediàtrica del VHIR ha establert durant la durada del projecte col·laboracions amb centres que realitzen en la seva activitat normal protocols i anàlisis de dades NGS. Gràcies a aquestes col·laboracions, els exomes realitzats en la primera fase de seqüenciació massiva al CNAG, entre els anys 2013 i 2015 han estat sotmesos a nous *pipelines* d'anàlisi des del fitxer fastQ, tant pel laboratori de Neurociència Molecular del *University College of London* (UCL), emmarcat dins el grup d'estudi SYNaPS com pel CNAG dins el projecte Genòmica en Malalties Minoritàries Neurològiques no Diagnosticades (URD Cat) finançat pel Pla Estratègic de Recerca i Innovació de Salut (PERIS) del Departament de Salut

de la Generalitat de Catalunya. Ambdós *pipelines* apliquen el paquet GATK actualitzat per al processament de les dades crues del WES.

▪ **Revisió de la prioritització de variants**

El volum de dades NGS disponibles en bases de dades públiques creix exponencialment cada any, d'aquesta manera, tant les eines utilitzades per a la prioritització com els gens associats al fenotip de les EIEE van evolucionant. Per aquesta raó, periòdicament al laboratori de Neurologia Pediàtrica del VHIR, es reanalitzen els fitxers vcf per tal de detectar variants que prèviament es podrien haver omès, així com per eliminar variants que s'haurien considerat en prioritzacions anteriors i que amb l'augment de dades noves NGS no compleixen les condicions requerides per a postular-se com a patogèniques.

2.4. Genoma complet

El genoma complet (WGS) es durà a terme, com a prova de concepte, per a aquells pacients amb resultat negatiu a WES. Aquests seran prioritzzats pel grau de severitat del fenotip.

2.4.1. Preparació de les mostres

Les mostres de DNA per a enviar al centre de seqüenciació es preparen a 100ng/μL en TE, per a tenir 8μg de DNA totals. Totes les mostres van identificades amb un codi propi del centre NGS, el qual va associat al codi del centre d'origen a través d'un manifest, igual que en el protocol WES.

La determinació de la qualitat de la mostra es duu a terme amb el mateix procediment que el descrit per a les mostres destinades a exoma complet (apartat 2.3.1).

2.4.2. WGS i dades crues

L'estudi del genoma complet, realitzat entre el 2017 i 2018, s'ha desenvolupat a l'empresa CentoGene (Rostock, Alemanya).

La fragmentació del gDNA (2 μg) es realitza amb un aparell Covaris, i la posterior selecció de fragments per mida, reparació d'extrems i lligació d'adaptadors es duu a terme amb boles paramagnètiques conjugades amb estreptavidina i el kit *TruSeq DNA*

PCR-Free Library Prep (Illumina, CA, USA). La seqüenciació té lloc en una plataforma HiSeqX d'Illumina proporcionant una cobertura mitja d'aproximadament 30X.

Per al processament de les dades crues de la seqüència, és a dir, per l'alineament amb el genoma de referència hg19, la crida de variants i l'anotació, se segueix el mateix procediment descrit per a l'exoma complet de CentoGene, a l'apartat 2.3.2.

2.4.3. Priorització de variants

El filtrat de variants en el cas del genoma complet segueix les mateixes característiques que el descrit per a WES a l'apartat 2.3.3. La diferència principal és que apareixen un major nombre de variants, i la majoria d'elles corresponen a regions no codificants per a proteïna. Per aquesta raó, en aquestes regions es restringeix la informació poblacional a la base de dades gnomAD i guanyen importància els predictors *in silico* de conservació i *splicing*.

Tot i això, la informació sobre aquestes regions encara és molt reduïda, i la capacitat que tenim d'interpretar-la és limitada. Així, actualment l'anàlisi se centra en un reanàlisi de regions codificants per a augmentar la fidelitat de l'estudi, però sobretot, en estudiar les regions no codificants dels gens associats al fenotip EIEE, actualitzant l'anàlisi periòdicament per a incloure els nous gens que vagin sent descrits.

2.5. Validació pel mètode Sanger

La seqüenciació massiva, en ser una tècnica relativament nova i molt automatitzada, requereix una validació dels seus resultats amb una segona aproximació, el mètode Sanger¹⁵⁷.

2.5.1. Disseny de primers

El primer pas per al mètode Sanger és amplificar la regió d'interès que es vol seqüenciar. Per a tal fi, s'han de dissenyar oligonucleòtids o *primers* que flanquegin la posició a validar: primer *forward* complementari a 5' i primer *reverse* a 3'. Generalment, s'engloba dins la regió diana a amplificar: la variant trobada, l'exó sencer al qual pertany i unes 80-100 bases intròniques que flanquegen l'exó (Figura 13), generant un fragment final d'entre 200 i 800bp.



Figura 13 | Esquema de disseny de primers per a PCR. L'exó representat amb un requadre amb la posició modificada en vermell i l'intró amb una línia. Els primers (*forward*: p' Fw i *reverse* p' Rv) als extrems de la regió diana, separats de l'exó 80-100pb.

El disseny de primers es realitza amb el *software* Primer3 Input¹⁵⁸ i per a la comprovació del disseny s'utilitza la cerca de complementarietat contra totes les seqüències del genoma humà amb el Primer-Blast¹⁵⁹ per a analitzar-ne l'especificitat i la PCR *in-silico* disponible a la base de dades GenomeBrowser el UCSC¹⁶⁰.

La síntesi dels primers dissenyats s'externalitza a cases comercials i són entregats liofilitzats. Aquests es dissolen amb aigua en una solució mare a 200pmol/ µl.

2.5.2. Polymerase chain reaction (PCR)

La reacció d'amplificació es realitza amb la polimerasa termoestable BioTaq (Ecogen, Barcelona) i la solució salina 10x i de magnesi 50mM necessàries perquè aquesta funcioni (Taula 8).

Taula 8 | Reactius per a la reacció de PCR

Reactiu	µl/mostra
10x NH ₄ Reaction Buffer	2,5
dNTPs (10mM)	0,5
Polimerasa BioTaq	0,1
50mM MgCl ₂ Solution	0,75
DNA (50ng/ul)	2
Primer Forward (10 pmol/µl)	1
Primer Reverse (10 pmol/µl)	1
H ₂ O ^{milliQ} estèril	17,15
Volum final	25

Les temperatures d'una PCR realitzada amb la polimerasa Biotaq estan establertes, a excepció de la temperatura d'unió del primer al DNA (Figura 14), la qual depèn de la naturalesa de la regió a amplificar i de cada seqüència de primers. Per a determinar aquesta temperatura, primer es fa una reacció per a posar a punt les condicions tant de temperatura com de reactius, ja que tot i generalment mantenir fixes les proporcions dels reactius (Taula 8), en alguns casos especials es poden modificar les

quantitats i inclús afegir DMSO per a convertir la reacció en més específica. Un cop definides les condicions, la reacció d'amplificació es duu a terme amb el DNA d'interès i introduint sempre una reacció addicional sense DNA com a control negatiu.

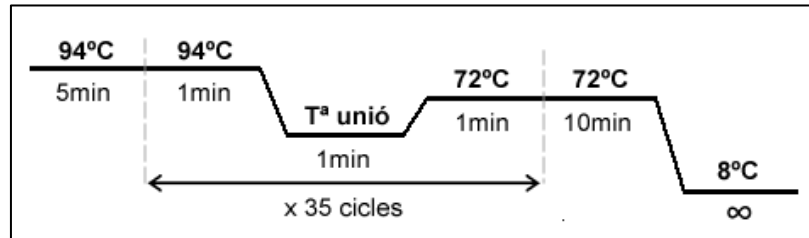


Figura 14 | Programa del termociclador per a una reacció de PCR. La temperatura d'unió és la que variarà en funció de la naturalesa de la seqüència i els primers

El resultat de la PCR es comprova mitjançant una electroforesi en gel al 1.5% d'agarosa preparat amb un agent intercalant del DNA durant 30 minuts a 120V. Un cop corregut el DNA, el gel s'examina en un aparell transluminador (BioRad, CA, USA) que emet rajos ultraviolats per a detectar les bandes corresponents al fragment amplificat. La fracció de PCR a estudiar es carrega juntament amb un marcador de pesos moleculars que permetrà establir la mida del fragment amplificat.

2.5.3. Purificació

El resultat de la reacció de PCR conté, a part del DNA d'interès amplificat, seqüències de cadena única corresponent als *primers*. Aquestes s'han d'eliminar a través d'un procés de purificació de la mostra, ja que podrien interferir en la reacció de seqüència.

▪ Purificació enzimàtica

Quan el resultat de la PCR és una única banda ben definida, la purificació es fa amb el reactiu ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (ThermoFisher Scientific, MA, USA) seguint el protocol que proporciona la casa comercial. Aquest conté un enzim que fragmenta i elimina totes les seqüències nucleotídiques de la solució que siguin de cadena única.

▪ Purificació en gel d'agarosa

En els casos on la naturalesa de la seqüència a amplificar impedeix el disseny de *primers* molt específics, s'amplificaran més d'un fragment de diferents mides, els quals es detectaran com a diferents bandes en el gel d'agarosa. En aquesta situació, es carregarà el total de la reacció de PCR en un gel a l'1% d'agarosa i es

correrà durant 45-60 minuts per assegurar la correcta separació de les diferents bandes. La banda corresponent a la mida del fragment d'interès, es retallarà amb un bisturí i s'utilitzarà el protocol i el kit NZYGelpure (NZYTech, Portugal) per a recuperar el DNA de doble cadena.

2.5.4. Seqüenciació Sanger

Un cop obtingut el DNA amplificat purificat, es procedeix a la reacció de seqüència per tal de realitzar seqüenciació Sanger. El protocol d'aquesta reacció (Taula 9, Figura 15) és similar al d'una PCR normal, amb la diferència que s'utilitza un kit especial anomenat BigDye™ Terminator v3.1 *Cycle Sequencing* (ThermoFisher Scientific, MA, USA) que conté la polimerasa i la solució per al seu funcionament, els dNTPs i els ddNTPs.

Taula 9 | Reactius reacció de seqüència

Reactiu	µl/mostra
PCR purificada	2
Ready Reaction Mix	0,5
5X Sequencing Buffer	1,75
Primer Fw o Rv (10 pmol/µl)	0,5
H2OmilliQ estèril	5,25
Volum final	10

El producte de la seqüència es purifica per a eliminar-ne les sals i els *primers* amb el kit *BigDye X-Terminator™ Purification* (ThermoFisher Scientific, MA, USA) i es prepara en una placa de 96 pous. Aquesta, es llegeix amb un seqüenciador capil·lar ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA) al departament de Genètica de l'HUVH.

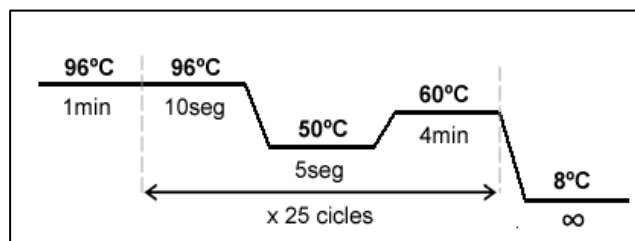


Figura 15 | Programa de temperatures del termociclador per a una reacció de seqüència.

Per a analitzar els resultats a partir de la visualització dels electroferogrames, s'utilitza el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*¹⁶¹.

3. Tècniques de biologia molecular

Per a l'estudi de la variant P380L del gen CHRM1 s'externalitza a la casa comercial GenScript USA (NJ, USA) la síntesi del cDNA del gen humà sense codó STOP. L'objectiu es utilitzar aquesta seqüència per generar constructes per a estudiar la funció del gen *wildtype* i mutant. Els assajos relatius a l'experimentació d'aquest receptor d'acetilcolina s'han realitzat al Departament de Ciències Fisiològiques de la Universitat de Barcelona - Campus Bellvitge.

3.1. Clonatge per mètode Gateway

Per a generar els minigens de CHRM1 es fa ús de la tecnologia de recombinació mitjançant el protocol *Gateway Pro Cloning* (Invitrogen, CA, USA). Aquest consisteix en generar constructes amb el cDNA d'interès flanquejats per seqüències de recombinació anomenades attB1, attB2, attB5 i attB5R on recombinen B1 amb B2 i B5 amb B5R. A més, a l'extrem 5' de l'origen de transcripció de les seqüències cDNA, s'hi col·loca una seqüència anomenada KOZAK (ACC), que intervé en la correcta recombinació.

3.1.1. Amplificació i mutagènesis

Per a introduir les seqüències de recombinació sobre el cDNA *wildtype* s'utilitzen primers especials (Taula 10) dissenyats perquè en realitzar PCRs estàndard quedin afegits els extrems de recombinació a 5' i 3' del fragment amplificat (Figura 16B).

Taula 10 | Combinació de primers per a les PCRs del cDNA *wildtype* (WT) i mutant (MT).

WT	PCR ST	attB1_hCHRM1	5' - GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTA ACCATGAACACTTCAGCCCCACCTGCTGTC - 3'
		attB5R_hCHRM1	5' - GGGGACAAC TTTTGTATACAAAGTTGTG CATTGGCGGGAGGGAGTGCGGTGCAC - 3'
MT	PCR ST 5'	attB1_hCHRM1	5' - GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTA ACCATGAACACTTCAGCCCCACCTGCTGTC - 3'
		hCHRM1_mut_Rv	5' - CAGCACCATGATGTTGTAC A GTGTCCAGGTGAGGATG - 3'
	PCR ST 3'	hCHRM1_mut_Fw	5' - CATCCTCACCTGGACAC T GTACCACATCATGGTGCTG - 3'
		attB5R_hCHRM1	5' - GGGGACAAC TTTTGTATACAAAGTTGTG CATTGGCGGGAGGGAGTGCGGTGCAC - 3'
PCRr	attB1_hCHRM1	5' - GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTA ACCATGAACACTTCAGCCCCACCTGCTGTC - 3'	
	attB5R_hCHRM1	5' - GGGGACAAC TTTTGTATACAAAGTTGTG CATTGGCGGGAGGGAGTGCGGTGCAC - 3'	

Seqüència de les parelles de primers utilitzades per a les PCRs estàndard (PCR ST) i PCR recombinant (PCRr). En els primers hCHRM1_mut se senyala en vermell la variant introduïda.

Per a preparar el constructe de cDNA mutant, a la vegada que s'afegeixen els extrems de recombinació, s'ha de generar la mutagènesi de la seqüència *wildtype*. Per això es requereixen dues PCRs estàndard per a introduir la mutació en les dues cadenes de DNA i una PCR recombinant per generar la seqüència completa (Figura 16A). D'aquesta manera es necessiten diferents combinacions de *primers* (Taula 10), tant els que afegiran els extrems de recombinació com els que introduiran la variant.

3.1.2. *Entry clone*

Per a realitzar el protocol de clonatge Gateway es requereix disposar de les diferents seqüències d'interès flanquejades amb les regions de recombinació insertades en constructes amb resistència a kanamicina anomenats *Entry Clones* (clons d'entrada). Per a obtenir aquests constructes es realitza una reacció de recombinació BP entre extrems de recombinació attB del cDNA problema i attP del vector donant (pDonor), generant nous extrems de recombinació attL. El pDONOR conté un gen de resistència a la kanamicina i un gen de toxicitat bacteriana (*ccdb*) flanquejat per attP1 i attP5R, ambdós importants per a la selecció de clons. Les seqüències generades de cDNA hCHRM1 *wildtype* i mutant s'introduiran al pDONOR per a construir l'*Entry Clone* amb el gen flanquejat per P1 i P5R (Figura 17A).

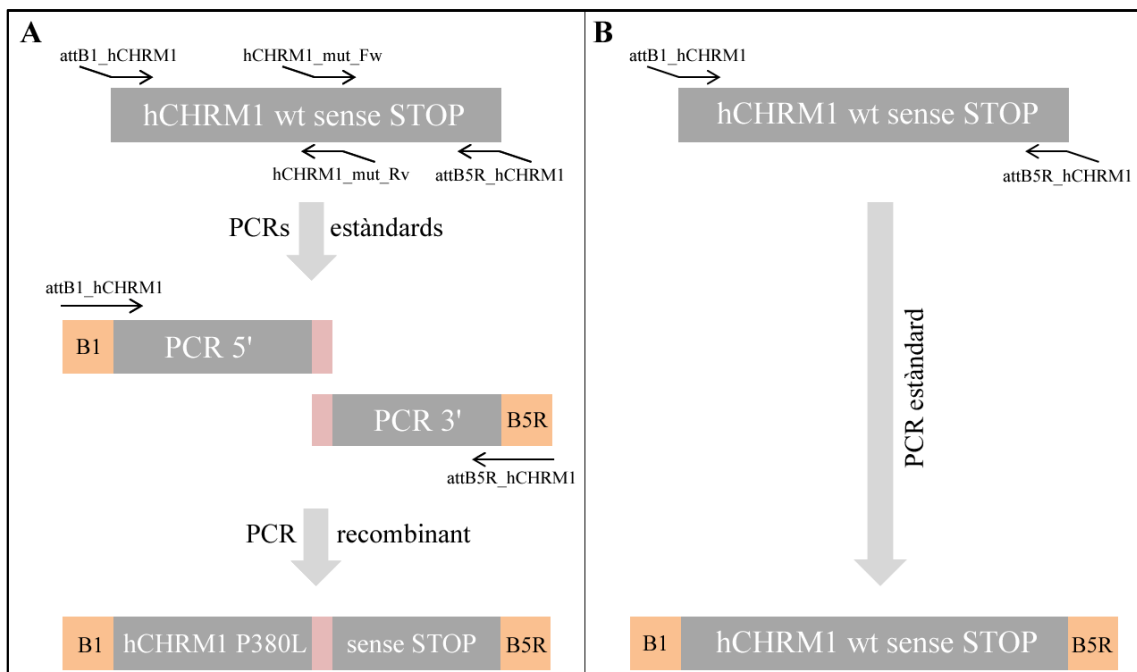


Figura 16 | Esquema de les PCRs realitzades per a preparar el cDNA per a clonar-lo. A, procés per a fer la mutagènesi de hCHRM1 (la banda rosada representa la mutació); B, PCR estàndard única per al hCHRM1 *wildtype*.

Els cDNAs de hCHRM1 sintetitzats no tenen codó STOP, ja que es necessita afegir a l'extrem 3' de la seqüència una seqüència que, en traduir-se a proteïna serveixi d'etiqueta per a detectar-la en els diferents experiments previstos. La seqüència addicional que s'afegeix correspon a tres còpies de l'etiqueta Flag (3xFlag), i aquesta sí que contindrà el codó de terminació. La seqüència 3xFlag està inserida en un *Entry Clone* on queda flanquejada per les seqüències de recombinació attL5 i attL2 (Figura 17B). També es generen constructes amb l'etiqueta 3xHA en lloc de 3xFlag, ja que alguns experiments requereixen poder identificar de formes diferents la proteïna.

3.1.3. *Expression vector*

L'últim pas per a obtenir l'anomenat *Expression vector* (vector d'expressió), el qual ja pot ser utilitzat per als experiments planificats, és la recombinació final entre els *Entry Clones* de hCHRM1 *wildtype* o mutant, l'*entry clone* 3xFlag i el vector de destí (*pDEST*) característic del sistema d'expressió final i que conté el gen *ccdb* flanquejat per attR1 i attR2 i el gen de resistència a ampicil·lina per a la selecció de clons (Figura 17B). Aquesta última reacció, per a generar el vector d'expressió final *pDEST*[hCHRM1(wt/mt)-3xFlag] es tracta d'una reacció de recombinació múltiple LR.

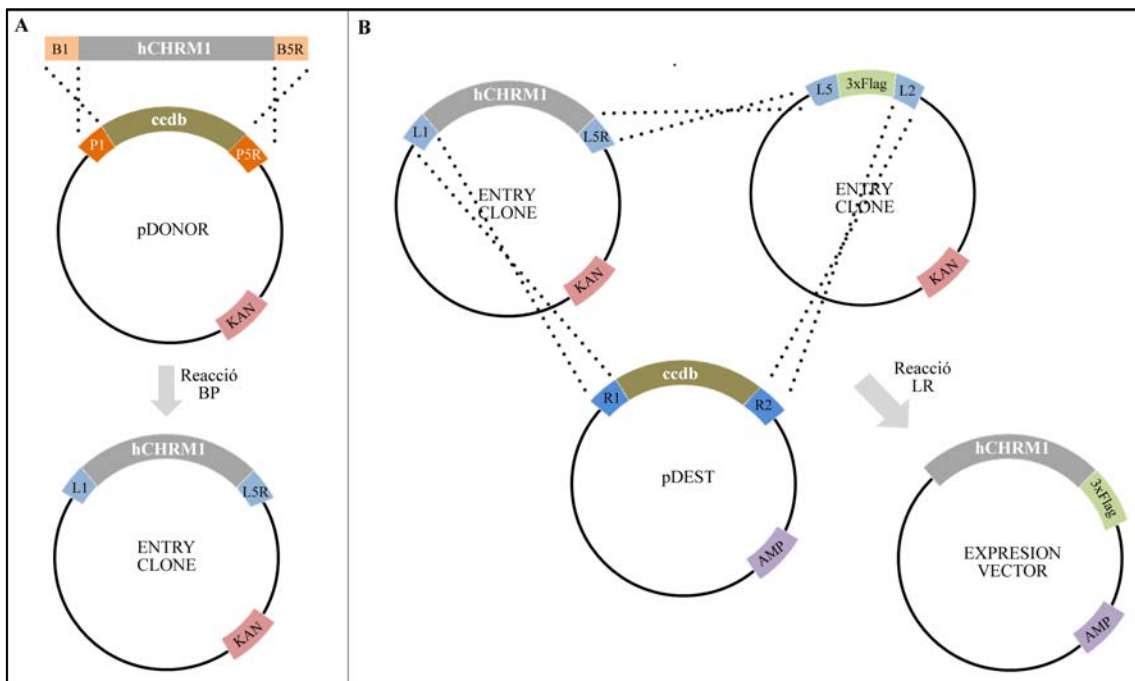


Figura 17 | Reaccions de recombinació per al clonatge Gateway. A, construcció de l'*Entry Clone* de hCHRM1 tant per a *wildtype* com per a mutant via reacció BP; B, Reacció LR per a l'obtenció del *Expression Vector* tant per a *pDEST*[hCHRM1(wt)-3xFlag] com *pDEST*[hCHRM1(P380L)-3xFlag].

3.1.4. Generació de vectors heterozigots

La variant detectada en CHRM1 en la pacient de l'estudi es troba en heterozigosis, per tant, s'ha dissenyat un tercer constructe per a expressar alhora les dues variants *wildtype* i mutant de forma que s'expressin en la mateixa proporció. Per a tal fi, s'ha utilitzat la seqüència E2A com a unió entre les dues seqüències de CHRM1, ja que aquesta quan es tradueix a proteïna es proteolítza deixant al medi intracel·lular les dues formes de CHRM1 independents.

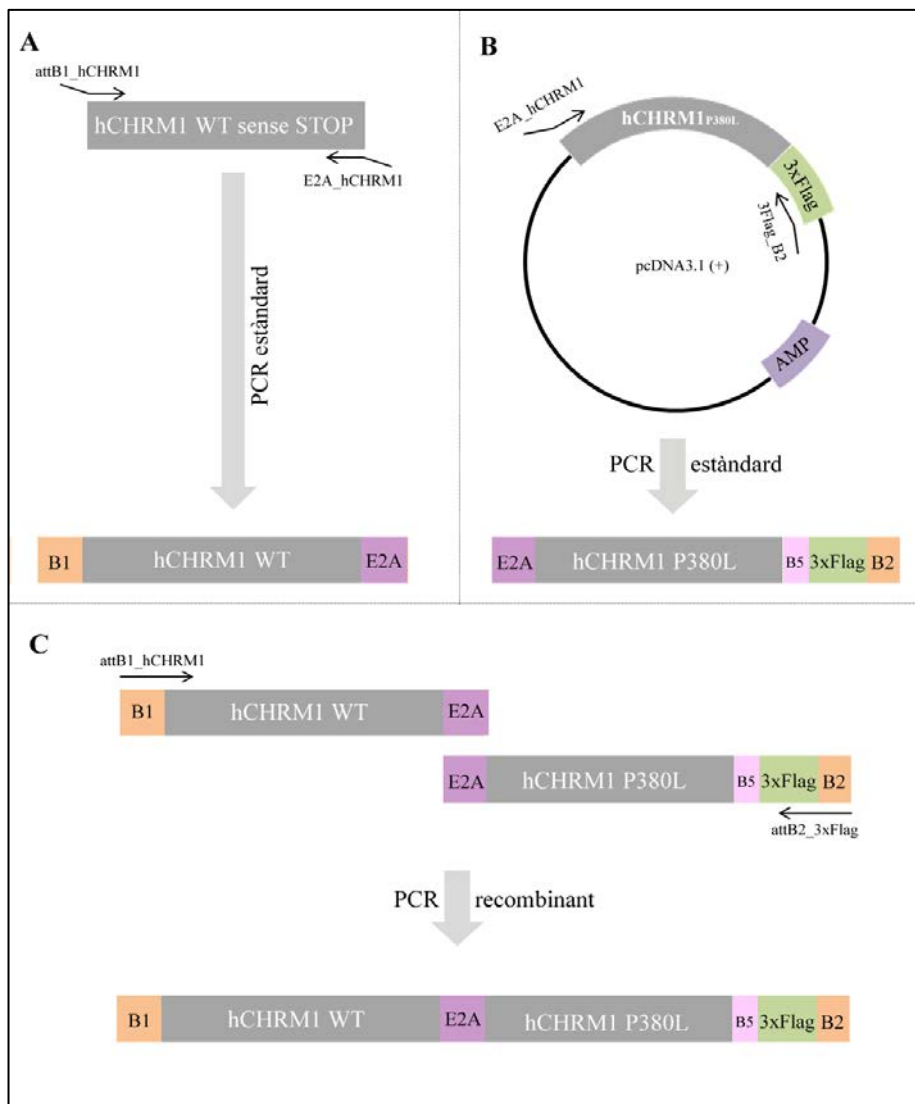


Figura 18 | Esquema de la generació del constructe de cDNA heterozigot de CHRM1. A, Obtenció de la seqüència hCHRM1 *wildtype* unida a E2A; B, Obtenció de la seqüència hCHRM1-3XFlag unida per 5' a E2A i per 3' a attB2 partir de pcDNA3.1(+)[hCHRM1(mt)-3xFlag]; C, Reacció de PCR recombinant per a generar

El constructe s'ha realitzat a partir de l'amplificació amb els primers dissenyats per a amplificar, a partir de l'*expression vector* de hCHRM1 P380L el fragment hCHRM1(mt)-

3xFlag afegint a l'extrem 5' de hCHRM1 la seqüència E2A i al 3' attB2 (Figura 18B). A continuació, s'ha generat, a partir de la seqüència inicial de cDNA de CHRM1 sense codó STOP, una PCR per a afegir a l'extrem 5' la seqüència attB1 i a l'extrem 3' la seqüència E2A (Figura 18A), i finalment s'ha dut a terme una PCR recombinant per a unir la seqüència sencera flanquejada per attB1 i attB2 (Figura 18C). Aquest fragment, a través d'una reacció BP genera un *Entry Clone*, seguida d'una reacció de recombinació simple LR per a generar l'*Expressió Clone* pcDNA3.1(+)[hCHRM1(wt) - E2A-hCHRM1(mt) -xFlag].

3.2. Transformació de bacteris competents

Per a realitzar el mètode de clonatge Gateway, es necessita seleccionar els constructes de composició correcta i amplificar-los per a augmentar-ne la concentració.

Els resultats de les diferents reaccions de recombinació (BP i LR) s'utilitzen per transformar per electroporació bacteris competents DH5 α . Aquests es fan créixer en plaques de LB amb l'antibiòtic corresponent a la selecció: Kanamicina (KAN) en el cas dels *Entry Clones* i ampil·lina (AMP) en l'*Expression Vector*, ja que els bacteris que hagin introduït el clon correcte contenen un gen de resistència per a aquests antibiòtics. A part d'aquest mètode de selecció de la correcta colònia de bacteris, també seleccionem aquells constructes que hagin recombinat correctament i hagin introduït el cDNA d'interès mitjançant el gen *ccdb* dels vectors pDONOR i pDEST buits. Aquest és un gen tòxic per als bacteris, i per tant, només seran innocus per a les cèl·lules aquells constructes que hagin recombinat correctament intercanviant el gen *ccdb* pel d'interès (Figura 17).

Les colònies que creixen correctament, es piquen i es fan créixer en suspensió en medi LB amb l'antibiòtic corresponent, en agitació a 37°C tota la nit, i posteriorment se'n purifica el DNA circular amb el mètode *Qiagen Plasmid Kit* (Qiagen, Alemanya). Aquest es quantifica i es verifica la seva seqüència i correcta recombinació mitjançant reaccions de digestió amb enzims de restricció i seqüenciació Sanger amb els primers de la Taula 10.

3.3. Transfecció de cèl·lules de mamífer

Les línies cel·lulars utilitzades al llarg del projecte han estat dues variants de la línia cel·lular humana embrionària de ronyó 293 (HEK293A i HEK293T) i de la línia de

cèl·lules humanes epitelials procedents de carcinoma cervical, HeLa. Cada una d'aquestes línies ha estat utilitzada en funció de l'experiment a realitzar. Les cèl·lules es cultiven en plaques de cultius amb medi DMEM (Biological Industries, CT, USA) suplementat a l'1% de glutamina, 10% de FBS i 1% d'antibiòtics i es mantenen en un incubador al 5% de CO₂ i al 37% d'humitat.

Aquestes línies són el sistema d'expressió transitori que es transfecta amb els diferents constructes per a estudiar-ne mitjançant el protocol de la Transfectina *Lipid Reagent* (BioRad, CA, USA), en què es barreja per cada microgram de DNA total, un microlitre de transfectina en medi opti-MEM (Biological Industries, CT, USA) perquè es formin vesícules lipídiques que continguin el DNA. Aquesta mescla s'afegeix a les cèl·lules, incubant-les durant 4 hores per a la correcta endocitosi del constructe de DNA dins la cèl·lula. Les cèl·lules transfectades es deixen créixer, com a molt, 48 hores abans de fer l'experiment per a tenir-ne suficient quantitat però, alhora, evitar que es dissolgui el constructe amb la divisió cel·lular.

4. Tècniques de biologia de proteïnes

4.1. Estudi de l'expressió proteica (Western Blot)

4.1.1. Extracte proteic

Les cèl·lules HEK293A transfectades amb els constructes pcDNA3.1(+)[hCHRM1(wt)-3xFlag], pcDNA3.1(+)[hCHRM1(P380L)-3xFlag] o pcDNA3.1(+)[hCHRM1(wt)-E2A-hCHRM1(P380L)-3xFlag] es recullen per tripsinització i es lisen amb una solució de lisis (PBS 1X, Tritó X-100 1%, Aprotinina 1mM, PMSF 1mM, Leupeptina 2µM, Pepstatina 2µM i NaCl 150mM) durant 1 hora en agitació a 4°C. El resultat se centrifuga a 14000G a 4°C durant 10 minuts i es recupera el sobrenedant. La proteïna dissolta en aquest es quantifica mitjançant el protocol del mètode *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (ThermoFisher Scientific, MA, USA) i es barreja amb la solució LSB4X que permet la seva conservació i la correcta estabilització per a l'estudi proteic.

4.1.2. Electroforesis en gel i transferència en membrana

El contingut del lisat cel·lular es carrega en un gel al 10% d'acrilamida juntament amb un marcador de pesos moleculars de proteïna i es deixa córrer en una electroforesi SDS-Page a 120V fins que les bandes de la mida esperada se separen suficientment.

A continuació, les proteïnes del gel es transfereixen a una membrana de PVDF, prèviament activada amb metanol, mitjançant el protocol de transferència semiseca (BioRad, CA, UA) durant 30 minuts. Per a comprovar la correcta transferència de proteïnes a la membrana es realitza un marcatge específic de proteïnes amb una tinció *ponceau*, la qual s'elimina immediatament després amb diversos rentats amb aigua destil·lada.

4.1.3. Bloqueig i anticossos

Prèviament a la detecció específica de la proteïna d'interès, la membrana és bloquejada amb una solució salina (TTBS) al 5% de llet en pols sencera durant 1 hora en agitació a temperatura ambient. D'aquesta manera es redueixen les unions inespecífiques en els experiments.

Posteriorment, la membrana s'incuba amb l'anticòs primari específic de les proteïnes a detectar en agitació a 4°C durant tota a nit. Els anticossos primaris utilitzats per a western blot són anticòs f1804 α-Flag de ratolí (Sigma-Aldrich, MO, USA) a 1/500 per a

la detecció de CHRM1-3xFlag i α -tubulina de ratolí (Sigma-Aldrich, MO, USA) a 1/5000 per a la detecció de la tubulina com a control de càrrega.

Després de recuperar l'anticòs primari, es realitzen tres rentats de 10 minuts de les membranes amb la solució TTBS a temperatura ambient, per tal d'eliminar l'excés que hagi quedat d'anticòs. A continuació, s'incuba durant 1 hora en agitació, a temperatura ambient i a la foscor, amb l'anticòs secundari HRP α -ratolí (Sigma-Aldrich, MO, USA) a 1/5000, el qual està unit a una peroxidasa per a poder ser detectat durant el revelat. Aquest anticòs s'uneix els anticossos primaris units a través del seu epítoc específic de ratolí.

4.1.4. Revelat i anàlisi de resultats

Per a eliminar l'excés d'anticòs secundari abans del revelat es duen a terme tres rentats de 10 minuts en TTBS a temperatura ambient i a la foscor, i seguidament es procedeix al revelat de les membranes amb el líquid ECL, un substrat quimioluminiscent basat en l'activació del luminol que reacciona amb el conjugat de peroxidasa de l'anticòs secundari i emet un senyal que ha estat detectada pel revelador automàtic LAS-3000 *instrument* (FUJI, Toquió, Japó).

L'anàlisi dels resultats s'ha realitzat a partir de la quantificació de les imatges corresponents al senyal detectat amb el revelador, a través de l'eina proporcionada pel *software* ImageJ¹⁶². De cada experiment d'expressió proteica se n'han fet tres rèpliques, i el tractament de les dades s'ha realitzat seguint el procediment descrit a l'apartat 4.4.

4.2. Co-immunoprecipitació

Per a l'estudi de l'oligomerització dels receptors CHRM1 s'utilitza la tècnica de co-immunoprecipitació (Co-IP), consistent en la selecció d'un dels membres que podrien estar units i la detecció del segon component de la interacció.

4.2.1. Transfecció cel·lular

Per a la co-immunoprecipitació es co-transfecten cèl·lules HEK293A amb la combinació de constructes que volem estudiar (Taula 11) a igual proporció, però cada un d'ells ha de tenir una etiqueta diferencial per a poder-los detectar de forma independent.

Taula 11 | Combinació de constructes transfectats a les cèl·lules HEK293A per a la Co-IP

Combinació	Expression Vector 1	Expression Vector 2
Homozigot wildtype	pcDNA3.1(+)[hCHRM1(wt)-3xFlag]	pcDNA3.1(+)[hCHRM1(wt)-3xHA]
Heterozigot A	pcDNA3.1(+)[hCHRM1(wt)-3xFlag]	pcDNA3.1(+)[hCHRM1(P380L)-3xHA]
Heterozigot B	pcDNA3.1(+)[hCHRM1(wt)-3xHA]	pcDNA3.1(+)[hCHRM1(P380L)-3xFlag]
Homozigot mutant	pcDNA3.1(+)[hCHRM1(P380L)-3xFlag]	pcDNA3.1(+)[hCHRM1(P380L)-3xHA]

4.2.2. Extracte proteic i immunoprecipitació

L'extracte proteic de les cèl·lules HEK293A transfectades es realitza de la mateixa manera descrita a l'apartat 4.1.1. Un cop quantificada la concentració de proteïna a cada mostra, una part no es mescla amb LSB4X sinó que es procedeix a la selecció d'aquelles proteïnes amb l'etiqueta 3xFlag per immunoprecipitació (IP).

Aquest protocol es realitza amb boles de Proteïna A sefarosa cl-4b (GE Healthcare, UK) unides a l'anticòs α -Flag de ratolí a través d'una incubació en agitació a 4°C durant 1 hora. 500µg de l'extracte proteic obtingut s'incuba en agitació en una mescla amb boles unides a anticòs (IP positiva o problema) o boles sense anticòs (IP negativa o control negatiu de la tècnica), durant 1,5 hores a 4°C. A l'acabar es realitza un cop de centrifuga per a precipitar les boles i recuperar-ne el sobrenedant com a comprovació de l'eficiència de la IP. El *pellet* es renta amb solució de lisis tres vegades i finalment s'elueix la proteïna unida a les boles amb 50µl de LSB1x.

4.2.3. Western blot

Per a cada condició, una mostra d'extracte total en LSB4X, l'eluit amb LSB1x tant de la IP positiva com de la IP negativa i una mostra dels sobrenedants (SN) de les dues IP (SN positiu i SN negatiu) es carreguen en un gel d'acrilamida al 10% i es realitza un *immunoblot* o Western blot seguint el procediment descrit als apartats 4.1.2, 4.1.3 i 4.1.4.

L'anticòs primari amb què es realitza la detecció de la segona proteïna del complex que interactuaria és α -HA de conill (Roche, Suïssa) a 1/1000, el qual es detecta amb l'anticòs secundari HRP α -conill (Sigma-Aldrich, MO, USA) a 1/5000.

4.3. Assaig de glicosilació

Els receptors muscarínics colinèrgics d'acetilcolina tipus 1 són receptors de proteïnes G que es troben altament glicosilats. L'assaig amb enzims endoglicosilases permeten detectar el nivell de glicosilació d'una proteïna *in vitro*:

- Endoglicosidasa F (EndoF): enzim que talla l'enllaç entre el primer i segon residu de la cadena de carbohidrats (N-acetilglicosamina), permetent observar la glicosilació total de la proteïna, ja que elimina qualsevol glúcid afegit a la cadena d'aminoàcids.
- Endoglicosidasa H (EndoH): enzim que talla oligosacàrids rics en manosa unida a asparagina (glúcids simples afegits al RE) però no és capaç d'actuar sobre cadenes amb oligosacàrids altament processats (glúcids complexos afegits a l'aparell de Golgi).

4.3.1. Extracte proteic i tractament amb endoglicosidases

Seguint el procediment descrit a l'apartat 4.1.1, es lisen cèl·lules HEK293A transfectades amb el constructe *wildtype* pcDNA3.1(+)[hCHRM1(wt)-3xFlag] o amb el mutant pcDNA3.1(+)[hCHRM1(P380L)-3xFlag] per a obtenir-ne l'extracte proteic quantificat. Dues mostres de 40µl de cada extracte es desnaturalitzen amb solució desnaturalitzant 10X (NEB, MA, USA) i aigua_{milliQ} durant 15 minuts a 60°C.

A continuació es realitza la reacció a 37°C, durant tota la nit, amb cada un dels enzims endoglicosidasa i el seu tampó corresponent (NEB, MA, USA): G7 *buffer* 10X i NP40 per a EndoF i G5 *buffer* 10X per a EndoH. Per a cada condició es realitza també una reacció sense l'enzim com a control.

4.3.2. Immunoblot

Per a analitzar els resultats de l'experiment es realitza un immunoblot per a detectar el pes molecular de la proteïna després del tractament amb cada un dels enzims. El western blot es duu a terme en les mateixes condicions descrites a l'apartat 4.1.

Al gel d'acrilamida es carrega, per a cada condició, una mostra d'extracte total, una d'extracte desnaturalitzat per sense tractament amb enzim i la mostra desnaturalitzada i tractada amb l'enzim. L'anticòs primari que s'utilitza és el α -Flag de ratolí i el secundari el HRP α -ratolí.

4.4. Immunocitoquímica

Per a l'estudi de la localització cel·lular de les proteïnes és necessari realitzar una tinció específica de la teva proteïna per a veure la seva ubicació intracel·lular. Alhora, el receptor CHRM1 desenvolupa la seva funció a la membrana cel·lular, per tant, assaigs de col·localització amb proteïnes fluorescents de marcatge de membrana, permeten quantificar diferències de localització entre diferents condicions cel·lulars. En aquest cas s'utilitza una proteïna GFP fusionada al domini d'homologia a pleckstrina (domini PH), el qual consisteix en una seqüència d'uns 120 aminoàcids involucrada en el tràfic cel·lular cap a la membrana cel·lular.

4.4.1. Condicions cel·lulars

Per a realitzar la immunocitoquímica, s'utilitzen les cèl·lules HeLa. Aquestes es co-transfecten amb una proporció 1:2 de PH-GFP i constructe problema. Aquest últim pot ser pcDNA3.1(+)[hCHRM1(wt)-3xFlag], pcDNA3.1(+)[hCHRM1(P380L)-3xFlag] o pcDNA3.1(+)[hCHRM1(wt)-E2A-hCHRM1(P380L)-3xFlag].

A les 48h de la transfecció, les cèl·lules es tripsinitzen i se sembren plaques de 24 pous amb cubreobjectes al fons. Aquestes s'incubaran 24 hores a 37°C amb medi de creixement perquè les cèl·lules s'adhereixin al cobreobjectes.

4.4.2. Fixació, permeabilització i bloqueig

Per a poder treballar correctament i evitar perdre les cèl·lules aquestes s'han de fixar. Després de 3 rentats amb PBS1X, les cèl·lules es fixen amb paraformaldehid (PFA) al 4% durant 15 minuts a la foscor a temperatura ambient. A continuació es repeteixen 3 rentats amb PBS1X per a eliminar-ne les restes de PFA.

Posteriorment, per tal de permeabilitzar i bloquejar les cèl·lules, aquestes s'incuben amb una solució de bloqueig (PBS1X al 0.1% de tritó i 10% de FBS) durant dues hores a la foscor, en agitació i a temperatura ambient.

4.4.3. Anticossos i marcatge de nuclis

Les cèl·lules, aleshores, s'incuben amb anticòs α -Flag de ratolí a 1/500 durant 1 hora a temperatura ambient i a la foscor. A continuació, es renten 3 vegades durant 10 minuts en agitació amb la solució de bloqueig i s'incuben amb l'anticòs secundari durant 2 hores, en agitació a temperatura ambient i a la foscor. El secundari de la immunocitoquímica conté un fluorocrom que emet a una longitud d'ona determinada.

En el nostre cas utilitzarem un anticòs Alexa Fluor α -ratolí 568 (Abcam, UK) a 1/500, ja que necessitem un fluorocrom vermell per a diferenciar la proteïna d'estudi del GFP de color verd.

En acabar la incubació del secundari, es realitzen 3 rentats de 10 minuts amb PBS en agitació i es realitza el muntatge dels cobreobjectes sobre els portaobjectes amb el medi de muntatge *Vectahield Antifade Mounting Medium with DAPI* (Vector Laboratories, CA, USA).

4.4.4. Microscopi de fluorescència i anàlisi de col·localització

Per a veure els resultats de la immunocitoquímica de les diferents condicions s'utilitza un microscopi de fluorescència invertit amb *spinning disk* i càmera Olympus DSU.

Les imatges obtingudes amb el microscopi per a cada un dels marcatges (Flag, GFP i DAPI) s'analitzen per a estudiar la col·localització a membrana de CHRM1 i PH-GFP mitjançant la Correlació de Pearson amb el *software* ImageJ¹⁶².

El tractament de les dades de les diferents rèpliques de cada experiment, juntament amb l'anàlisi estadística dels resultats s'han desenvolupat tal com es descriu a l'apartat 4.4.

4.5. Anàlisi de reporters

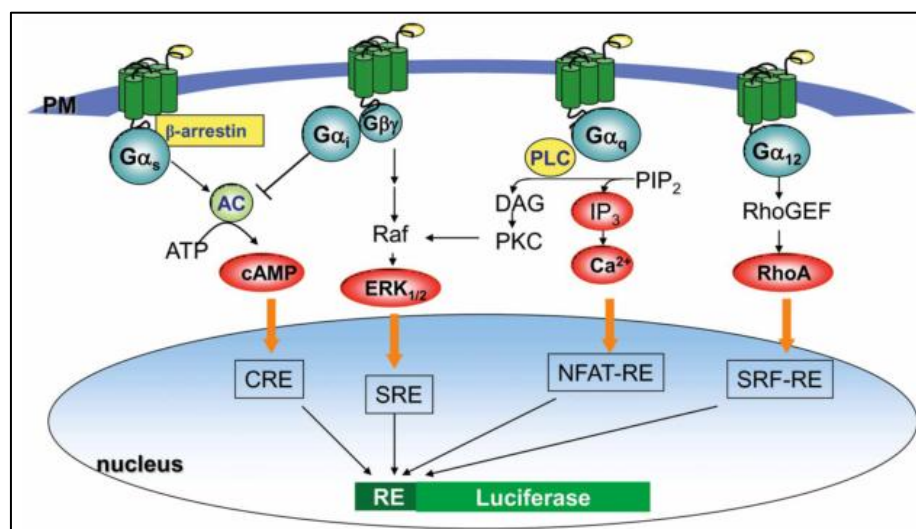


Figura 19 | Sistema d'assaig luciferasa per a estudiar vies de senyalització activades per receptors de proteïna G. L'alliberació dels missatgers secundaris situats més *downstream* de la via (cercles vermells) activen gens *reporters* introduïts *in vitro* al sistema d'expressió. Aquests *reporters* actuen com a factors de transcripció que actuaran sobre el promotor de la luciferasa (també introduït *in vitro*) produint la seva expressió, i posterior detecció per bioluminescència (Extreta de Cheng, 2010²⁴⁶)

El receptor d'acetilcolina CHRM1 està acoblat a proteïna G, i concretament participa en la senyalització intracel·lular tant per calci via el fosfoinositol-3-fosfat (IP3) com per cAMP. Existeixen diversos assajos per a utilitzar un sistema d'expressió de luciferasa per a mesurar el funcionament d'aquestes vies, en funció de l'activació dels receptors per unió al seu lligant, correlacionant el grau d'activitat amb l'expressió de senyal per luciferasa (Figura 19).

4.5.1. Condicions cel·lulars

Per aquests experiments es transfecten cèl·lules HEK293T amb diferents combinacions (Taula 12) dels constructes que contenen les diferents condicions de hCHRM1 i constructes comercials que contenen els gens *reporters* (promotor i luciferasa): pGL4.30[luc2P/CRE] i pGL4.30[luc2P/NFAT-RE] (Promega, WI, USA). A més, també s'utilitza, per als controls negatius, un vector pcDNA3.1(+) buit. La proporció de constructes en cada combinació és de 1:1.

Taula 12 | Combinació de constructes per a generar les diferents condicions cel·lulars per a l'assaig de senyalització per luciferasa

Condicció	Expression Vector	Reporter
CT negatiu	Cèl·lules HEK293T no transfectades	
CT negatiu CRE	pcDNA3.1(+)	pGL4.30[luc2P/CRE]
CRE + Hom(wt)	pcDNA3.1(+)[hCHRM1(wt)-3xFlag]	pGL4.30[luc2P/CRE]
CRE + Hom(mt)	pcDNA3.1(+)[hCHRM1(P380L)-3xFlag]	pGL4.30[luc2P/CRE]
CRE + Het	pcDNA3.1(+)[hCHRM1(wt)-E2A-hCHRM1(mt)-3xFlag]	pGL4.30[luc2P/CRE]
CT negatiu NFAT	pcDNA3.1(+)	pGL4.30[luc2P/NFAT-RE]
NFAT + Hom(wt)	pcDNA3.1(+)[hCHRM1(wt)-3xFlag]	pGL4.30[luc2P/NFAT-RE]
NFAT + Hom(mt)	pcDNA3.1(+)[hCHRM1(P380L)-3xFlag]	pGL4.30[luc2P/NFAT-RE]
NFAT + Het	pcDNA3.1(+)[hCHRM1(wt)-E2A-hCHRM1(mt)-3xFlag]	pGL4.30[luc2P/NFAT-RE]

Control negatiu (CT negatiu), homozigot per al *wildtype* (Hom (wt)), homozigot per al *mutant* (Hom (mt)), heterozigot (Het), reporter NFAT-RE (NFAT).

A les 48h de la transfecció, se sembren les cèl·lules en una placa de 96 pous, de manera que hi hagi triplicats per totes les condicions tant cel·lulars com de l'assaig (Figura 20). Les cèl·lules es deixaran créixer 24 hores fins a realitzar l'assaig.

Les condicions de tractament són:

- No tractats: el medi és DMEM al 0.5% de FBS, el mateix producte amb què es dissolen els diferents tractaments. S'utilitza com a control negatiu.
- Forskolina $\geq 98\%$ (HPLC) $1\mu\text{M}$: molècula activadora de l'adenilat ciclasa, i per tant, augmenta els nivells de cAMP i activa la via CRE (Figura 19)). S'utilitza com a control positiu de l'activitat via cAMP-CRE.
- Calcimicina $5\mu\text{M}$ i PMA $\geq 99\%$ (TLC) 10ng/ml (Sigma-Aldrich, MO, USA): combinació activadora de la senyalització per calci. S'utilitza com a control positiu de l'activitat via calci-NFAT-RE (Figura 20).
- Carbacol $1\mu\text{M}$ (Cayman Chemical, MI, USA): agonista dels receptors muscarínics colinèrgics que actua de la mateixa manera que l'acetilcolina.

El tractament es duu a terme a 37°C durant 6 hores, moment en el qual es procedeix al registre de l'activitat dels receptors estudiats.

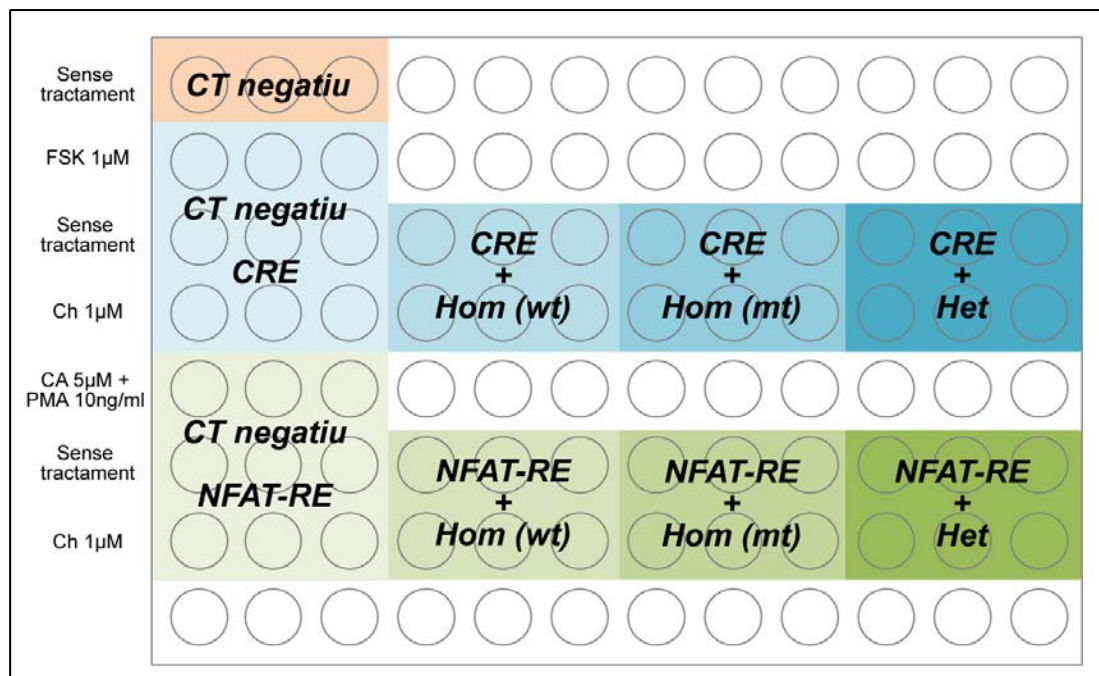


Figura 20 | Condicions experimentals de l'estudi de l'activitat via cAMP i calci de hCHRM1 homozigot *wildtype*, homozigot mutant i heterozigot

4.5.2. Registre de l'activitat luciferasa

Per al registre de l'activitat luciferasa dependent de l'emissió dels reporters, s'ha utilitzat el kit *BrightGlo Luciferase Assay System* (Promega, WI, USA) i el seu protocol associat.

Després de les 6 hores de tractament, es descarta el medi de les cèl·lules i, aquestes, es resuspenen en 40µl de medi DMEM no suplementat en una placa opaca de 96 pous. A continuació, s'afegeix a una proporció de volum per volum la mescla de reactius del kit *BrightGlo* i s'incuben a temperatura ambient i a la foscor durant 5 minuts.

A continuació, es mesura el senyal luciferasa per bioluminiscència en un aparell CLARIOstar (BMG LABTECH, Alemanya). El registre es fa amb un ajustament de focus que dependrà de la senyalització de les cèl·lules control positiu. Els resultats s'obtenen a través del paquet *MARS Data Analysis Software* (BMG LABTECH, Alemanya).

4.5.3. Anàlisi de resultats

L'anàlisi de les dades s'ha realitzat eliminant el soroll de fons de la tècnica corresponent al senyal obtingut al control negatiu dels valors obtinguts tant per als controls positius com per als tractaments amb carabacol. En segon lloc, s'ha normalitzat cada condició amb el control positiu del reporter corresponent per a equiparar els resultats i determinar el *fold* o enriquiment del senyal.

Seguint el procediment descrit a l'apartat 4.4 s'han analitzat les dades de les diferents rèpliques realitzades, juntament amb la seva anàlisi estadística.

4.6. Anàlisi estadística

Per a l'anàlisi de les dades obtingudes en els diferents experiments s'han utilitzat les eines estadístiques proporcionades pel *GraphPad software* (La Jolla, CA, USA; www.graphpad.com).

En primer lloc, per a conèixer si es tractava d'una variable norma o no normal, s'ha utilitzat el test Kolmogorov-Smirnov quan el nombre de valors registrats (n) era superior a 30 i el test de normalitat Shapiro-Wilk quan n era inferior a 30. Es considera variable normal quan els resultats d'aquests testos tenen un **p valor** superior a 0,05, i

no normal quan aquest valor és inferior. La normalitat de la variable determinarà el test a utilitzar, paramètric per a les variables normals i no paramètric per a les no normals. Alhora, aquests tests proporcionen la mitja, la mitjana, la desviació estàndard i el rang interquartílic per a cada grup estudiat.

Els experiments d'aquest treball consisteixen en la comparació d'una variable categòrica i una variable continua, en més de dues categories (homozigot *wildtype*, homozigot per P380L i heterozigot). En els casos on totes les variables comparades eren normals es realitza el test estadístic paramètric ANOVA d'una via seguit del test de correcció de Bonferroni per comparacions múltiples per a comparar els diferents grups entre ells. Per altra banda, en els casos on alguna de les variables és no normal, es realitza l'equivalent no paramètric, el test de Kruskal-Wallis seguit del test de comparació múltiple de Dunn per a comparar els grups entre ells.

La representació dels resultats de l'anàlisi de les dades consisteix a indicar la mitjana +/- la desviació estàndard en el cas de les variables normals, i la mediana juntament amb el rang interquartílic per a les variables no normals. A les gràfiques l'estadística es descriu en funció del p valor resultant del test utilitzat en cada cas.

5. Estudis *in vivo* en peix zebra

Per a estudiar l'efecte de mutacions en peix zebra s'utilitza la metodologia de sobreexpressió de RNA en embrions per a estudiar la potencial patogenicitat en les larves del peix. Els gens utilitzats per a l'estudi són els canals de potassi KCNQ2 i KCNQ3 com a controls per a posar a punt la tècnica, i el receptor d'acetilcolina com a gen problema.

5.1. Síntesi de RNA

El RNA per a injectar als embrions s'obté de diferents *expression vectors* (Taula 13) que contenen els gens d'interès. Els constructes amb el gens de canals de potassi *wildtype* i mutants són proporcionats per grup de recerca liderat pel Dr. Álvaro Villaroel del Biofisika Instituta, CSIC, UPV/EHU del País Basc. Per altra banda, els vectors d'expressió del CHRM1 *wildtype* i mutant són obtinguts a través el mètode de clonatge *Gateway* descrit a l'apartat 3.1, utilitzant com a pDONOR final pcS2.

Taula 13 | Vectors d'expressió per a obtenir RNA i diana de restricció per a la seva linearització

Gen	Constructe <i>wildtype</i>	Constructe mutant	Restricció
KCNQ2	pTLN[KCNQ2(wt)]	pTLN[KCNQ2(S52E)]	HindIII
KCNQ3	pTLN[KCNQ3(wt)]	pTLN[KCNQ3(G382S)]	HindIII
CHRM1	pcS2[hCHRM1(wt)-3xFlag]	pcS2[hCHRM1(P380L)-3xFlag]	Not I

Els constructes de DNA es linealitzen a través de dianes de restricció úniques (Taula 13) i el fragment resultant es purifica utilitzant el mètode *High Pure PCR product purification kit* (Roche, Suïssa). Finalment, a partir del protocol *mMESSAGING mMACHINE™ SP6 Transcription Kit* (Ambion, TX, USA) es sintetitza i s'obté el RNA, el qual es quantifica i s'emmagatzema a -80°C.

5.2. Creuament

Els estudis en peixos requereixen un control molt precís del creuament i la posta d'ous, ja que l'estat de desenvolupament de l'embrió és crucial per a la microinjecció de material genètic, el de les larves per a l'estudi de comportament. Per aquesta raó, els peixos es deixen tota la nit en una mateixa peixera amb dos compartiments separats per una reixeta a través de la qual es poden veure. D'aquesta manera el mascle es col·loca al compartiment inferior i la femella al superior (Figura 21).

A primera hora del matí següent, se situen els dos individus al compartiment superiors durant 10-15 minuts, moment en què es produeix la posta d'ous i la fecundació. Aquests ous es recullen del fons de la peixera i es col·loquen en paques de petri amb medi de creixement d'embrions (aigua destil·lada a 0.3% de sal vermella amb blau de metilè). Finalment amb la lupa es descarten aquells que no han estat fecundats.

5.3. Modulació farmacològica de canals de potassi

Per tal d'estudiar el comportament esperat del peix zebra, en cas de ser-li induït un atac epilèptic, es realitza un estudi amb Retigabina (Sigma-Aldrich, MO, USA), un activador dels canals KCNQs i Linopiridina (Sigma-Aldrich, MO, USA), un inhibidor d'aquests canals.

Durant els 4 primers dies post-fertilització, els embrions es controlen visualment a la lupa, i se'ls hi va renovant el medi. Durant aquest període es mantenen a l'incubador a 28°C per tal que les larves creixin i surtin de l'ou, moment en què es posen en medi salí de creixement de larves (aigua al 0,3% de sal vermella).

Al cinquè dia post-fertilització, les larves es col·loquen individualment en plaques de 24 pous, determinant una placa per cada grup d'estudi. Cada grup serà tractat amb DMSO (dissolvent dels fàrmacs que representarà el control), Retigabina 100µM, Linopiridine 100 µM i una combinació dels dos fàrmacs, respectivament, dissolts en 750µL de medi salí de creixement de larves. Immediatament després de l'administració del fàrmac o DMSO, es col·loca la placa al ZebraBox (Viewpoint, Lió, França) i es procedeix al registre cada dos minuts durant 20 minuts per placa, procediment descrit a l'apartat 5.4.

5.4. Injecció de RNA

Prèviament a injectar el RNA, aquest ha de ser preparat a la concentració corresponent dissolent-lo en medi Daneaus 0.3% per a ser injectat a 25pg i 50pg o 100pg i 200pg, en funció de l'experiment. A part de l'RNA, a la solució injectada també hi ha Roig fenol 1X per a poder tenir un control visual de la injecció i luciferasa groga 1X per al posterior control dels embrions correctament injectats.

L'èxit de la microinjecció de RNA ve determinat, en gran part, per l'estadi de l'embrió, de tal manera que l'èxit augmenta exponencialment quan la injecció es realitza en estadi d'una o dues cèl·lules. Per aquesta raó, just després de recollir els ous després del creuament, tal com s'explica a l'apartat 5.1, el ous seleccionats es col·loquen, sota

la lupa, en un motlle d'agarosa al 2% en medi de creixement d'embrions. Seguidament, amb l'injector modular automàtic, es calibra l'agulla a través del càlcul del diàmetre de la gota en oli mineral, i a continuació, es procedeix a injectar al major nombre d'embrions possible les concentracions de RNA d'interès (Figura 21).

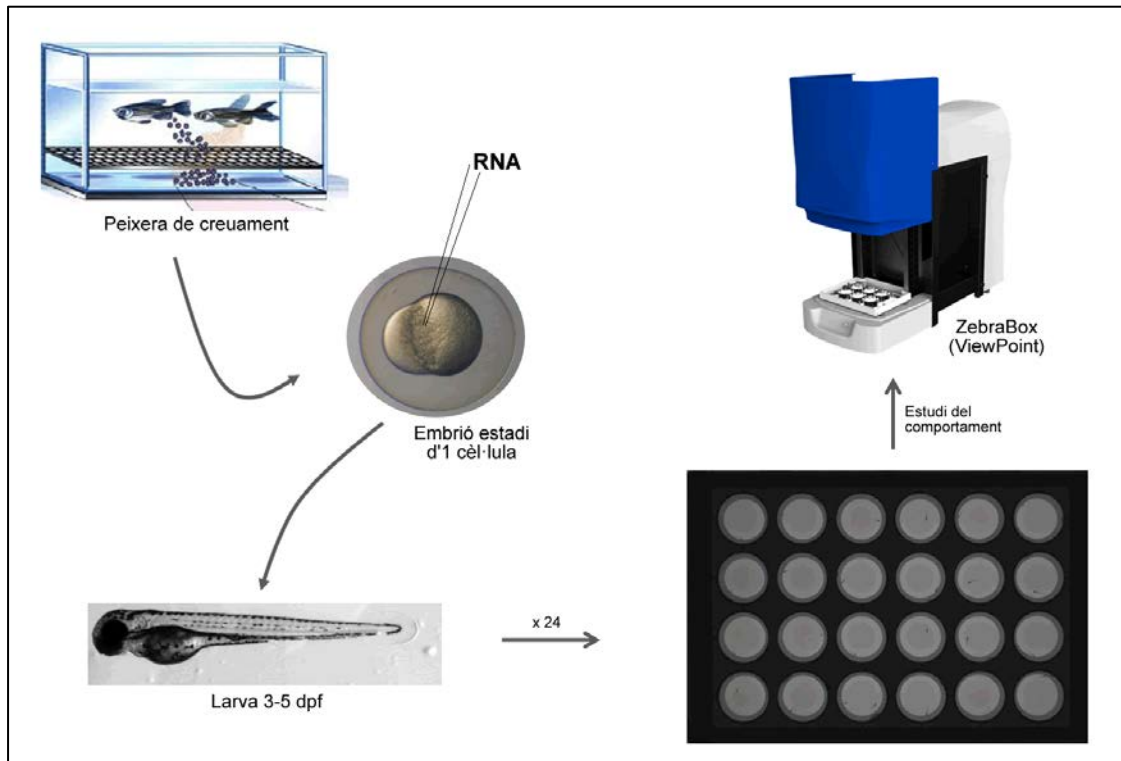


Figura 21 | Esquema del procediment per a l'estudi de comportament diferencial en peixos microinjectats amb RNA *wildtype* i mutat

Quatre hores després de la injecció, els embrió fertilitzats i injectats correctament es separen per grups en plaques de petri en medi de creixement d'embrions, i durant els dies posteriors, es realitzen successives inspeccions visuals i canvis de medi per tal de descartar aquelles larves amb malformacions. Finalment, es col·loquen les larves en medi salí de creixement per larves.

Cinc dies després de la fertilització, les larves es col·loquen per grups (no injectats, cRNA *wildtype* i cRNA mutant; a les diferents concentracions) en plaques de 24 pous en medi salí de creixement de larves, i després de 5 minuts d'estabilització al ZebraBox, es procedeix al registre durant un temps determinat en funció de l'experiment, tal com es descriu a l'apartat 5.4 (Figura 21).

5.5. Registre de comportament

Per al registre del comportament de les larves de peix zebra s'utilitza la màquina ZebraBox amb sistema ViewPoint, i plaques de 24 pous amb fons transparent (Figura 21).

Les larves es reparteixen en cada un dels pous de la placa, i aquesta se situa al suport de plaques de la màquina. Per a l'estudi es fixen diversos paràmetres, entre els quals hi ha una llum permanent al 8% d'intensitat i l'establiment dels diferents nivells d'activitats segons la velocitat de les larves: buit (sense moviment), inactiu (inferior a 2mm/s), petit (entre 2 i 8mm/s) i gran (major de 8mm/s). El temps de registre és d'entre 10 minuts i 1 hora, marcant els registres individuals cada 2 o 5 minuts.

Les mesures es realitzen per a cada individu de forma independent, donant lloc a les dades crues. Aquestes, es processen amb el programa *Fast Data Monitor* (Viewpoint, Lió, França) per tal de calcular la distància total nedada, així com la distància, la duració (temps de natació en cada nivell d'activitat) i els comptatges (número de vegades que canvia d'estat d'activitat) segons el període i l'activitat, tant de cada una de les larves, com del grup sencer.

Finalment, l'anàlisi de les dades, això com el tractament estadístic d'aquestes, es realitza amb el programa *GraphPad software* (La Jolla, CA, UA; www.graphpad.com).

RESULTATS

CAPÍTOL 1. APLICACIÓ DE LES TÈCNiques NGS PER AL DIAGNÒSTIC DE LES ENCEFALOPATIES EPILEPTIQUES D'INICI PRECOÇ.

Aquest treball recull l'estudi genètic de 80 pacients afectes d'encefalopatia epilèptica d'inici precoç utilitzant des de la tècnica de seqüenciació per excel·lència, la seqüenciació Sanger, fins a les noves tècniques de seqüenciació massiva. El 80% dels pacients seleccionats ja havien estat sotmesos a proves genètiques menys completes que l'exoma, les quals no van permetre cap diagnòstic. El present estudi ha utilitzat seqüenciació dirigida per panells de gens d'epilèpsia i seqüenciació de l'exoma complet individual per a estudiar 4 pacients, mentre que la resta de pacients han estat estudiats mitjançant la seqüenciació de l'exoma complet per trios (Taula 14). D'aquests, 41 mostres de pacients han estat seqüenciades al CNAG de Barcelona, 29 a l'UCL de Londres i 6 a l'empresa alemanya Centogene. Dinou pacients estudiats al CNAG entre el 2013 i el 2015 i amb resultat negatiu pel WES, han estat reanàlitzats pel mateix CNAG o per l'UCL. Finalment, un dels pacients a qui se li va realitzar WES a l'UCL, amb resultat negatiu, ha estat estudiat per Centogene mitjançant la seqüenciació del genoma complet.

Taula 14 | Resum dels estudis previs, del mètode utilitzat per aquest treball i dels estudis posteriors a WES-Trio per als 80 pacients EIEE

P	Previ	Mètode	Centre	Posterior
1	aCGH	WES	Alemanya	NA
2	No realitzat	Panell	SJDD	NA
3	No realitzat	WES - Trio	CNAG	NA
4	SCN1A	WES - Trio	CNAG	Reanàlisi
5	Cariotip , aCGH , FRA-X	WES - Trio	CNAG	Reanàlisi
6	aCGH	WES - Trio	CNAG	Reanàlisi
7	aCGH	WES - Trio	CNAG	Reanàlisi
8	aCGH	WES - Trio	CNAG	NA
9	aCGH	WES - Trio	CNAG	Reanàlisi
10	Cariotip, aCGH , MLPA; Sanger: CDKL5, FOX1, NTNG1, MECP2	WES - Trio	CNAG	Reanàlisi
11	aCGH	WES - Trio	CNAG	NA
12	aCGH	WES - Trio	CNAG	Reanàlisi
13	aCGH; Sanger CDKL5	WES - Trio	CNAG	NA

P (pacient), aCGH (array CHG), FRA-X (Fàgil X), SG (Sistemas Genómicos), ND (no descrit a la història), NA (no aplica)

Taula 14 | Continuació

P	Previ	Mètode	Centre	Posterior
14	aCGH	WES - Trio	CNAG	Reanàlisi
15	Cariotip i aCGH	WES - Trio	CNAG	Reanàlisi
16	MLPA; Sanger CDKL5	WES - Trio	CNAG	Reanàlisi
17	Sanger MECP2, CDKL5, PCDH19 i SCN1A	WES - Trio	CNAG	NA
18	aCGH	WES - Trio	CNAG	Reanàlisi
19	aCGH; Sanger CDKL5	WES - Trio	CNAG	Reanàlisi
20	aCGH, MLPA	WES - Trio	CNAG	NA
21	aCGH , Sanger: CDKL5 i STXBP1	WES - Trio	CNAG	NA
22	aCGH, Sanger: SCN1A	WES - Trio	CNAG	NA
23	Cariotip, aCGH, MLPA i FRA-X	WES - Trio	CNAG	Reanàlisi
24	Cariotip, aCGH; Sanger: CDKL5, NTNG1 i ARX	WES - Trio	CNAG	NA
25	aCGH; Sanger POLG	WES - Trio	CNAG	NA
26	No realitzat	WES - Trio	CNAG	Reanàlisi
27	aCGH	WES - Trio	CNAG	Reanàlisi
28	No realitzat	WES - Trio	CNAG	Reanàlisi
29	Cariotip	WES - Trio	CNAG	Reanàlisi
30	aCGH, mtDNA; Sanger SCN1A; panell EIEE	WES - Trio	CNAG	Reanàlisi
31	aCGH	WES - Trio	CNAG	NA
32	Cariotip, aCGH, MLPA, FRA-X	WES - Trio	CNAG	NA
33	No realitzat	WES - Trio	CNAG	NA
34	Sanger: SCN1A i PCDH19	WES - Trio	CNAG	NA
35	No realitzat	WES - Trio	CNAG	Reanàlisi
36	No realitzat	WES - Trio	CNAG	NA
37	ND	WES - Trio	CNAG	NA
38	Carioptip, aCGH i MLPA	WES - Trio	CNAG	NA
39	Cariotip, aCGH; Sanger; SCN1A, GABRB2, MECP2 i CDKL5	WES - Trio	CNAG	NA
40	Cariotip, aCGH; panell EIEE	WES - Trio	CNAG	Reanàlisi
41	Sanger POLG1; panell EIEE	WES - Trio	CNAG	Reanàlisi
42	aCGH, MLPA, mtDNA; Sanger; SCN1A, CDKL5, GABRG2 i MECP2	WES - Trio	CNAG	Reanàlisi
43	aCGH; Sanger: SCN1A i PCDH19; panell EIEE	WES - Trio	UCL	NA
44	Panell EIEE	WES - Trio	CNAG	Reanàlisi

P (pacient), aCGH (array CHG), FRA-X (Fàgil X), SG (Sistemas Genómicos), ND (no descrit a la història), NA (no aplica)

Taula 14 | Continuació

P	Previ	Mètode	Centre	Posterior
45	aCGH	WES - Trio	UCL	NA
46	aCGH	WES - Trio	UCL	NA
47	aCGH	WES - Trio	UCL	NA
48	aCGH	WES - Trio	UCL	WGS-Trio
49	aCGH	WES - Trio	UCL	NA
50	aCGH	WES - Trio	UCL	NA
51	Cariotip	WES - Trio	UCL	NA
52	Panell EIEE	WES - Trio	UCL	NA
53	Panell EIEE	WES - Trio	UCL	NA
54	aCGH	WES - Trio	UCL	NA
55	No realitzat	WES - Trio	UCL	NA
56	ND	WES - Trio	UCL	NA
57	Cariotip , FRA-X, aCGH i MLPA	WES - Trio	UCL	NA
58	Cariotip , aCGH , metilació; panell EIEE	WES - Trio	UCL	NA
59	aCGH; panell EIEE	WES - Trio	UCL	NA
60	aCGH; panell gens	WES - Trio	UCL	NA
61	aCGH	WES - Trio	UCL	NA
62	ND	WES - Trio	UCL	NA
63	ND	WES - Trio	UCL	NA
64	ND	WES - Trio	UCL	NA
65	ND	WES - Trio	UCL	NA
66	ND	WES - Trio	UCL	NA
67	aCGH	WES - Trio	UCL	NA
68	ND	WES - Trio	UCL	NA
69	ND	WES - Trio	UCL	NA
70	ND	WES - Trio	UCL	NA
71	Cariotip, aCGH	WES - Trio	UCL	NA
72	aCGH	WES - Trio	UCL	NA
73	No realitzat	WES - Trio	Centogene	NA
74	aCGH	WES - Trio	Centogene	NA
75	aCGH	Panell EIEE	SG	NA
76	aCGH	WES - Trio	Centogene	NA
77	aCGH	WES - Trio	Centogene	NA

P (pacient), aCGH (array CHG), FRA-X (Fàgil X), SG (Sistemas Genómicos), ND (no descrit a la història), NA (no aplica)

Taula 14 | Continuació

P	Previ	Mètode	Centre	Posterior
78	aCGH; Sanger SCN1A	WES - Trio	Centogene	NA
79	ND	WES - Trio	Centogene	NA
80	No realitzat	Panell EIEE	SG	NA

P (pacient), aCGH (array CHG), FRA-X (Fàgil X), SG (Sistemas Genómicos), ND (no descrit a la història), NA (no aplica)

1. 1. Resultats globals de l'estudi genètic de pacients EIEE

Els resultats generals de la seqüenciació dels 80 pacients EIEE han estat d'un 52,5 % de diagnòstics, entre totes les tècniques utilitzades (Taula 15).

El desglossament d'aquestes dades, mostren que les variants de tots els pacients seqüenciats per panell o WES individual amb un diagnòstic positiu, coincideixen amb un gen prèviament associat a l'epilèpsia. Pel que fa als pacients sotmesos a exoma complet per tríos, els resultats generals mostren un 35,53% de diagnòstics en gens associats al fenotip i un 14,47% en potencials nous gens candidats. Si s'analitzen individualment els resultats, en funció del centre de seqüenciació, s'observen taxes de diagnòstic del 53,66% al CNAG, 31,03% a l'UCL i 33,33% a Centogene. A aquestes dades, cal afegir-hi el posterior diagnòstic d'un 26,32% dels 19 pacients negatius per WES del CNAG, reanalitzats entre 2017 i 2018. En tots aquests casos, el percentatge de variants en gens coneguts com a causants del fenotip és major que en gens nous, a excepció dels resultats del reanàlisi on resulta major la detecció de variants en gens proposats com a nous candidats. Finalment, la seqüenciació del genoma complet en un pacient negatiu per WES a l'UCL, ha donat com a resultat un ventall de mutacions en gens prèviament associats al fenotip, en regions profundes dels introns o reguladores, que en cas de provar-se patogèniques podrien augmentar el nombre de diagnòstics.

Considerant l'aplicabilitat de les noves tècniques de seqüenciació massiva fent ús de tríos com a objectiu principal d'aquest treball, en extreure la informació resultant de l'estudi de tríos WES se'n determina un diagnòstic total del 50%. A més, aquest podria arribar a ser del 51,31% si es confirma la patogenicitat d'alguna de les variants detectades a través del trio WGS.

Taula 15 | Resum dels resultats de l'estudi genètic de 81 pacients EIEE

Mètode	Num Ind	Diagnòstic			Sense diagnòstic
		Gens descrits	Gens nous	Total	
Sanger, panell o WES	4	4 (100%)	0	4 (100%)	0
WES - trio	76	27 (35,53%)	11 (14,47%)	38 (50%)	38 (50%)
WES - trio CNAG	41	18 (43,9%)	4 (9,76%)	22 (53,66%)	19 (46,34%)
WES - trio UCL	29	5 (17,24%)	4 (13,79%)	9 (31,03%)	20 (68,97%)
WES - trio Centogene	6	2 (33,33%)	0	2 (33,33%)	4 (66,66%)
Reanàlisi	19	2 (10,53%)	3 (15,79%)	5 (26,32%)	14 (73,68%)
Total	80	31 (38,75%)	11 (13,75%)	42 (52,5%)	38 (47,5%)

L'anàlisi de les dades globals en funció de l'edat d'inici de les crisis epilèptiques en els pacients d'aquest estudi mostra que els 42 diagnòstics assolits a l'estudi han estat de pacients que debuten durant els primers 12 mesos de vida. Dintre d'aquests, la major proporció es troba en els individus amb crisis neonatals (52,38%), disminuint a la meitat en els individus amb debut entre el primer i tercer mes de vida (21,43%) o entre el quart i sisè mes (21,43%) i resultant en un baix nombre de diagnòstics, implicant nous gens candidats, en els debuts entre el setè mes i l'any de vida (4,76%). Entre els 6 pacients amb debuts tardans, és a dir, més enllà dels 12 mesos d'edat, no s'ha pogut assolir cap diagnòstic (Figura 22).

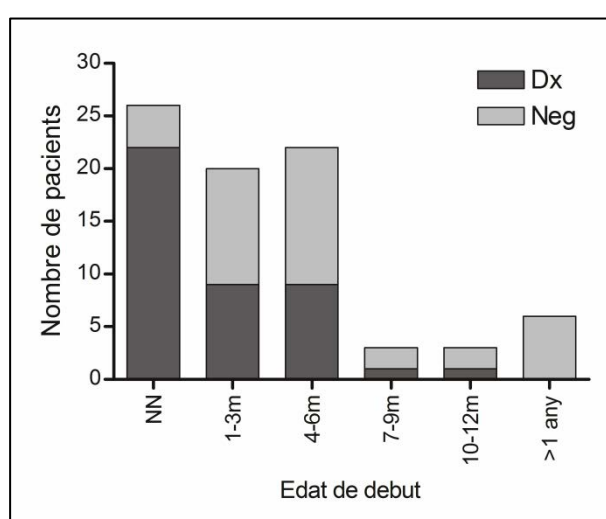


Figura 22 | Proporció de pacients amb diagnòstic respecte als negatius en funció de l'edat de debut. Dx (diagnosticats), Neg (negatius).

L'exoma o genoma complet en el pacient i els progenitors va ser realitzat en 76 pacients dels 80 inclosos a l'estudi. A partir de la informació que es disposa a les històries clíniques, se sap que el 75% dels pacients es van sotmetre a proves genètiques diagnòstiques prèvies (Taula 14) en comparació amb un 10,53% en què aquest era el primer estudi que se'ls hi realitzava. Dels 57 pacients amb proves prèvies, s'ha arribat a un 50,9% de diagnòstic genètic per la tècnica WES-trio, mentre que en els pacients sense cap estudi, la taxa d'èxit ha estat del 75%. Els estudis previs realitzats són assaigs per a detectar reordenaments o delecions i duplicacions al genoma (cariotip, *arrays*, MLPA), estudis de gens concrets per seqüenciació directa o panells de gens específics d'epilèpsia. Les dades mostren un percentatge de diagnòstic per WES-trio entre el 50 i el 75% quan prèviament s'ha realitzat únicament tècniques per detectar grans modificacions al genoma, o aquestes s'han combinat amb seqüenciació directa. La taxa de diagnòstic cau, especialment en la detecció de mutacions en gens coneguts com a causants de la malaltia, quan prèviament al WES-trio s'han utilitzat panells específics per a epilèpsia com a eina diagnòstica.

1.2. Variants en gens associats a epilèpsia

La primera fase de l'anàlisi de variants consisteix en la cerca de canvis en gens prèviament associats al fenotip epilèptic, tant els gens classificats com a EIEE a l'OMIM, com els gens descrits a la literatura més recent com a causants d'epilèpsia (Taula 16).

Considerant els gens recollits a l'OMIM, a la cohort de pacients inclosa en aquest treball s'han trobat variants en heterozigosi a *GABRA1*, *GNAO1*, *KCNQ2*, *KCNT1*, *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN8A*, *SLC35A2* i *STXBP1*, i en heterozigositat composta (CHET) a *SLC13A5* i *SZT2*. De totes les variants, dues d'elles no tenen afectació directa aparent sobre la proteïna final: *SLC35A2* (NM_001032289: c.92-2A>G) i *STXBP1* (NM_001032221: c. 1464-4G>A). Les posicions afectades per ambdues variants se situen en zones intròniques molt pròximes a l'inici de l'exó, convertint-les en potencials zones reguladores de l'*splicing* d'aquests gens, tal com són classificades pels predictors *in silico* específics per aquests tipus de mutacions. D'aquesta manera, de forma indirecta, afectarien la proteïna final alterant la seva seqüència final.

Per altra banda, gens també associats al fenotip a través de treballs publicats més recentment es troben mutats en alguns dels pacients d'aquesta sèrie. En heterozigosi, s'ha detectat una variant al receptor ionotròpic de glutamat tipus 2 (*GRIA2*) també

conegut com a receptor AMPA2¹⁶³, relacionat amb el procés de transmissió de l'impuls nerviós. En heterozigositat composta es troben afectats, en pacients d'aquesta sèrie, el gen que codifica per ALDH7A1, aldehid deshidrogenasa 7 tipus A1, una proteïna prèviament associada a epilèpsia depenent de piridoxina¹⁶⁴; el gen *RARS2*, codificant per l'arginina tRNA sintetasa mitocondrial, prèviament associada a hipoplàsia pontocerebelar, però descrita el 2016 com a causa d'EIEE¹⁶⁵; i la proteïna 5 associada a l'espermatogènesi, *SPATA5*, causant de microcefàlia, discapacitat intel·lectual, crisis epilèptiques i dèficit auditiu¹⁶⁶.

El 96,15% de les variants heterozigotes detectades es presenten *de novo*, a excepció de la variant p.P839Qfs*36 (NP_742106) a *KCNQ2* trobada al pacient 55. Aquest presenta familiars amb antecedents d'epilèpsia, i tot i estar més afectat que els familiars, presenta un fenotip més lleu que la resta d'individus inclosos a l'estudi, i en comparació amb altres individus portadors de mutacions al mateix gen. En general, els pacients d'aquesta sèrie presenten, en major proporció, mutacions als gens de la proteïna d'unió a sintaxina tipus 1 (*STXBP1*), detectades en 8 pacients, seguit per variants en 7 pacients a la subunitat 2 del canal de potassi activat per voltatge (*KCNQ2*). El canal de potassi activat per sodi (*KCNT1*) està mutat en 3 individus i, finalment, 2 dels pacients estudiats presenten variants en el canal de sodi *SCN1A*. La resta de gens llistats anteriorment només es troben afectats en un únic individu de la cohort total (Taula 16). Tot i això, 3 variants havien estat catalogades a *Human Genetic Mutation Database*, i 14 de les mutacions trobades han estat reportades prèviament a la base de dades dbSNP com a causant de malaltia. Concretament 3 d'aquests casos han estat trobats en pacients amb encefalopatia epilèptica d'inici precoç per l'empresa Centogene i descrits a la seva base de dades (CentoMD). Una quarta variant no reportada prèviament també es troba classificada com a causant d'EIEE a la mencionada base de dades.

Les variants en gens associats a epilèpsia trobades en 31 pacients (Taula 16), han estat obtingudes en 4 dels casos a través de la seqüenciació dirigida per panell específic de gens EIEE i WES individual. Els pacients restants han estat diagnosticats a través de la realització de l'exoma complet per trios i en el 89,29% dels casos, el diagnòstic ha estat establert amb el primer processament dels resultats. Un posterior reanàlisi (2017-2018) de 19 pacients amb negatius per l'estudi WES realitzat al CNAG, ha permès la detecció de mutacions en heterozigositat composta, potencialment patogèniques, en el pacient 26 (*RARS2*; NM_064716:p.R560H i p.Y322C) i el pacient 29 (*SPATA5*; NM_660208:p.R84Q i Q132*).

Tal com s'indica a materials i mètodes (Taula 6), les edats de debut de la cohort estudiada se situen en un 92,5%, durant el primer any de vida. Els pacients diagnosticats que presenten variants en gens prèviament associats al fenotip, debuten tots durant els primers 6 mesos de vida (Figura 23). Més concretament, el 61,29% de variants en gens classificats com a EIEE a l'OMIM, han estat detectades en pacients on la primera crisi epilèptica s'ha desenvolupat durant el període neonatal, i dins d'aquests, el 68,42% inicien les crisis dins la primera setmana de vida. Pertanyen a aquest grup els 7 individus portadors de variants en el gen *KCNQ2* estudiats en aquest treball, els quals comparteixen el període neonatal com a edat de debut de les crisis epilèptiques, i a més, 5 d'ells les inicien entre el primer i quart dia de vida. Dins el grup de debut més tardà, s'hi troben els pacients que presenten variants en els diferents canals de sodi (*SCN1A*, *SCN2A* i *SCN8A*), els quals han patit la primera crisi epilèptica entre els 4 i 5 mesos d'edat.

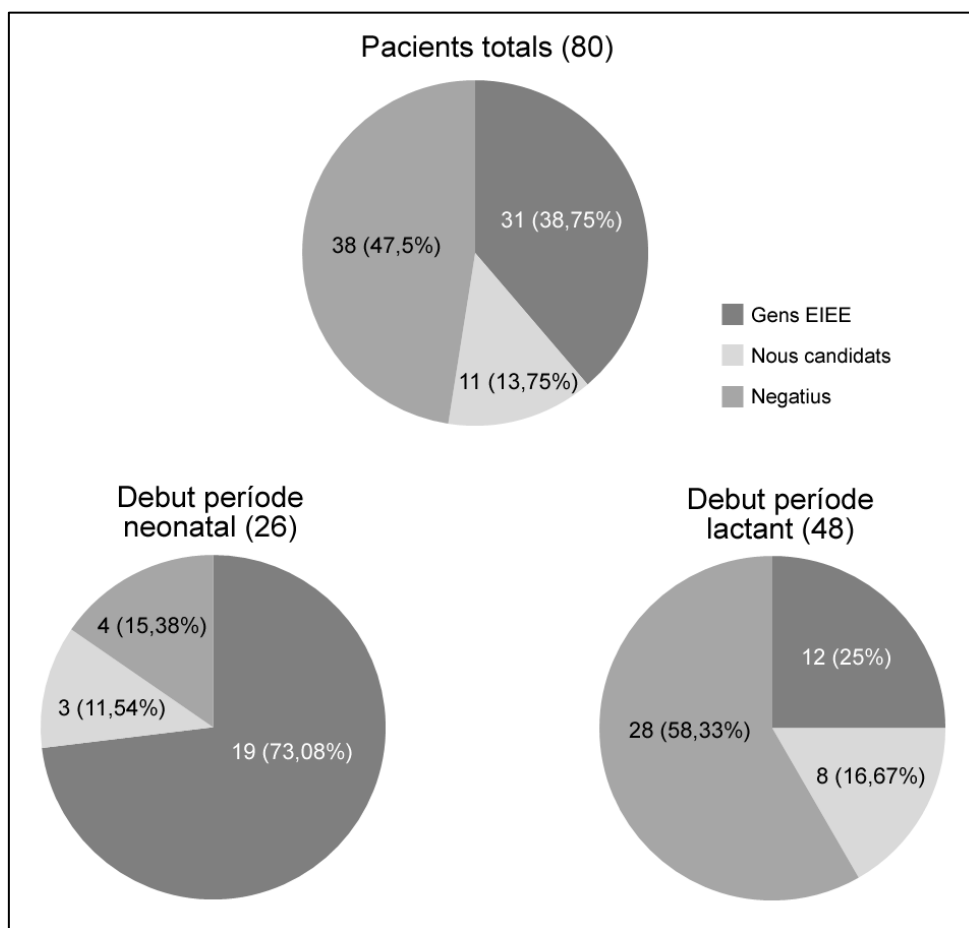


Figura 23 | Variants detectades en els pacients EIEE. Diagnòstics en la cohort total i en funció de l'edat de debut de les crisis epilèptiques: 26 pacients durant el primer mes de vida (neonatal) i 48 del primer mes fins a l'any (lactant). Els pacients es classifiquen en funció del gen mutat: gens associats prèviament al fenotip (Gens EIEE), gens proposats com a nous contribuïdors a l'EIEE (Nous candidats) i finalment els pacients sense diagnòstic (Negatius).

Taula 16 | Variants detectades en gens prèviament associats al fenotip epilèptic

P	Dx	Gen	Herència	cDNA	Proteïna	C	BD poblacionals			BD malalties			Predictors <i>In silico</i>			
							ExAC	gnomAD	centoMD	dbSNP	HGMD	PP2	PV	MT	HSF	
74	EIEE	ALDH7A1	CHET	1526G>A	G509D	S	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D	DC	NA
8	EIEE	GABRA1	<i>de novo</i>	799C>G	L267V	S	ND	ND	ND	ND	ND	D	N	D	DC	NA
37	EIEE	GNAO1	<i>de novo</i>	596T>C	L199P	S	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D	DC	NA
46	EIEE	GRIA2	<i>de novo</i>	2363G>T	W788L	S	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D	DC	NA
2	EIEE	KCNQ2	<i>de novo</i>	388G>A	E130K	S	ND	ND	ND	rs864321710	ND	D	D	D	DC	NA
20	EIEE	KCNQ2	<i>de novo</i>	841G>C	G281R	S	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D	DC	NA
38	EIEE	KCNQ2	<i>de novo</i>	808T>C	W270R	S	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D	DC	NA
55	EIEE	KCNQ2	HET (P)	2516_2517 delICC	P839Qfs*36	S	ND	ND	ND	ND	C1033958	NA	NA	P	1	
59	Sd Ohtahara	KCNQ2	<i>de novo</i>	833T>C	I278T	S	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D	DC	NA
75	EIEE	KCNQ2	<i>de novo</i>	823C>G	L275V	S	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D	DC	NA
79	EIEE	KCNQ2	<i>de novo</i>	983A>T	H328L	S	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D	DC	NA

P (pacient), Dx (diagnòstic), Sd (síndrome), MMPSI (epilepsia parcial migratòria de la infància), Encef. metabol (encefalopatia metabòlica), E. Refract (epilèpsia refractària), E. Precoç (epilèpsia precoç), RGD (retard generalitzat del desenvolupament), TEA (Trastorn de l'espectre autista), HET (heterozigot d'herència paterna (P) o materna (M)), CHET (heterozigot compost), C (conservació), S (si), N (no), BD (bases de dades), ND (no descrit), PP2 (Polyphean2), PV (Provean), D (*deleterious*), N (*neutral*), MT (MutationTaster), DC (causant de malaltia), P (polimorfisme), HSF (*Human Splice Finder*), 1 (possible afectació de l'*splicing*), 2 (afectació de l'*splicing*), NA (no aplica)

Taula 16 | Continuació

P	Dx	Gen	Herència	cDNA	Proteïna	C	BD poblacionals			BD malalties			Predictors <i>In silico</i>			
							ExAC	gnomAD	centoMD	dbSNP	HGMD	PP2	PV	MT	HSF	
3	MMPSI EIEE	KCNT1	<i>de novo</i>	2800G<A	A934T	S	ND	ND	4 (EIEE)	rs397515403	ND	D	D	DC	NA	
21	EIEE RGD	KCNT1	<i>de novo</i>	1421G>A	R474H	S	ND	ND	ND	rs397515404	ND	D	D	DC	NA	
51	EIEE	KCNT1	<i>de novo</i>	1283G>A	R428Q	S	ND	ND	2 (EIEE)	rs397515402	ND	D	D	DC	NA	
26	Encef. metabol, E.Refract	RARS2	CHET	1679 G>A 965 A>G	R560H Y322C	S S	0,000033 (0 HOM)	0,000032 (0 HOM)	Yes	rs756502974	ND	D	D	DC	NA	
11	Sd Dravet	SCN1A	<i>de novo</i>	3733C>T	R1245*	S	ND	ND	1 (EIEE)	ND	ND	NA	NA	DC	NA	
34	Sd. Dravet	SCN1A	<i>de novo</i>	2857insG	I953Dfs*44	S	ND	ND	ND	ND	CM113305	NA	NA	DC	NA	
25	EIEE	SCN2A	<i>de novo</i>	2687C>T	A896V	S	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	DC	NA	
13	EIEE	SCN8A	<i>de novo</i>	669G>C	R223S	S	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	DC	NA	

P (pacient), Dx (diagnòstic), Sd (síndrome), MMPSI (epilepsia parcial migratòria de la infància), Encef. metabol (encefalopatia metabòlica), E. Refract (epilèpsia refractària), E. Precoç (epilèpsia precoç), RGD (retard generalitzat del desenvolupament), TEA (Trastorn de l'espectre autista), HET (heterozigot d'herència paterna (P) o materna (M)), CHET (heterozigot compost), C (conservació), S (si), N (no), BD (bases de dades), ND (no descrit), PP2 (Polyphen2), PV (Provean), D (*deleterious*), N (*neutral*), MT (MutationTaster), DC (causant de malaltia), P (polimorfisme), HSF (*Human Splice Finder*), 1 (possible afectació de l'*splicing*), 2 (afectació de l'*splicing*), NA (no aplica)

Taula 16 | Continuació

P	Dx	Gen	Herència	cDNA	Proteïna	C	BD poblacionals			BD malalties			Predictors <i>In silico</i>			
							ExAC	gnomAD	centoMD	dbSNP	HGMD	PP2	PV	MT	HSF	
80	E. Precoç	SLC13A5	CHET	997C>T	R333*	S	0,000016 (0HOM)	0,000018 (0HOM)	ND	rs773770609	ND	NA	NA	DC	NA	
				478G>T	E160*	N	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	DC	NA	
16	Sd West RGD	SLC35A2	<i>de novo</i>	92-2A>G	NA	S	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	DC	2	
29	EIEE	SPATA5	CHET	251G>A	R84Q	S	0,000041 (0 HOM)	0,000061 (0 HOM)	ND	rs745858366	ND	D	N	DC	NA	
				394C>T	Q132*	S	ND	0,000020 (0 HOM)	ND	ND	ND	NA	NA	DC	NA	
17	Sd West, EIEE	STXBP1	<i>de novo</i>	1162C>T	R388*	S	ND	ND	ND	rs121918321	CM094012	NA	NA	DC	NA	
22	EIEE	STXBP1	<i>de novo</i>	1364CG>CG G	L456Afs*36	S	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	DC	NA	
31	Sd Ohtahara	STXBP1	<i>de novo</i>	1099C>T	R367*	S	ND	ND	ND	rs796053366	ND	NA	NA	DC	NA	

P (pacient), Dx (diagnòstic), Sd (síndrome), MMPSI (epilepsia parcial migratòria de la infància), Encef. metabòl (encefalopatia metabòlica), E. Refract (epilepsia refractària), E. Precoç (epilepsia precoç), RGD (retard generalitzat del desenvolupament), TEA (Trastorn de l'espectre autista), HET (heterozigot d'herència paterna (P) o materna (M)), CHET (heterozigot compost), C (conservació), S (si), N (no), BD (bases de dades), ND (no descrit), PP2 (Polyphen2), PV (Provean), D (*deleterious*), N (neutral), MT (Mutation Taster), DC (causant de malaltia), P (polimorfisme), HSF (*Human Splice Finder*), 1 (possible afectació de l'*splicing*), 2 (afectació de l'*splicing*), NA (no aplica)

Taula 16 | Continuació

P	Dx	Gen	Herència	cDNA	Proteïna	C	BD poblacionals			BD malalties			Predictors <i>In silico</i>					
							ExAC	gnomAD	centoMD	dbSNP	HGMD	PP2	PV	MT	HSF			
		Sd West																
32	RGD TEA	STXBP1	<i>de novo</i>	1461+1G>A	NA	S	ND	ND	ND	rs796053367	ND	NA	NA	DC	DC	2		
33	EIEE	STXBP1	<i>de novo</i>	568C>T	R190W	S	ND	ND	ND	rs796053355	ND	D	D	DC	DC	NA		
36	EIEE	STXBP1	<i>de novo</i>	1249+1G>T	NA	S	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	DC	DC	2		
39	EIEE	STXBP1	<i>de novo</i>	1651C>T	R551C	S	ND	ND	1 (EIEE)	rs796053373	ND	D	D	DC	DC	NA		
57	EIEE	STXBP1	<i>de novo</i>	664_670del GGCCCAG	G222Tfs*8	S	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	DC	DC	NA		
1	EIEE	SZT2	CHET	2092C>T 1496G>T	Q698* S499I	S	ND	ND	ND	rs397515490	ND	NA	NA	DC	DC	NA		

P (pacient), Dx (diagnòstic), Sd (síndrome), MMPSI (epilepsia parcial migratòria de la infància), Encef. metabòl (encefalopatia metabòlica), E. Refract (epilepsia refractària), E. Precoç (epilèpsia precoç), RGD (retard generalitzat del desenvolupament), TEA (Trastorn de l'espectre autista), HET (heterozigot d'herència paterna (P) o materna (M)), CHET (heterozigot compost), C (conservació), S (si), N (no), BD (bases de dades), ND (no descrit), PP2 (Polyphen2), PV (Provean), D (*deleterious*), N (neutral), MT (MutationTaster), DC (causant de malaltia), P (polimorfisme), HSF (*Human Splice Finder*), 1 (possible afectació de l'*splicing*), 2 (afectació de l'*splicing*), NA (no aplica)

El debut de l'epilèpsia en els individus portadors de variants a *STXBP1* varia entre el període neonatal i el sisè més de vida, no correlacionant-se, a priori, l'edat de debut amb la malignitat de la mutació, segons la predicció *in silico*, ni amb la severitat fenotípica. El cas dels pacients amb *KCNT1* mutat és similar, ja que l'inici de les crisis es distribueix durant els 3 primers mesos de vida, i tot i que tampoc hi ha una relació aparent amb la patogenicitat de la variant i la clínica presentada, l'evolució del pacient amb debut neonatal no va ser favorable, desencadenant èxitus als 9 anys.

A la cohort estudiada es poden reconèixer diferents tipus d'epilèpsies, en alguns casos no classificades. Dels pacients amb diagnòstic genèric d'EIEE (45 en total), el 48,89% han estat diagnosticats amb variants en gens coneguts com a causants del fenotip. Si es consideren les síndromes amb fenotip reconeixible, els dos pacients amb síndrome de Dravet han estat diagnosticats amb una variant a *SCN1A*, tal com es descriu a la literatura¹⁶⁷. Dels 9 pacients amb Síndrome de West, han estat diagnosticats un 22,22% amb variants a *STXBP1* en dos d'ells i *SLC35A2* en un tercer individu. Ambdós gens han estat descrits en pacients amb aquest fenotip, especialment el segon⁶⁵. *STXBP1* també es relaciona amb la Síndrome d'Ohtahara, i un dels dos pacients d'aquest estudi amb aquest fenotip ha estat diagnosticat precisament d'aquest gen. L'altre pacient Ohtahara d'aquesta cohort presenta una variant a *KCNQ2*, també descrit en pacients classificats dins d'aquesta síndrome. La resta de pacients amb variants en aquests dos gens no s'han classificat dins d'un fenotip específic, tenint com a diagnòstic el d'EIEE. Només un pacient és afecte de l'últim fenotip reconeixible present en aquest estudi, MMPSI, síndrome associada principalment a variants a *KCNT1*, gen afectat en el mencionat pacient¹⁶⁸. La resta d'individus afectes per canvis en aquest mateix gen s'agrupen dins el diagnòstic general d'encefalopatia epilèptica d'inici precoç.

Finalment, l'anàlisi dels pacients amb estudi WES tenint en compte el tipus de proves genètiques realitzades prèviament en un laboratori extern, mostra que en el grup de pacients diagnosticats amb variants en gens associats a epilèpsies, el 75% de pacients havien estat estudiats abans, mentre que el 17,86%, no. Del 7,14% restant se'n desconeix la informació (Taula 14). Concretament, dintre el primer grup, el 57,14% de pacients es van analitzar amb tècniques de detecció de reordenaments o delecions i duplicacions (cariotip, arrayCGH o MLPA), el 9,52% amb seqüenciació dirigida mitjançant Sanger de diversos gens, segons la sospita diagnòstica del clínic. Els individus restants van ser sotmesos a combinacions d'estudis genètics. Aquests estudis van resultar negatius, raó per la qual van ser seleccionats per a l'estudi WES

que es planteja en aquest treball. Cal destacar, però, que en l'estudi previ del pacient 35, el qual presenta la mutació p.I953Dfs*44 (NP_001189364) a *SCN1A*, ja es va incloure la seqüenciació dirigida de *SCN1A*, no detectant cap variant d'interès. Un cas similar és el del pacient 60, portador de la mutació p.I278T (NP_742106) al gen *KCNQ2*, el qual s'havia sotmès a un panell de gens d'encefalopatia epilèptica d'inici precoç fruit del qual no va reportar-se cap variant d'interès clínic.

1.3. Anàlisi de variants en nous gens candidats

Els gens associats prèviament al fenotip només expliquen la causa de l'epilèpsia en el 38.75% dels pacients del nostre estudi. El 61.25% restant, s'analitzen amb una segona estratègia, per a estudiar les variants potencialment patogèniques en la resta del genoma. Les variants detectades explicarien el 13.75% dels casos estudiats, és a dir, 11 pacients addicionals, i en tots ells es tracta de gens trobats únicament en un sol pacient de la present cohort (Taula 17).

La majoria d'aquestes mutacions es presenten *de novo*, tot i que també hi ha mutacions en homozigosi en dos casos i en heterozigositat composta en tres individus, donant lloc a un total de 14 variants detectades en total. D'aquestes, el 92.86% produeixen un canvi d'aminoàcid a la seqüència proteica final, havent-hi també una variant que produeix finalització precoç de la proteïna: PTF1A (NM_178161: c.886C>T; p.R296*) . Els gens classificats com a nous gens candidats a contribuir al fenotip epilèptic, després d'aquesta segona fase de l'anàlisi són els següents: *CACNA1C*, *CACNA1G*, *CHRM1*, *DENND4C*, *FMN1*, *INO80*, *KIF1B*, *PARS2*, *PTF1A*, *SETDB1* i *TRAK2*. Tots ells han estat obtinguts a partir de l'estudi de l'exoma complet per trios, i 10 dels 11 pacients diagnosticats amb gens candidats nous tenien proves genètiques diagnòstiques amb resultat negatiu prèvies a l'estudi WES-trio.

Els predictors *in silico* i la freqüència poblacional de variants són varies de les eines que contribueixen a la selecció de nous gens candidats. Els predictors *Polyphen2*, *Provean* i *Mutation Taster*, juntament amb el *Human Splice Finder* per als casos de mutacions d'*splicing* detecten la major part de les variants patogèniques i, com a conseqüència, causa potencial de malaltia. Només els efectes de les mutacions p.N603D (NP_001096654) i p.A1021V (NP_001138887) en heterozigositat composta en els gens *FMN1* i *SETDB1*, respectivament, es consideren neutrals segons els predictors. La freqüència poblacional extreta de les bases de dades ExAC i gnomAD, on es recullen les variants trobades a població no afecta per malalties

Taula 17 | Variants detectades en gens proposats com a nous candidats a contribuir al fenotip epilèptic

P	Dx	Gen	Herència	cDNA	Proteïna	C	BD poblacionals			BD malalties			Predictors <i>In silico</i>		
							ExAC	gnomAD	centoMD	dbSNP	HGMD	PP2	PV	MT	HSF
47	EIEE	CACNA1C	<i>de novo</i>	1973T>C	L658P	S	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	DC	NA
42	EIEE	CACNA1G	<i>de novo</i>	4591A>T	M1531L	S	ND	ND	ND	ND	ND	D	N	DC	NA
24	EIEE	CHRM1	<i>de novo</i>	1139C>T	P380L	S	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	DC	NA
60	IS, TEA	DENND4C	HOM	3587A>G	D1196G	S	0.00053 (0 HOM)	0.00057 (0 HOM)	ND	ND	ND	D	N	DC	NA
5	Sd West, RM	FMN1	CHET	1807A>G	N603D	S	0.00005 (0HOM)	0.000050 (0 HOM)	ND	rs781211668	ND	B	N	P	NA
7	EIEE	INO80	<i>de novo</i>	1249A>C	K417Q	S	ND	ND	ND	ND	ND	B	N	DC	NA
71	Sd West	KIF1B	HOM	214C>T	R72C	S	ND	0.000020 (0 HOM)	ND	ND	ND	D	D	DC	NA

P (patient), Dx (diagnòstic), IS (espasmes infantils), TEA (trastorn de l'espectre autista), Sd (síndrome), RM (retard mental), E. Refract jepilèpsia refract+aria), RGD (retard generalitzat del desenvolupament), E. miclònic (epilèpsia miclònica) HOM (homozigot), CHET (heterozigot compost), C (conservació), S (si), N (no), BD (bases de dades), ND (no descrit), PP2 (Polyphen2), PV (Provean), D (*deleterious*), B (Benigna), N (neutral), MT (MutationTaster), DC (causant de malaltia), P (polimorfisme), HSF (*Human Splice Finder*), 1 (possible afectació de *l'splicing*), 2 (afectació de *l'splicing*), NA (no aplicable)

Taula 17 | Continuació

P	Dx	Gen	Herència	cDNA	Proteïna	C	BD poblacionals			BD malalties			Predictors <i>In silico</i>		
							ExAC	gnomAD	centoMD	dbSNP	HGMD	PP2	PV	MT	HSF
41	EIEE	PARS2	CHET	1306 G>A	A436T	S	ND	(0 HOM)	ND	ND	ND	D	N	DC	NA
				560 A>G	K187R	S	0.00012 (0 HOM)	0.00019 (0 HOM)	ND	rs193204977	ND	D	D	DC	NA
66	EIEE	PTF1A	<i>de novo</i>	886C>T	R296*	S	ND	ND	ND	rs104894186	CM043069	NA	NA	DC	NA
15	E. Refract, RGD, TEA	SETDB1	CHET	3062C>T	A1021V	N	0,00849 (27 HOM)	0,00078 (46 HOM)	Si	rs150892641	ND	B	N	P	1
				3248A>C	H1083P	S	0,00004 (0 HOM)	0,000036 (0 HOM)	Si	rs200601732	ND	D	N	P	NA
27	EIEE, E.miocl.	TRAK2	<i>de novo</i>	361G>C	E121Q	S	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	DC	NA

P (pacient), Dx (diagnòstic), IS (espasmes infantils), TEA (trastorn de l'espectre autista), Sd (síndrome), RM (retard mental), E. Refract (epilèpsia refractària), RGD (retard generalitzat del desenvolupament), E. miclònic (epilèpsia miclònica) HOM (homozigot), CHET (heterozigot compost), C (conservació), S (si), N (no), BD (bases de dades), ND (no descrit), PP2 (Polyphen2), PV (Provean), D (*deleterious*), B (Benigna), N (neutral), MT (MutationTaster), DC (causant de malaltia), P (polimorfisme), HSF (*Human Splice Finder*), 1 (possible afectació de l'*splicing*), 2 (afectació de l'*splicing*), NA (no aplica)

mendelianes greus, és nul·la en tots els casos amb mutacions heterozigotes. En canvi, en aquelles mutacions de suposada herència recessiva, les freqüències en tots els casos són inferiors a 0,05, i amb el recompte d'homozigots negatiu, excepte en una de les dues variants en heterozigositat composta a *FMN1* i *SETDB1*, on se n'han detectat 4 i 46, respectivament. Tot i això, en el cas de *SETDB1*, la freqüència poblacional a la població europea és inferior a la general, i no s'ha descrit cap homozigot de forma específica en europeus.

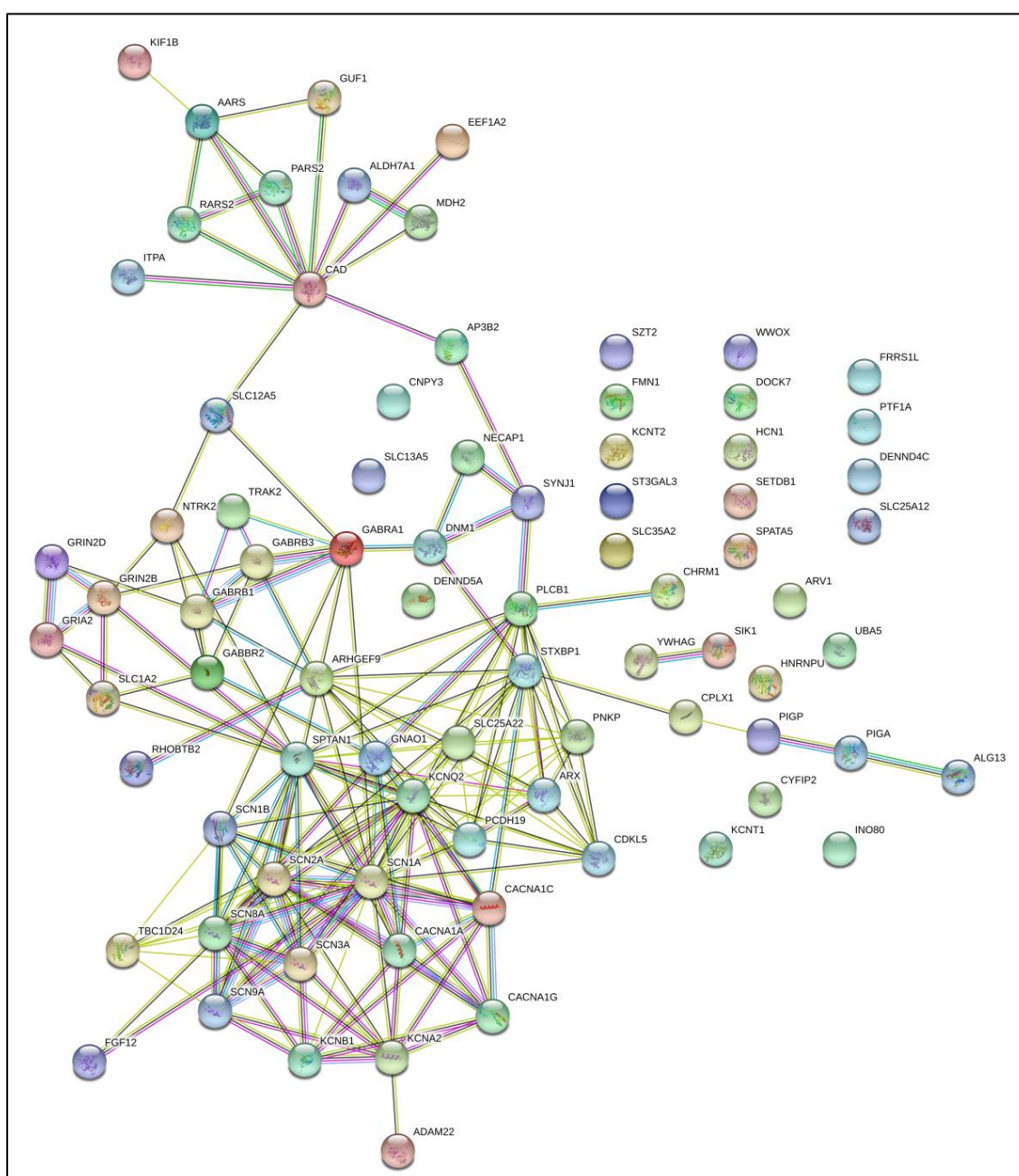


Figura 24 | Relació entre les proteïnes codificades per gens coneguts com a causants d'epilèpsia i els nous gens candidats.

Les bases de dades on es recullen les variants detectades en estudis de pacients també són indicadores de la contribució d'una mutació a un fenotip concret. En el cas dels gens afectats per mutacions *de novo*, tan sols la variant p.R296* (NP_835455) en el gen *PTF1A*, està prèviament descrita tant a la base de dades dbSNP com a HGMD, associada a agènesis pancreàtica i cerebelar en heterozigositat composta amb una segona mutació. El contrari passa amb les variants trobades en heterozigositat composta, on ambdues variants en els gens *FMN1* i *SETBD1* i la mutació p.K187R (NP_689481) a *PARS2* estan descrites a dbSNP, totes elles com a variants de significat incert a excepció de p.S37Y (NM_001096654) a *FMN1* que es classifica com a probablement benigna, malgrat que dos dels tres predictors utilitzats la considerin patològica.

Com a segona eina orientativa per a classificar aquests nous gens com a candidats d'interès s'utilitzen les relacions interproteiques reportades a la bibliografia entre els gens associats a EIEE i els gens portadors de variants potencialment patològiques (Figura 24). D'aquí s'extreu una relació directa entre les dues subunitats del canal de calci depenent de voltatge detectades a l'exoma (*CACNA1C* i *CACNA1G*) amb la subunitat 1 α del mateix canal (*CACNA1A*) i les diferents subunitats dels canals de sodi i potassi causants d'epilèpsia. El gen *PARS2*, prolina tRNA sintetasa, està directament relacionada amb altres tRNA sintetases (*RARS2* i *AARS2*) i amb el carbamoil fosfat sintetasa (*CAD*), que alhora estan relacionats entre ells. *AARS* també manté una connexió directa amb *KIF1B*, un membre de la família de les quinesines proposat com a nou gen candidat en aquest treball. Finalment, el receptor muscarínic d'acetilcolina *CHRM1* està relacionat amb la via de la fosfolipasa C beta 1 (*PLCB1*) i el gen *TRAK2*, membre de les proteïnes de tràfic mitjançant la unió amb les quinesines, s'associa als diferents receptors GABAèrgics.

Finalment, la funció de cada proteïna és rellevant per seleccionar un gen com a potencialment candidat a associar-se com a causa d'EIEE. En primer lloc, l'estudi d'enriquiment de processos biològics en què es veuen implicats els gens estudiats permeten relacionar l'epilèpsia amb les funcions biològiques rellevants que, al veure's alterades, donarien lloc al mecanisme que la desencadena (Figura 25). Al realitzar l'enriquiment afegint els nous gens candidats s'identifiquen diversos gens relacionats amb els processos implicats en les encefalopaties epilèptiques d'inici precoç (Taula 18) i addicionalment, es veuen enriquits dos processos més: la morfogènesi i projecció de les neurones on s'hi troben implicats *FMN1* i *TRAK2* i la generació i diferenciació neuronal amb representació de *PTF1A*, *FMN1* i *TRAK2*.

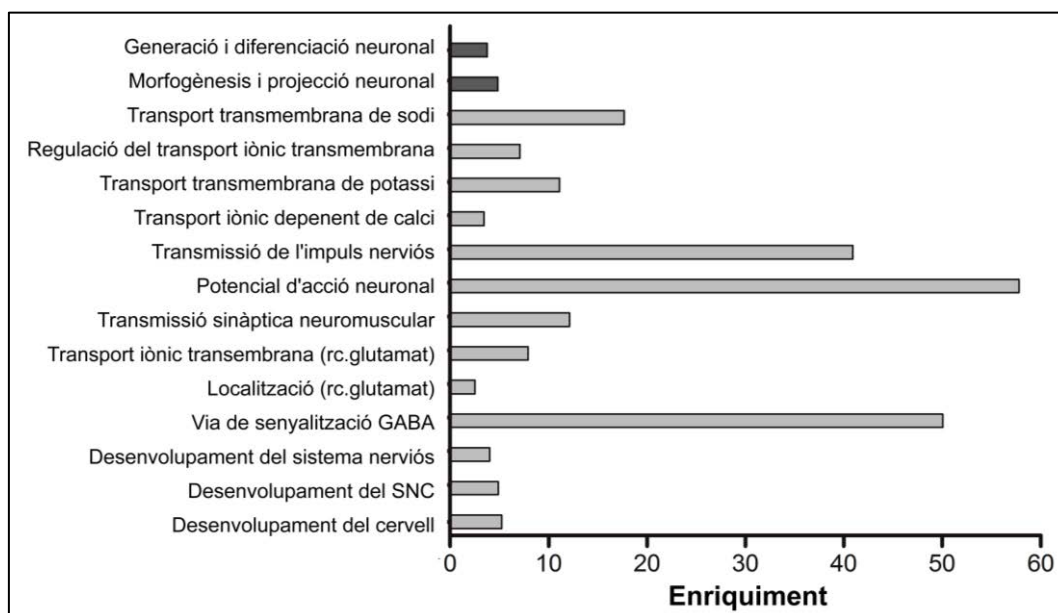


Figura 25 | Processos biològics enriquits entre els gens causants d'epilèpsia. Enriquiment entre els gens prèviament associats al fenotip epilèptic (gris clar) i afegint els nous gens proposats com a nous candidats. (Selecció de processos biològics enriquits amb p -valor superior a $1E-05$)

Dos dels gens proposats com a nous candidats, *INO80* i *SETDB1*, no resulten associats a les encefalopaties epilèptiques ni a través de les interconnexions amb proteïnes prèviament relacionades amb la malaltia ni a través de la implicació en processos biològics importants en el desenvolupament de la malaltia, tal com l'ontologia genètica els estableix. No obstant això, els dos gens estan implicats en el modelatge de la cromatina i, segons diferents treballs publicats prèviament *INO80* està implicat en la neurogènesi durant el desenvolupament del còrtex cerebral¹⁶⁹ i *SETDB1* té un paper regulador dels dominis de la cromatina en les neurones¹⁷⁰.

Els pacients portadors de variants en els gens considerats potencials candidats a explicar el fenotip amplien l'edat de debut més enllà dels 6 mesos, tot i que aquesta segueix sent l'edat que engloba la major part dels individus, coincidint a l'inici neonatal de les crisis els dos pacients amb variants a *CACNA1C* i *CACNA1G*. Els pacients amb variants al gen *FMN1* i *SETDB1* debuten als 9 mesos i als 12 respectivament. Les variants d'aquests tres gens, tal i com s'ha comentat anteriorment, presenten prediccions *in silico* de baixa patogenicitat, correlacionant amb l'evolució favorable d'ambdós individus a nivell clínic (Taula 6).

Taula 18 | Nous gens candidats implicats en els processos biològics enriquits entre els gens coneguts com a contribuïdors del fenotip epilèptic

Procés biològic	Gen
Desenvolupament del cervell	<i>PTF1A</i>
Desenvolupament del SNC	<i>CACNA1C, PTF1A, CHRM1, FMN1, TRAK2</i>
Desenvolupament del SN	<i>PTF1A, CHRM1, FMN1, TRAK2</i>
Via de senyalització GABA	Cap gen candidat associat
Localització (rc.glutamat)	<i>CACNA1C, CACNA1G, CHRM1, KIF1B, DENND4C</i>
Transport iònic TM (rc.glutamat)	<i>CACNA1C, CACNA1G, CHRM1, KIF1B, DENND4C</i>
Transmissió sinàptica NM	<i>CACNA1C, CACNA1G, CHRM1, KIF1B</i>
Potencial d'acció neuronal	<i>CACNA1C, CACNA1G, CHRM1</i>
Transmissió de l'impuls nerviós	Cap gen candidat associat
Transport iònic dependent de Ca ²⁺	<i>CACNA1C, CACNA1G, CHRM1</i>
Transport TM de K ⁺	Cap gen candidat associat
Regulació del transport iònic TM	<i>CACNA1C, CACNA1G, CHRM1</i>
Transport TM de Na ²⁺	<i>CACNA1C, CACNA1G</i>
Morfogènesis i projecció neuronal	<i>FMN1, TRAK2</i>
Generació i diferenciació neuronal	<i>PTF1A, FMN1, TRAK2</i>

SN (sistema nerviós), SNC (sistema nerviós central), rc (receptor), NM (neuromuscular), TM (transmembrana)

CAPÍTOL 2. ESTUDI DE LA CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP EN GENS PÈVIAMENT ASSOCIATS A LES EIEE

L'estudi NGS dels diferents pacients descrits en el capítol anterior han donat com a resultat noves característiques fenotípiques per a diferents gens que poden permetre l'ampliació de l'espectre clínic associat a aquests gens. A més, estudis funcionals desenvolupats en col·laboració amb grups de recerca experts en el camp, han ajudat a entendre els mecanismes per als quals les mutacions trobades en els pacients d'aquest estudi desemboquen a alteracions que tenen com a conseqüència les EIEE.

2.1. Estudi computacional de l'estructura de GNAO1

Mutacions heterozigotes en el gen *GNAO1* s'han descrit en pacients amb discinèsia prominent i discapacitat intel·lectual amb poques crisis epilèptiques, que afecten majoritàriament dones. El cas estudiat en aquest projecte es tracta d'una nena de 21 mesos d'edat amb encefalopatia severa i crisis epilèptiques neonatals a partir del tercer dia de vida. Presenta atròfia cerebral, cos callós prim i retard en la mielinització (Figura 26), poc creixement del cap, trets dismòrfics, alteració en la fixació visual, disminució del to muscular i reducció de moviment espontanis.

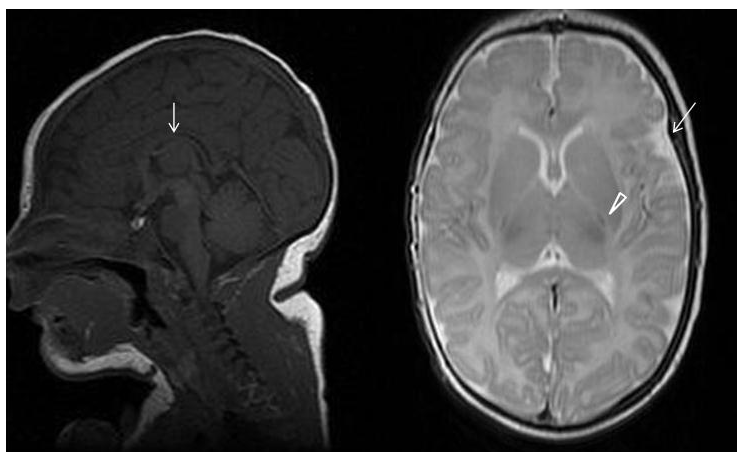


Figura 26 | IRM del cervell a l'edat de 18 dies. Al tall sagital (esquerra) s'observa el cos callós prim (fletxa) amb una subtil reducció del volum del lòbul frontal. Al tall axial (dreta) es detecta un enxamplament asimètric dels espais temporals subaracnoidals (fletxa) i un retard en la mielinització a l'extrem posterior de la càpsula interna (punta de fletxa) i al cos callós.

El resultat de l'exoma ha detectat la variant *de novo* c.596 T>C (NM_020988.2) que produeix el canvi d'aminoàcid p.L199P (NP_066268.1) al gen *GNAO1*, validat per

seqüenciació Sanger (Figura 27A). Aquesta variant no es troba descrita en bases de dades de població general (1000G, ExAC i gnomAD) ni en bases de dades de pacients (CentoMD). A nivell de predicció *in silico*, la Leucina 199 és un residu altament conservat a través de l'evolució (Figura 27B), i el canvi a Prolina es descriu com a patogènic a SIFT, PolyPhen-2 i MutationTaster.

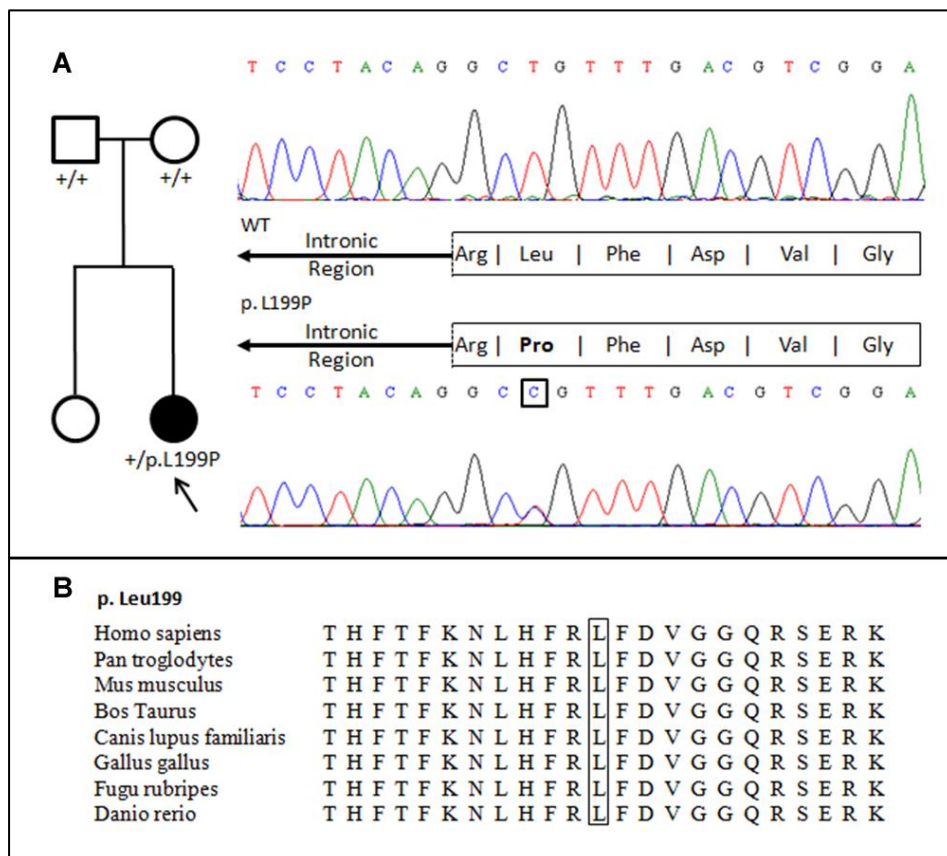


Figura 27 | Genètica de la variant p.L199P a GNAO1. A, Arbre genealògic (esquerra) de la pacient afecta, portadora de la variant *de novo* i els seus pares i la seva germana sans. Validació per PCR i seqüenciació Sanger de la variant en la pacient i la segregació amb els pares. L'electroferograma mostra la seqüència *wildtype* dels progenitors (superior) i la variant c.596 T>C (NM_020988.2) en el proband (inferior), que dona lloc al canvi proteic p.LEu199Pro (NP_066268.1). B, Aliniament múltiple de seqüència de la regió que conté la Leu199 de GNAO1, mostrant la conservació al llarg de l'evolució del residu afectat.

Per a estudiar l'efecte de la variant detectada sobre la proteïna final, es van realitzar estudis estructurals computacionals a partir de l'estructura cristal·litzada de Gao de ratolí (PDB id: 3C7K) mitjançant MODELLER¹⁷¹, en col·laboració amb el laboratori de Neurofarmacologia Molecular i Bioinformàtica de l'Institut de Neurociències i la Unitat de Bioestadística de la Universitat Autònoma de Barcelona. La mutació Leu199Pro va ser introduïda al model mitjançant el *software* CHIMERA¹⁷², situant-se al domini GTPasa de Gao. Concretament, la modificació se situa a l'interior de la làmina β que

es troba entre els extrems N- i C- terminals, i que interacciona amb les hèlix α adjacents. Tot i això, tenint en compte el model d'homologia de la proteïna (Figura 28A), la Leucina 199 no està implicada en la unió de GDP/GTP, per tant, la modificació a Prolina no estaria afectant la unió o hidròlisi del lligand de forma directa.

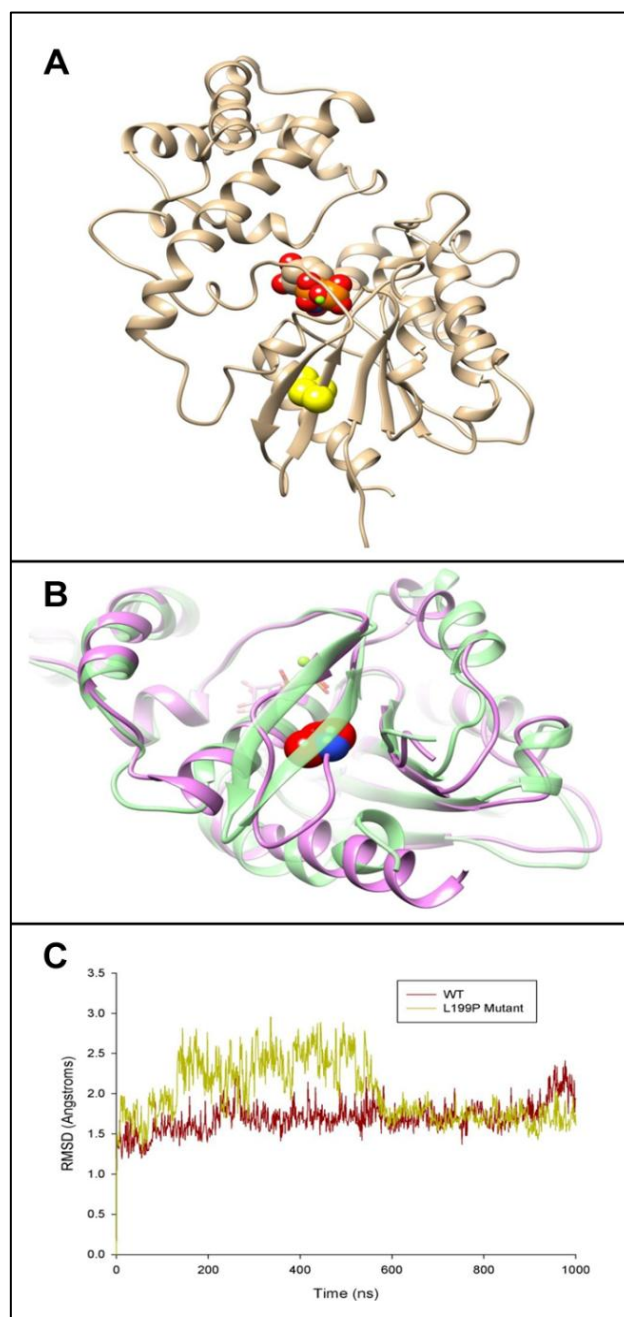


Figura 28 | Anàlisi de l'estructura proteica de GNAO1. A, Model d'homologia de la forma *wildtype* humana de GNAO1, on el residu Leu199 està representat en groc, l'estructura secundària en beig, les molècules GDP en vermell/taronja i el magnesi en verd. B, Domini GTPasa del mutant Leu199Pro de GNAO1 (en rosa) en comparació amb el WT (en verd) després d'1 μ seg d'estimulació MD (en vermell es mostra la posició de la mutació). C, Comparació del registre RMSD entre les estructures inicials de GNAO1 WT i P380L després d'1 μ seg d'estimulació MD.

Per altra banda, la comparació entre les formes *wildtype* i mutant de GNAO1, s'ha realitzat mitjançant el programa ROSETTA¹⁷³, per tal de calcular la càrrega d'energia lliure (ddG) de la mutació. La posterior conversió de les unitats d'energia Rosetta a Kcal/mol, a través d'un factor de conversió de 0,73, prediu una energia lliure per a la variant Leu199Pro de +6.1kcal/mol, suggerint un efecte desestabilitzador que podria alterar el plegament normal de GNAO1. Per a comprovar aquesta potencial alteració ambdós models es van estimular molecularment durant 1 µsegon utilitzant el programa ACEMD¹⁷⁴. Els resultats de l'estimulació mostren que, mentre la proteïna WT manté una estabilitat, tant en les estructures secundària com en la terciària, amb unes RMSD que fluctuen entre 1 i 2 Amstrongs, el mutant L199P genera un canvi estructural rellevant en el domini GTPasa. Aquesta modificació dona lloc a l'aparició de múltiples ponts d'hidrogen que trenquen la làmina β central i la pèrdua de la integritat estructural de les hèlixs α 208-2017 i 257-262 (Figura 28B), generant una gran regió de *loop* flexible que permet una major fluctuació posicional amb una RMSD entre 1,5 i 3 Amstrong durant l'estimulació (Figura 28C). Aquests resultats es troben publicats al *Orphanet Journal of Rare Diseases* a l'article Marcé-Grau et al, 2016¹⁷⁵, adjunt en aquest treball a l'Annex I.

2.2. Estudis electrofisiològics per a KCNQ2

El gen codificant per a canals de potassi Kv7 d'activació lenta es troba mutat en diversos pacients estudiats en aquest estudi (7/80; 8,75%), però, tal com s'ha introduït al capítol 1, tot i compartir el gen afectat, existeixen diferències significatives de fenotip entre alguns d'aquests pacients. Juntament amb el grup del Biofísica Institutua, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC, UPC/EHU del País Basc, s'ha estudiat a nivell funcional tres de les mutacions que afecten els pacients descrits en aquest treball: les variants *de novo* E130K (c.388G>A), W270R (c.808A>G) i G281R (c.841G>C) i la variant heterozigota d'herència materna L243F (c.727C>T) que afecta a un pacient diagnosticat a través de seqüenciació directa de *KCNQ2*, el qual presenta història familiar d'epilepsia benigna neonatal (Figura 29A). Aquest treball ha resultat en un article en procés de segona revisió a *Epilepsia*, Gomis-Perez C et al, adjunt a l'Annex II d'aquesta tesi.

2.2.1. Caracterització fenotípica i genètica de cada pacient estudiat

La descripció dels pacients es troba al manuscrit a l'annex II, però de forma general, tots ells pateixen crisis epilèptiques, principalment tòniques amb trets autonòmics,

entre el primer i quart dia de vida. L'EEG inicial dels pacients amb les mutacions *de novo* mostra activitat epileptiforme multifocal amb atenuacions i traçat de fons anormal, en canvi, el pacient amb la mutació familiar presenta un EEG normal amb anomalies epileptiformes transitòries. La freqüència de les crisis va desaparèixer durant els primers mesos de vida, a excepció del pacient amb la mutació G281R que va morir als 14 mesos de vida.

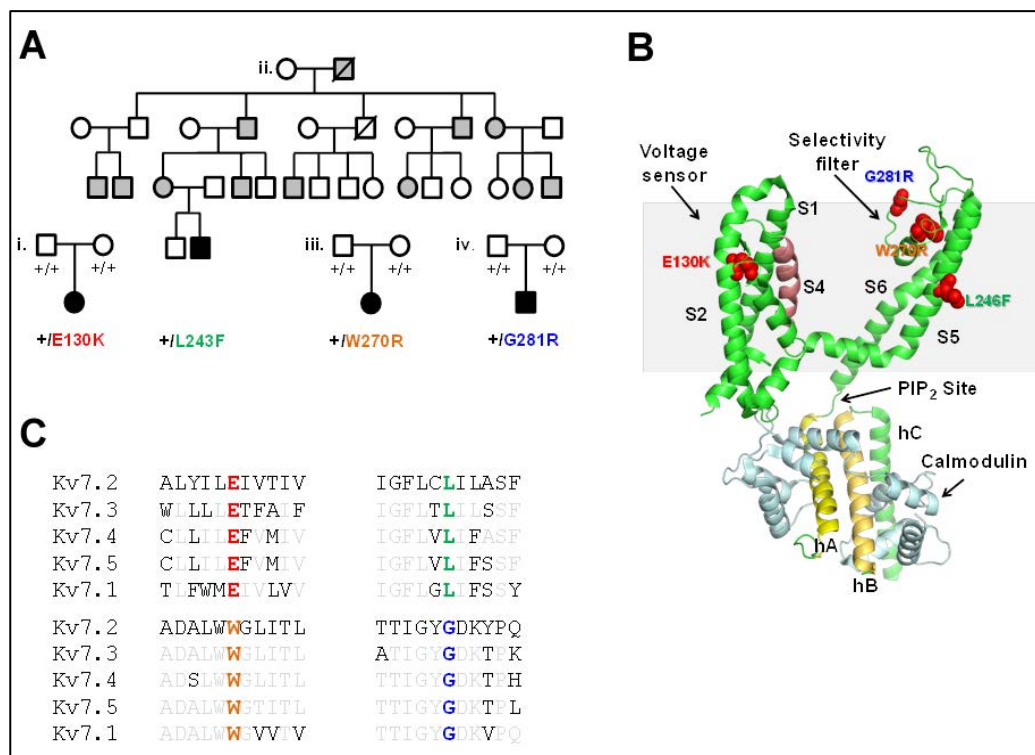


Figura 29 | Característiques genètiques de les variants de *KCNQ2* estudiades. A, Arbres genealògics dels pacients, on s'indica individus afectes per crisis neonatals (símbols grisos) i per EIEE (símbols negres). B, Estructura 3D de la proteïna Kv7.1 on s'indica a localització de les diferents mutacions associades a les EIEE estudiades (regions vermelles). La caixa grisa indica l'espai corresponent a la membrana plasmàtica. C, Alineament múltiple de seqüència de les regions adjacents als aminoàcids modificats, indicant la conservació dels residus Glu130, Leu243, Trp280 i Gly281

Les quatre variants detectades afecten residus distribuïts pels diferents dominis de la proteïna (Figura 29B). La Glutamina 130 se situa a la segona regió transmembrana, la Leucina 243 al cinquè domini transmembrana i al segment formador del por del canal s'hi localitzen el Triptòfan 270 i la Glicina 281. Tots aquests canvis es troben conservats entre les diferents proteïnes de la família dels canals de potassi Kv7 (Figura 29C), i els predictors *in silico* Mutation Taster, Sift-Provean i Polyphen-2 les classifiquen com a variants patògeniques o causants de malaltia. Cap de les variants

trobades està descrita en les bases de dades de població general sana (1000G, ExAC i gnomAD), i només les variants L243F i E130K s'han descrit a la base de dades de pacients ClinVar associades a crisis epilèptiques neonatals benignes tipus 1 (BFNS1; L243F; rs118192205) i a encefalopatia epilèptica d'inici precoç tipus 7 (EIEE7; E130K; rs864321710).

2.2.2 Caracterització funcional de la subunitat Kv7.2 portadora de les diferents mutacions

Per tal d'estudiar les conseqüències de les quatre mutacions trobades en els diferents pacients sobre la funció del canal de potassi s'ha utilitzat el registre de cèl·lula sencera amb la tècnica *patch-clamp*, a Biofísica Istitutua. Per a tal configuració es van utilitzar cèl·lules HEK293T transfectades únicament amb cDNA codificants per les subunitats mutades de Kv7.2 o en combinació amb subunitats Kv7.2 o Kv7.3 *wildtype* (wt). La descripció de la metodologia utilitzada per a l'estudi funcional es troba detallada a l'Annex II.

L'anàlisi dels corrents, tant el patró com les densitats (Figura 30), mostren una supressió total del corrent en les cèl·lules que expressen el canal amb les mutacions E130K, W270R i G281R de forma homomèrica en comparació amb l'homòmer Kv7.2 *wildtype* (Figura 30A). En canvi, en les cèl·lules que expressen la subunitat mutada per L243F generen corrents residuals. Alhora, per les cèl·lules transfectades amb homòmers s'ha realitzat l'estudi d'expressió proteica per *Western Blot* on es detecta una reducció dels nivells de proteïna únicament per als mutants L243F i G281R respecte a l'homòmer Kv7.2 wt. L'estudi en cèl·lules amb co-expressió del canal mutant amb el wt, mostra una reducció de la densitat de corrent en els mutants E130K i G281R, donant lloc a un comportament dominant negatiu de la variant sobre la subunitat wt (Figura 30B).

El canal de potassi Kv7.2 interacciona de forma fisiològica amb el canal Kv7.3, per aquesta raó també s'interroga a capacitat de rescatar la corrent en els mutants al co-expressar les subunitats Kv7.2 mutades amb Kv7.3 wt. Els resultats demostren un augment de la densitat de corrent en la co-expressió de les dues subunitats Kv7.2 i Kv7.3 *wildtype* de quasi el doble que en l'expressió de l'homòmer (Figura 30C). En aquest cas, la subunitat Kv7.3 es incapaç de recuperar la corrent en els mutants G281R, però sí que ho fa de forma significativa en un 40% en els mutants W270R i L243F i en un 60% en la co-expressió amb el mutant E130K. Finalment, per mimetitzar la situació fisiològica d'aquests canals, es realitza l'estudi co-expressant la subunitat

Kv7.2wt, Kv7.2mutant i Kv7.3 wt en una proporció 0,5:0,5:1, respectivament (Figura 30D). No s'observen diferències entre les combinacions amb subunitats mutades i l'heteròmer *wildtype* en relació a densitat de corrents.

Altres assaigs per a determinar la dependència dels corrents al voltatge i al missatger secundari intracel·lular PIP2 no s'observen diferències significatives, a excepció d'algunes condicions on sí que es veu parcialment compromesa la funcionalitat dels complexos amb Kv7.2 W270R (Annex II).

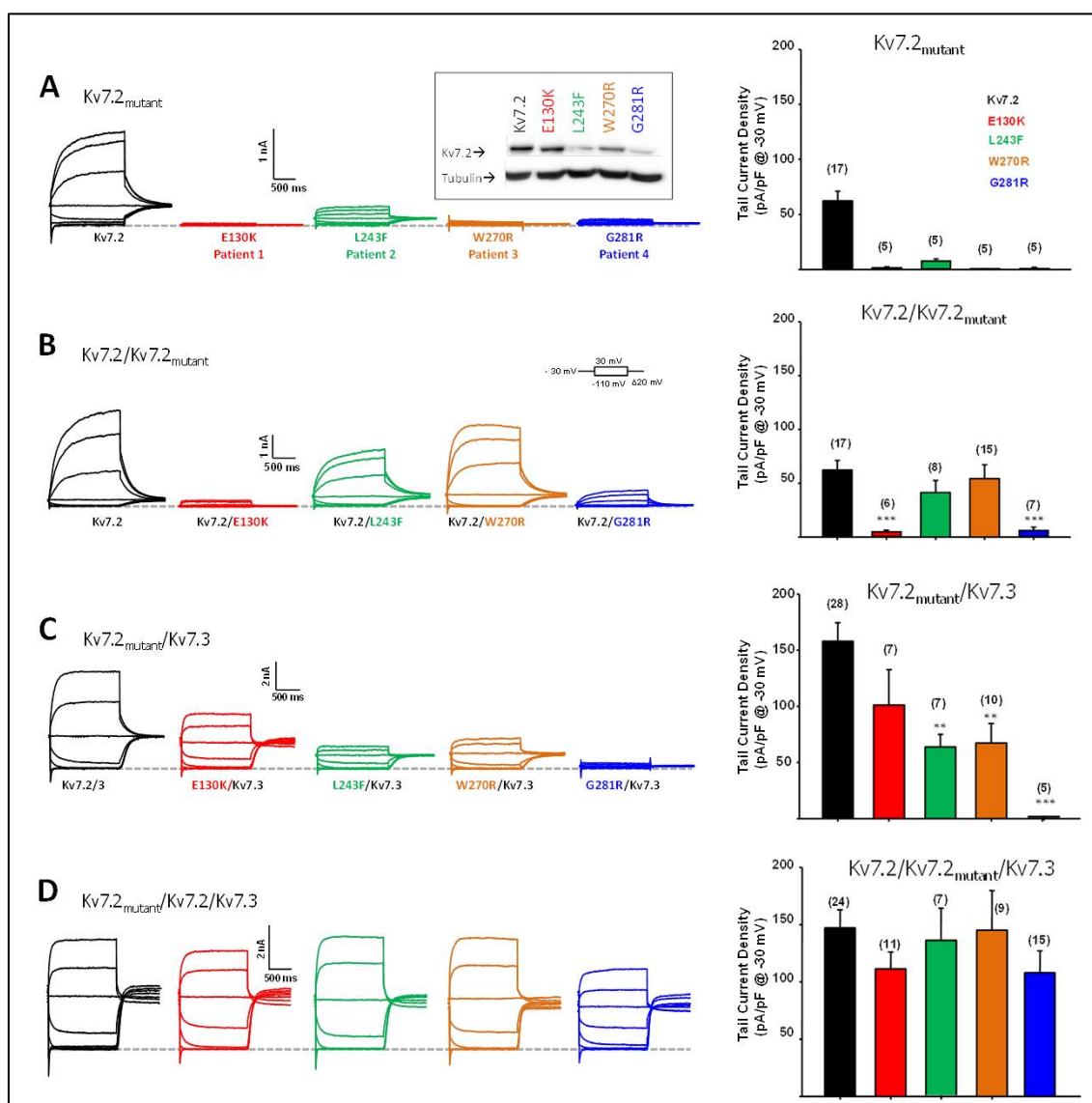


Figura 30 | Conseqüències funcionals de les mutacions en diferents configuracions. A l'esquerra es representen les línies de la corrent mesurades com a resposta de l'aplicació del protocol de voltatge en les cèl·lules que expressen les diferents subunitats. A la dreta, les quantificacions de les densitats de corrent mesurades a -30mV. A, Configuració homomèrica. B, coexpressió amb Kv7.2 *wildtype*. C, coexpressió amb Kv7.3 i D, coexpressió amb Kv7.2 i Kv7.3 *wildtypes* en una ratio Kv7.2(wt)/Kv7.2(mt)/Kv7.3 de 0.5:0.5:1.0 per a mimetitzar el balanç genètic.

CAPÍTOL 3. LA SOBREXPRESSIÓ DE RNA EN PEIX ZEBRA COM A MODEL *IN VIVO* PER A LES EIEE

Els resultats de l'estudi WES de pacients afectes per encefalopatia epilèptica d'inici precoç mostren un grup de gens no descrits fins al moment associats a EIEE, però que tant per les seves característiques genètiques com fisiològiques, podrien estar implicats en l'alteració de mecanismes que desencadenessin el fenotip. La necessitat d'establir un cribratge per a determinar-ne la potencial patogenicitat de forma ràpida porta al desenvolupament del model de sobreexpressió transitòria de RNA en peix zebra.

3.1. Estudi del fenotip epilèptic en peix zebra per modulació farmacològica de canals de potassi

Els membres 2 i 3 de la superfamília Q de canals de potassi dependents de voltatge regulen els corrents M del sistema nerviós, el qual és responsable de bloquejar la hiperexcitabilitat de les neurones després d'un potencial d'acció despolaritzant.

Els peixos zebra contenen en el seu genoma varies còpies de diferents canals de potassi Kv7 (Figures 33 i 34), per tant, és d'esperar que els fàrmacs que modulen l'activitat d'aquests canals en humans actuïn també en el cas dels peixos¹⁷⁶. Els resultats dels estudis de comportament en models animals poden ser bastant variables en funció de les condicions ambientals¹⁷⁷, per aquesta raó el nostre objectiu és determinar com els peixos en el nostre estudi es comporten de forma normal i com esperem que es comportin en cas d'inducció d'epilèpsia. Per a tal fi, hem realitzat un estudi d'inducció o inhibició dels canals de potassi relacionats directament com a causa d'epilèpsia en humans¹⁷⁸ amb retigabina (RTG) i linopiridina (LPD).

Quan les larves són tractades amb retigabina 100µM, l'inductor dels canals de potassi, en comparació amb el gru control, les larves queden immediatament en un estat permanent de latència sense moviment. Per altra banda, quan es tracta amb linopiridina 100µM, l'inhibidor dels canals, durant els dos primers intervals de temps corresponents als primers quatre minuts de registre, les larves presenten un estat de sobreexcitació transformat a un increment substancial en el nivell d'activitat natatòria (distància recorreguda en un interval de temps determinat) en comparació amb el grup control. Tot i això, degut a l'alta toxicitat d'aquest fàrmac, després de poc temps d'estar

exposats al medi amb LPD el moviment disminueix progressivament degut a la mortalitat de les larves. Finalment, la combinació dels dos fàrmacs simultàniament anul·la l'acció de LPD, ja que els peixos queden en un estat de latència equivalent al patró del grup tractat amb RTG (Figura 31).

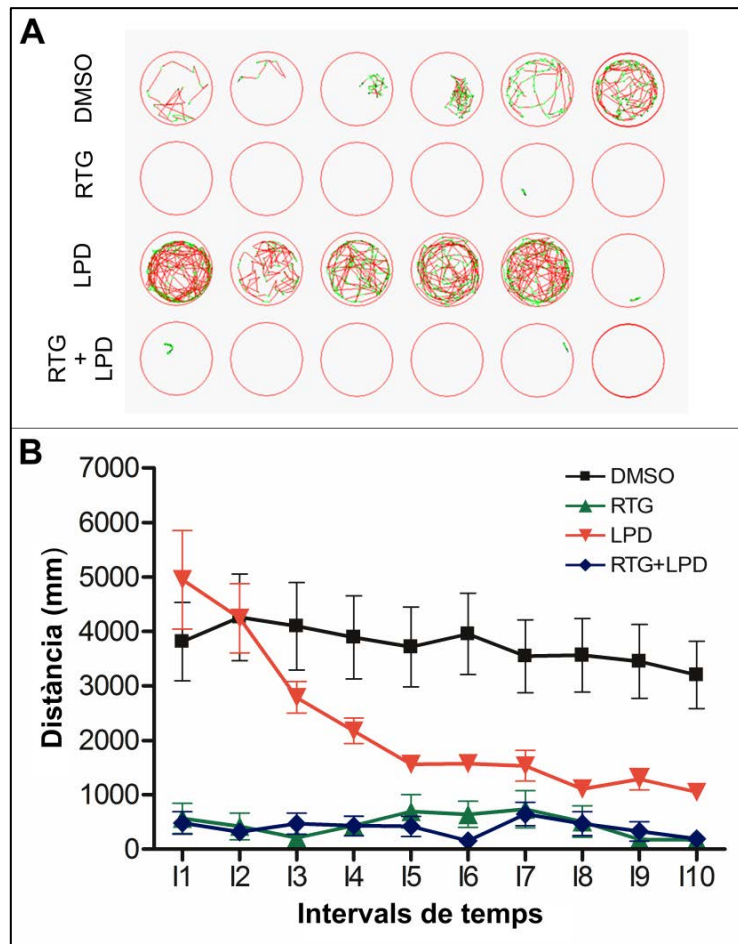


Figura 31 | Registes del comportament en resposta al tractament amb un agonista del canal KCNQ2, retigabina (RTB), amb un antagonista, linopiridina (LPD), amb la combinació dels dos (RTG+LPD) i amb DMSO com a control. A, Representació del patró de natació de les larves durant 20 minuts. B, Distància recorreguda (en mm) per cada grup en cada interval de 2 minuts.

3.2. Sobreexpressió del RNA humà en peix zebra

3.2.1. Canals de potassi Kv7.2 i Kv7.3

Per a posar a punt la tècnica per sobreexpressió de RNA *wildtype* i mutant per a estudiar l'efecte sobre el comportament de les larves de peix zebra, s'ha utilitzat els canals de potassi KCNQ2 (*wildtype* i S53E) i KCNQ3 (*wildtype* i G382S), prèviament descrits com a associats i causants d'epilèpsia neonatal.

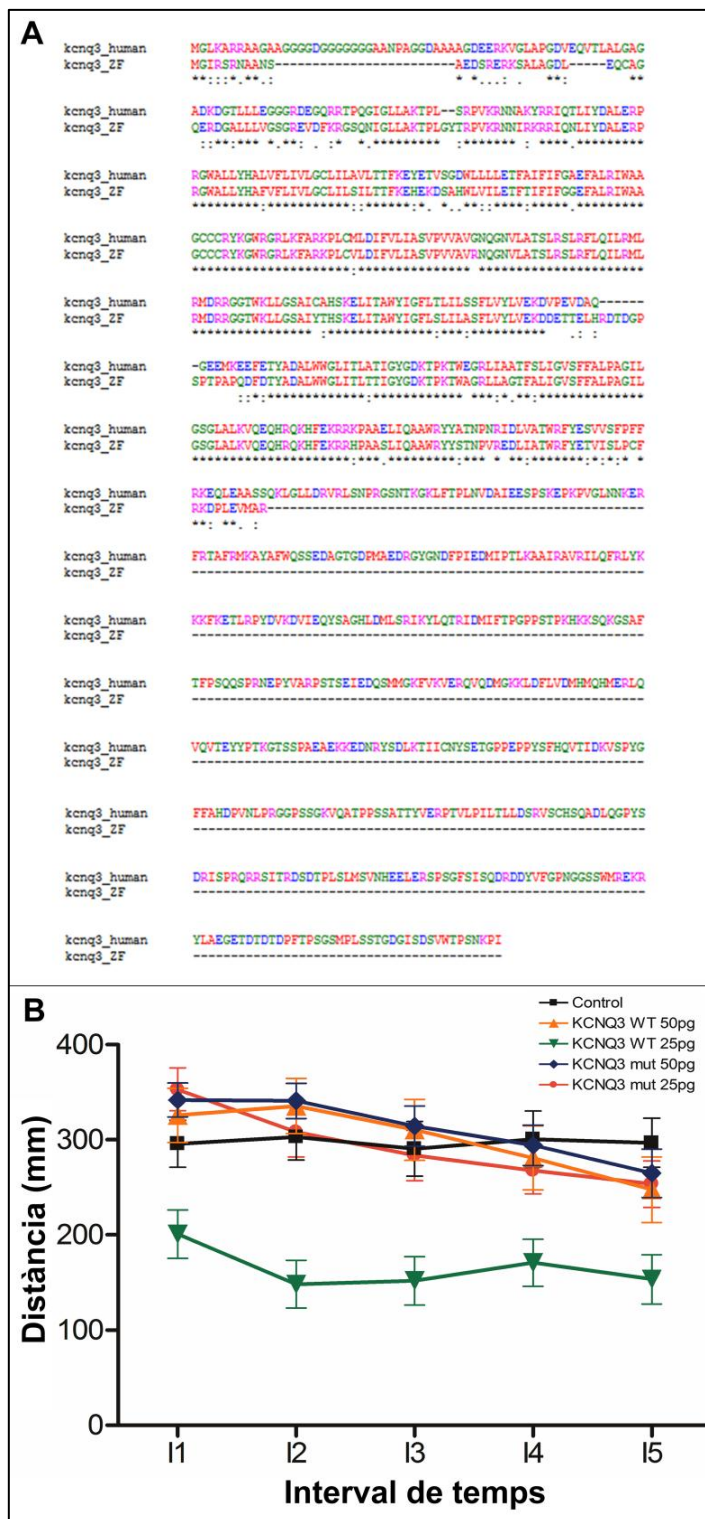


Figura 32 | Registes del comportament de les larves injectades amb cRNA de *KCNQ3 wildtype* o mutant (G382S). A, Alineament entre la seqüència de *KCNQ3* de peix zebra (*kcnq3_ZF*) i humana (*kcnq3_human*). B, Distància recorreguda (en mm) per cada grup en cada interval de 2 minuts.

Prèviament a estudiar els diferents gens i les seves mutacions, s'ha realitzat una cerca en bases de dades per a determinar les característiques dels gens d'interès en el peix zebra. Tal com es reporta a la literatura, el peix zebra va patir una duplicació genòmica, fet que resulta en què molts dels ortòlegs dels gens humans estiguin duplicats¹⁷⁹. Aquest és el cas de *KCNQ2*, el qual en peixos es presenta duplicat com a *kcnq2a* i *kcnq2b*. Tot i això, el *kcnq2a* presenta una major similitud amb el gen humà que el *kcnq22* (Figura 33A). No obstant això, el cas del gen *KCNQ3* és diferent, ja que només presenta una única còpia tant en humà com en peix zebra, tot i ser aquesta última més curta (Figura 32A).

En primer lloc, per tal d'intentar reproduir els resultats de comportament observats com a resposta del tractament amb fàrmacs activadors i inhibidors dels canals de potassi Kv7, es va dur a terme la microinjecció en ous de peix zebra fertilitzats, del cRNA humà de *KCNQ3 wildtype* i mutant G382S a dues concentracions diferents en ambdós casos: 25pg i 50pg. Vint-i-quatre larves de cada grup (control no injectat i els quatre grups injectats) van ser registrades amb el ZebraBox durant 10 minuts, en intervals de 2 minuts, i finalment la mitja de cada grup va ser calculada (Figura 32B). Tot i que les larves injectades amb 25pg de cRNA *wildtype* mostren una activitat motora més reduïda que el grup control, cosa que podria correlacionar amb una sobreactivació de la via equivalent al tractament amb RTG, el grup injectat amb 50pg de cRNA *wildtype* presenta un patró sense diferències significatives en comparació amb el grup control. Els grups injectats amb qualsevol de les dues concentracions de cRNA mutant tampoc presenten diferències entre elles ni en comparació amb el control o el grup *wildtype* 50pg.

El gen *KCNQ3* ha estat descrit, especialment, com a causa d'epilèpsies familiars neonatals benignes (BFNS), cosa que fa pensar que potser no és suficientment greu com per a causar l'efecte esperat en les larves de peix. Per aquesta raó, es repeteix l'experiment microinjectant cRNA humà de *KCNQ2*, el qual és causa reportada de BFNS però també d'encefalopaties epilèptiques d'inici precoç. En primer lloc es va injectar cRNA *wildtype* i mutant S52E a 25pg i 50pg en ambdós casos. Igual que passava amb *KCNQ3* es van distribuir en els mateixos cinc grups, col·locant 24 larves per grup. El registre va ser de 10 minuts, en intervals de 2 minuts. (Figura 33B). Els resultats mostren un increment inicial en l'activitat de les larves injectades amb el cRNA *wildtype* a major concentració, amb un posterior declivi del moviment, cosa que seria contrària a la que esperaríem segons els experiments amb els fàrmacs. Tot i això, no s'observen diferències significatives entre els diferents grups.

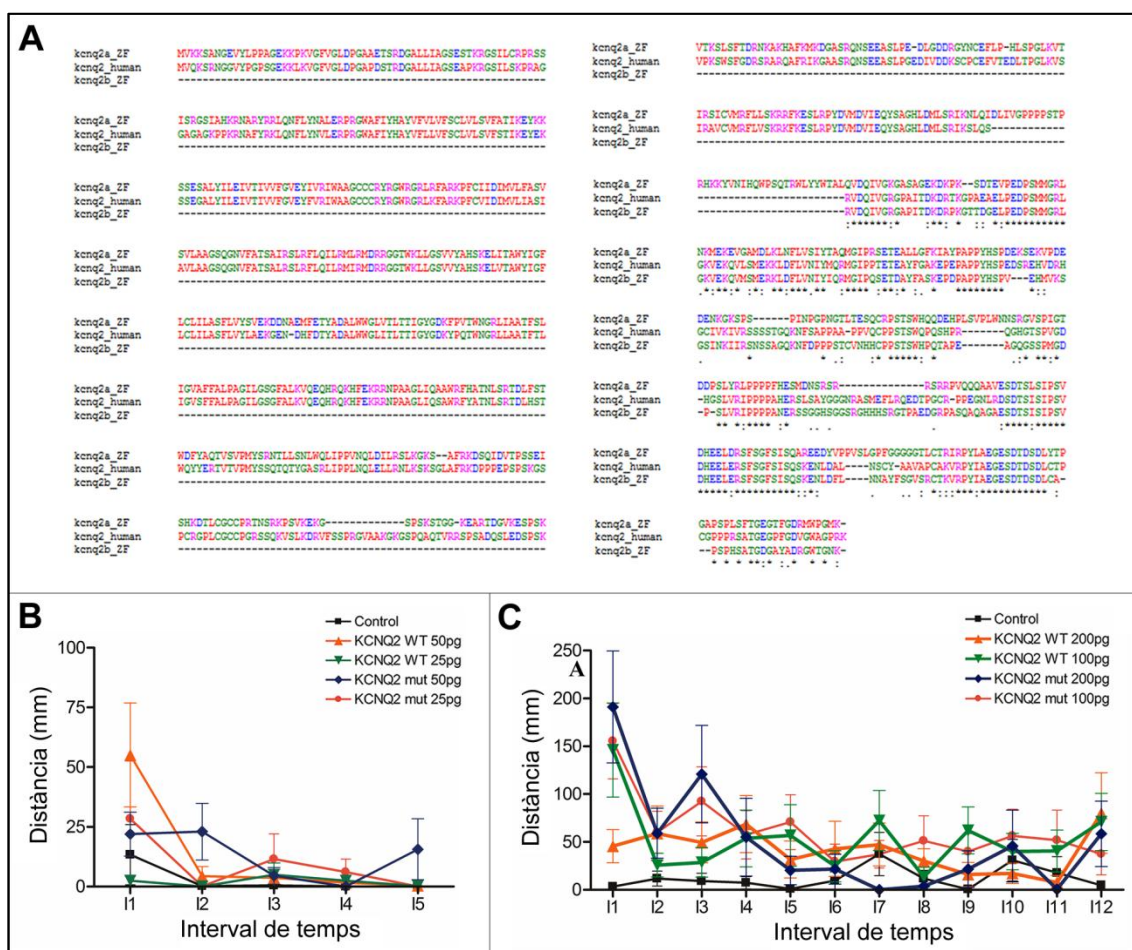


Figura 33 | Registres del comportament de les larves injectades amb cRNA de *KCNQ2 wildtype* o mutant (S52E). A, Alineament entre les dues isoformes de *KCNQ2* de peix zebra (*kcnq2a_ZF* i *kcnq2b_ZF*) i humà (*kcnq2_human*). B, Distància recorreguda (en mm) per cada grup en cada interval de 2 minuts. C, Distància recorreguda (en mm) per cada grup en cada interval de 2.5 minuts.

Per a comprovar que els resultats no estaven subjectes a un problema amb la concentració de cRNA injectada, es va repetir l'experiment injectant els dos cRNA humans de *KCNQ2*, però a major concentració: 100pg i 200pg cada un. En aquest cas, hi va haver una mortalitat major de l'esperada segons experiments anteriors en el grup d'injectats amb el cRNA mutant a 200pg. En aquest cas, els grups van estar formats per 23 larves, a excepció del grup esmentat que conté únicament 14 individus. En aquest experiment, el registre es va dur a terme durant 60 minuts, registrant cada 5 minuts (Figura 33C), per tal de detectar qualsevol diferència apreciable. Tot i això, els resultats no mostren cap diferència significativa entre grups, indicant que la sobreexpressió de cRNA de *KCNQ2* humà no té efectes en peix zebra.

3.2.2. Receptor muscarínic d'acetilcolina tipus 1 (CHRM1)

El mateix experiment es va dur a terme amb cRNA de *CHRM1 wildtype* i mutant (P380L) per a provar el mètode amb un gen que, en aquest treball, es postula com a potencial causant d'EIEE (Capítol 4).

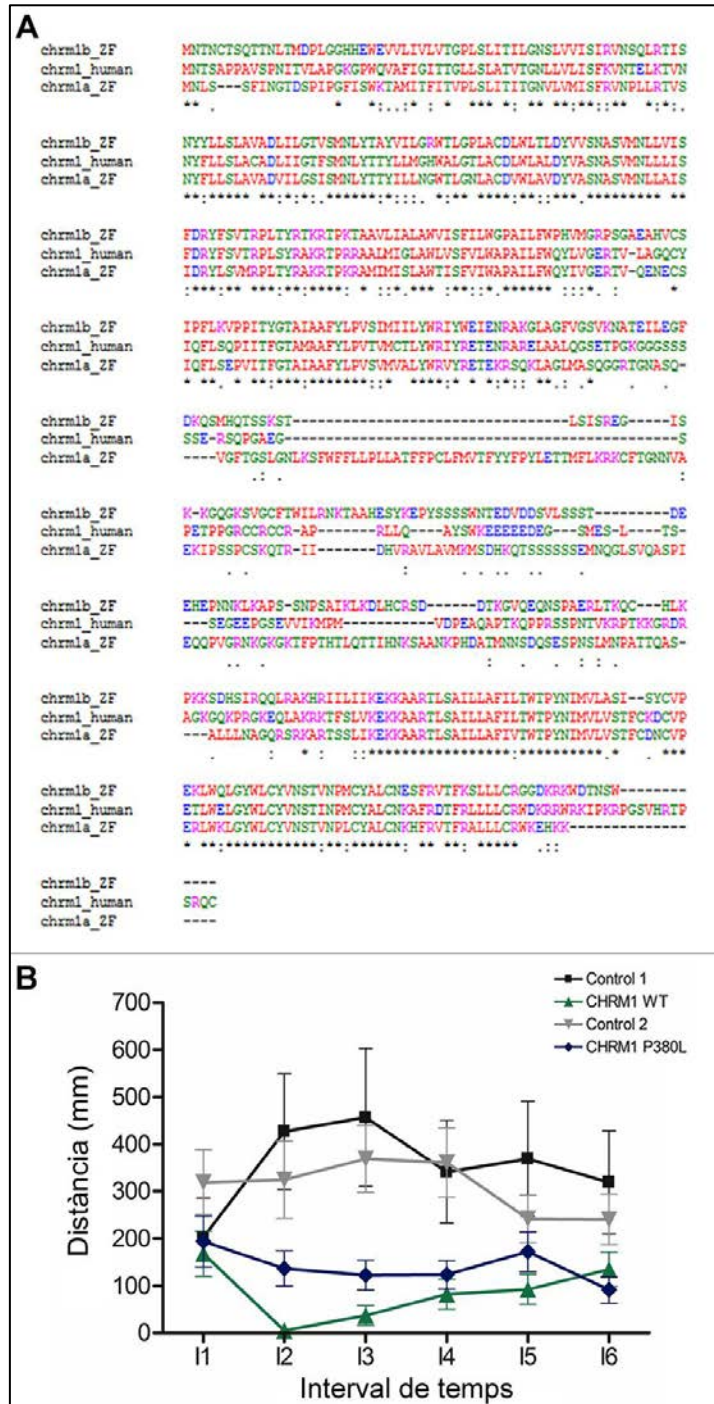


Figura 34 | Registes del comportament de les larves injectades amb cRNA de *CHRM1 wildtype* o mutant (P380L). A, Alineament entre les dues isoformes de *CHRM1* presents al peix zebra (*chrml1a_ZF* i *chrml1b_ZF*) i la forma única de l'humà (*chrml1_human*). B, Distància recorreguda (en mm) per cada grup en intervals de 2,5 minuts.

El gen del receptor muscarínic d'acetilcolina M1, tal com passava amb el *KCNQ2*, es troba duplicat en peix zebra. Mentre que en humans és un gen únic (*CHRM1*), el peix presenta les còpies *chrm1a* i *chrm1b*, de les quals la primera resulta ser més similar a *hCHRM1*, ja que la forma b és més curta (Figura 34A).

Per a estudiar aquest receptor muscarínic d'acetilcolina, les concentracions injectades van ser 100pg i 200pg de cada cRNA, tot i que un nombre molt elevat d'embrions injectats amb ambdós cRNAs a 200pg van ser inviables, havent d'eliminar els dos grups de l'estudi. Degut als problemes derivats de les injeccions, en aquest cas es van establir dos grups control no injectats, provinents dels diferents creuaments utilitzats per a injectar els dos grups de cRNAs. D'aquesta manera, 23 larves van formar cada un dels quatre grups (dos controls no injectats, *wildtype* 100pg i P380L 100pg), les quals van ser registrades individualment durant 30 minuts en intervals de 5 minuts (Figura 34B). Els resultat mostren una petita diferència entre els dos grups d'injectats, especialment al segon interval, però en cap cas resulta indicativa de cap efecte, ja que en comparar amb els grups control les diferències no són significatives ni informatives d'una alteració en el comportament entre el *wildtype* i el mutant. A més, en aquest cas també s'ha estudiat la distància segons el nivell d'activitat de les larves (dades no mostrades). D'aquesta informació tampoc se'n pot extreure cap diferència significativa entre grups.

CAPÍTOL 4. EL RECEPTOR MUSCARÍNIC D'ACETILCOLINA TIPUS 1 COM A GEN CAUSAL D'ENCEFALOPATIA EPILÈPTICA D'INICI PRECOÇ

4.1. Característiques genètiques de la variant p.Pro380Leu en *CHRM1*

L'estudi complet de l'exoma d'una pacient de 6 anys afecta d'EIEE ha detectat la mutació *de novo* c.1139C>T (NM_000738.2) que produeix el canvi p.Pro380Leu (NP_000729) al receptor muscarínic d'acetilcolina tipus I (*CHRM1*) (Figura 35).

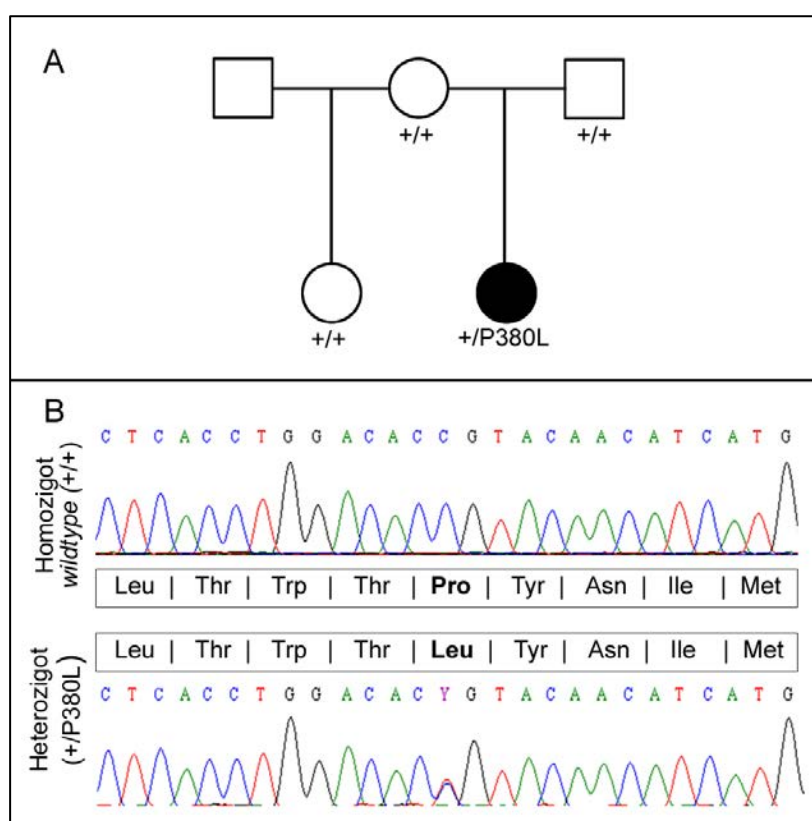


Figura 35 | Característiques genètiques del cas estudiat. A, Arbre genealògic de la família de la pacient afectada per la mutació p.P380L en heterozigosi a *CHRM1* *de novo*; B, Electroferograma resultant de la seqüenciació Sanger per a validar la variant en la pacient i la segregació en els familiars.

El receptor d'acetilcolina tipus I és un receptor acoblat a proteïna G i consisteix de 7 hèlices transmembrana, una regió N-terminal extracel·lular i una cua C-terminal citoplasmàtica. La Prolina 380 forma un colze dins el segment transmembrana 6 (Figura 36A), i es tracta d'una posició altament conservada al llarg de l'evolució entre espècies (Figura 36B), i també entre els diferents membres de la família de receptors muscarínics d'acetilcolina (Figura 36C). La variant P380L no ha estat reportada

prèviament en població general no afecta de malalties mendelianes (ExAC o gnomAD), ni tampoc en bases de dades específiques de malaltia (ClinVar, HGMD o CentoMD). Finalment, els predictors *in silico* consultats classifiquen aquesta variant com a potencialment patogènica (Polyphen-2 o Sift-Provean) o causant de malaltia (MutationTaster).

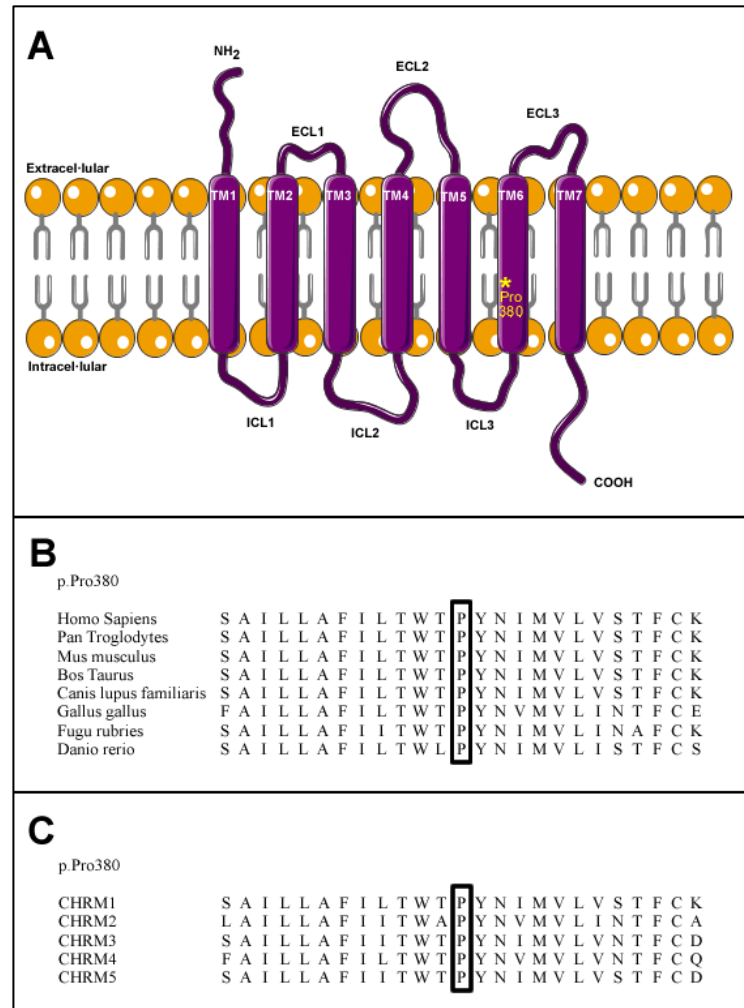


Figura 36 | Característiques de la posició p.Pro380 de CHRM1. A, Estructura del receptor transmembrana format de 7 hèlices transmembrana (TM), 3 *loops* extracel·lulars (ECL) i tres intracel·lulars (ICL). En groc i amb un asterisc es troba marcada la posició corresponent a la Prolina 380, a la hèlix transmenbrana 6; B i C, Alineament múltiple de la seqüència proteica corresponent a la regió on es situa Pro380, al llarg de l'evolució entre espècies (B) i entre els diferents tipus de receptor muscarínic d'acetilcolina (C).

La revisió de la literatura, així com de les bases de dades d'epilèpsia i EIEE, no associen *CHRM1* al fenotip, tot i que variants polimòrfiques en receptors muscarínics d'acetilcolina sí que s'associen a altres malalties del sistema nerviós central, com ara

l'esquizofrenia, com a contribuïdors del dèficit cognitiu¹⁸⁰. Tot i això, l'anàlisi ontològic dels processos biològics classifica el receptor en dos categories principals: desenvolupament del sistema nerviós i transmissió sinàptica química. Aquestes dues categories també es troben enriquides en l'anàlisi d'ontologia del llistat de gens descrits com a causants d'EIEE (Figura 23). Per altra banda, l'anàlisi d'interacció proteica entre el llistat de gens prèviament associats al fenotip, descrits a la introducció (Taula 5), juntament amb el gen *CHRM1*, mostra una estreta associació entre el gen candidat i *PLCB1* (Figura 37), causant de l'EIEE12 (MIM #613722).

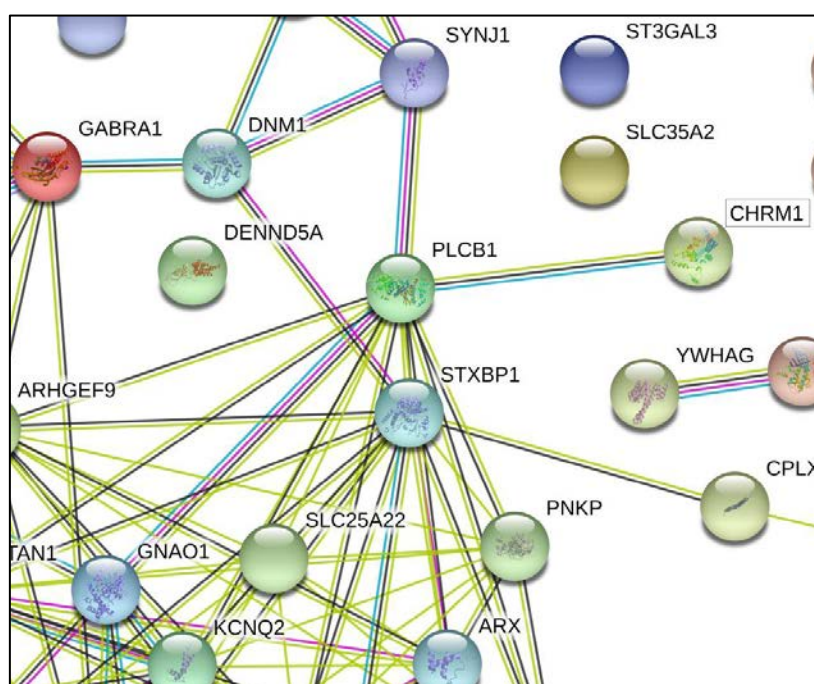


Figura 37 | Relacions proteiques entre *CHRM1* i els gens associats a EIEE (Ampliació de la Figura 22)

Per les raons precedents, es va considerar que el gen *CHRM1* és un bon candidat a ser causa d'encefalopatia epiléptica d'inici precoç. Per això es va procedir a la realització d'estudis funcionals descrits a continuació:

4.2. Estudi del tràfic cel·lular de *CHRM1*

El receptor muscarínic d'acetilcolina tipus 1 és una proteïna de 51,5 kDa, tot i així, com la majoria de receptors associats a proteïna G, pateix diverses glicosilacions, augmentant substancialment el seu pes molecular de la proteïna. El receptor glicosilat s'ha de transportar fins la membrana, on exerceix la seva funció formant homoligòmers, essent, per tant, crítics els processos de tràfic intracel·lular i oligomerització.

4.2.1. Expressió proteica i glicosilació

Es van analitzar els nivells totals de proteïna per *Western Blot* tant per proteïna *wildtype* en homozigosi, el mutant en homozigosi i en heterozigosi. Per fer-ho es van clonar la proteïna WT i mutant en vectors d'expressió per cèl·lules de mamífer i amb un epítot FLAG al C-terminal. Tot i que el mutant presenta uns nivells reduïts, la diferència no és significativa. L'expressió proteica de l'homozigot *wildtype* és de 3,029 +/- 1.338, de l'homozigot per P380L 1,190 +/- 0,7040 i de l'heterozigot 1,156 +/- 2,177. No obstant això, es detecta un patró de bandes diferencial en relació al pes molecular entre les dues formes (Figura 38 A i B).

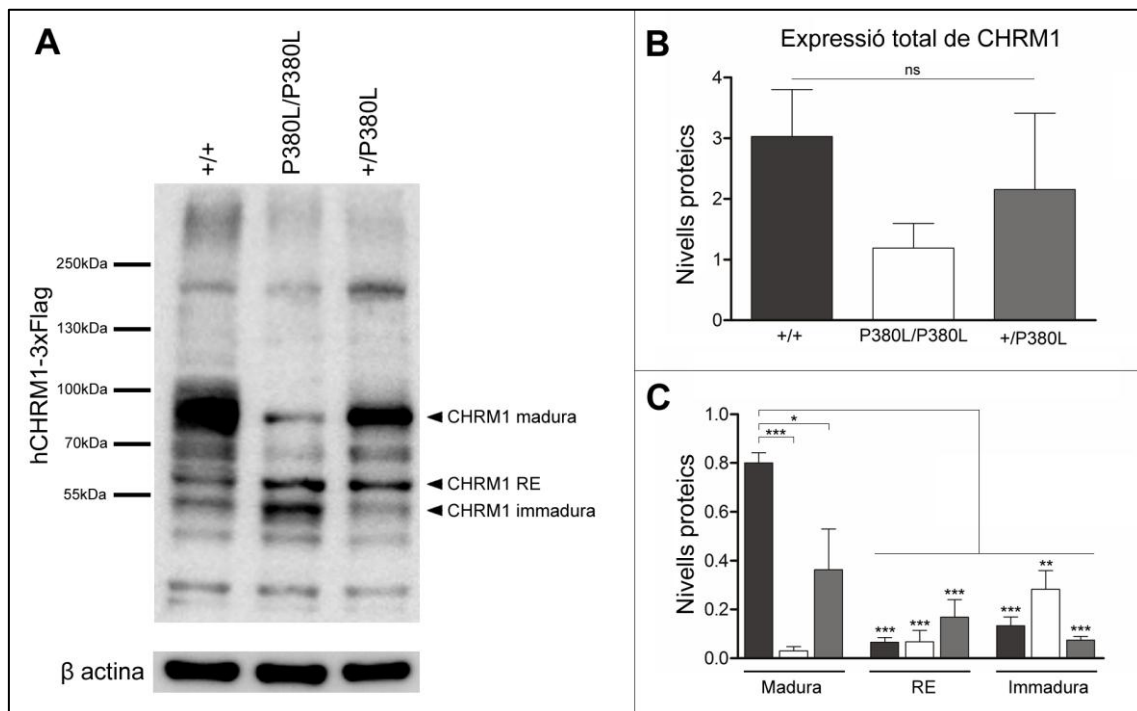


Figura 38 | Nivells de proteïna de CHRM1 en HEK293T. A, Resultat del *western blot* per les tres formes del receptor estudiades: homozigot *wildtype* (+/+), homozigot mutant (P380L/P380L) i heterozigot (+/P380L). A la dreta d'indica la banda corresponent a cada nivell de maduració proteica en funció de la glicosilació; B, Expressió total normalitzada pels nivells d'actina. Test estadístic ANOVA d'una via ($p=0.3966$) i comparació representada entre grups, calculada pel test de comparació múltiple de Bonferroni. C, Quantificació del *western blot* en funció dels nivells de maduració segons la glicosilació. Dades normalitzades per la quantitat total de CHRM1 de cada forma. Test estadístic d'anàlisi de varianza d'una via ($p<0.0001$) i comparació representada entre grups calculada pel test de comparació múltiple de Bonferroni.

L'estudi de glicosilació total de la proteïna CHRM1, a partir del tractament amb endoglicosidasa F de l'extracte de les cèl·lules transfectades amb el constructe pcDNA3.1(+)[hCHRM1(wt)-3xFlag], mostra l'alta glicosilació del receptor WT observant-se com desapareixen totes les bandes de pes molecular elevat, acumulant-

se totes al voltant de 55kDa (Figura 39A). En canvi, l'assaig amb endoH s'utilitza per a mesurar el nivell de maduració proteica segons la glicosilació complexa de l'aparell de Golgi. En aquest s'observa la correcta glicosilació de CHRM1(wt), però una alteració en la forma mutada, ja que en el tractament amb EndoH de l'extracte proteic, es perden totes les bandes de pes molecular elevat excepte la de 52kDa (Figura 39B).

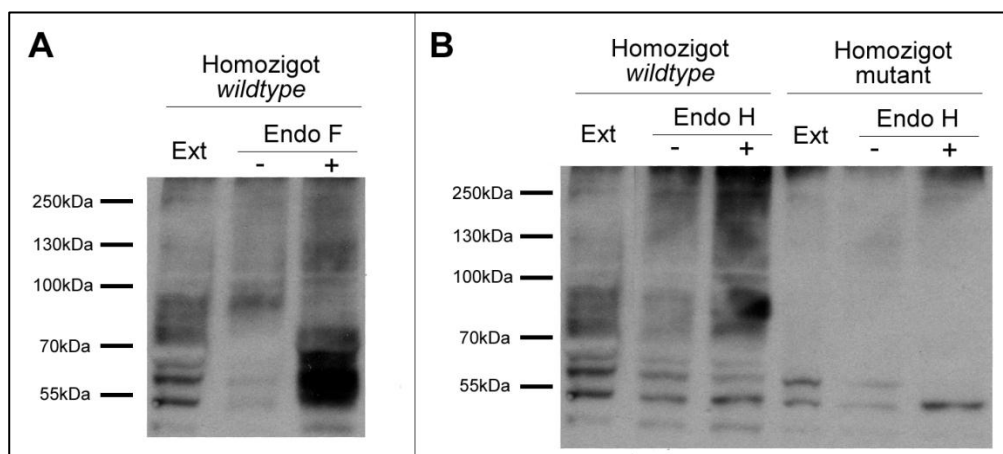


Figura 39 | Assaig de glicosilació de CHRM1 amb endoglicosidases. *Western Blot* amb anticòs anti-Flag dels diferents tractaments amb EndoF i EndoH per detectar CHRM1. A, Tractament amb EndoF de l'extracte proteic de HEK293A transfectades amb el constructe homozigot *wildtype* (+/+). Es representa l'extracte total sense tractar (Ext), l'extracte desnaturalitzat però sense tractar amb EndoF (-) i l'extracte desnaturalitzat i tractat amb EndoF (+); B, Tractament de l'extracte proteic de cèl·lules transfectades amb l'homozigot *wildtype* (+/+) o el mutant (P380L/P380L). Representats els extractes proteics totals sense tractar (Ext) i els desnaturalitzats no tractats (-) i tractats (+) amb EndoH.

L'assaig amb endoglicosilases permet correlacionar el patró de banda del *Western blot* amb el nivell de maduració en relació al procés de glicosilació de les proteïnes (Nucli-Reticle Endoplasmàtic-Golgi) (Figura 38A). La quantificació de les bandes corresponents als diferents estats de maduració de cada forma de CHRM1 (Figura 38C) mostra diferències significatives entre la quantitat de proteïna glicosilada correctament per Golgi entre la forma *wildtype* (madura: 0,8 +/- 0,07225; ER: 0,06590 +/- 0,03315; immadura: 0,1341 +/- 0,06162) i l'heterozigota (madura: 0,3626 +/- 0,2890; ER: 0,1686 +/- 0,1243; immadura: 0,07432 +/- 0,02696) i la mutada (madura: 0,03073 +/- 0,03046; ER: 0,06767 +/- 0,08100; immadura: 0,2829 +/- 0,1323), on la quantitat de CHRM1(wt) madura és superior a CHRM1(het) ($p < 0,05$) i superior a CHRM1(P380L) ($p < 0,001$). Alhora, també resulten significatives les diferències entre la proteïna *wildtype* madura i les formes de reticle i immadures de CHRM1(wt) i CHRM1(P380) ($p < 0,001$) on totes són inferiors. També són inferiors els nivells de

proteïna en condicions que simulen una herència heterozigota, en la forma immadura ($p < 0,01$) i en reticle endoplasmàtic ($p < 0,001$) respecte a la proteïna madura *wildtype*.

4.2.2. Oligomerització entre monòmers de CHRM1

CHRM1, com altres proteïnes GPCRs, forma oligòmers per a dur a terme la seva funció fisiològica. Per tal d'esbrinar si la mutació estudiada afecta l'oligomerització de la proteïna, es van realitzar assaigs de co-immunoprecipitació a partir d'extracte proteic de cèl·lules transfectades amb combinacions de constructes. Aquestes representen les diferents opcions proteiques que es donen en cèl·lules homozigotes *wildtype*, heterozigotes i homozigotes per P380L (Figura 40).

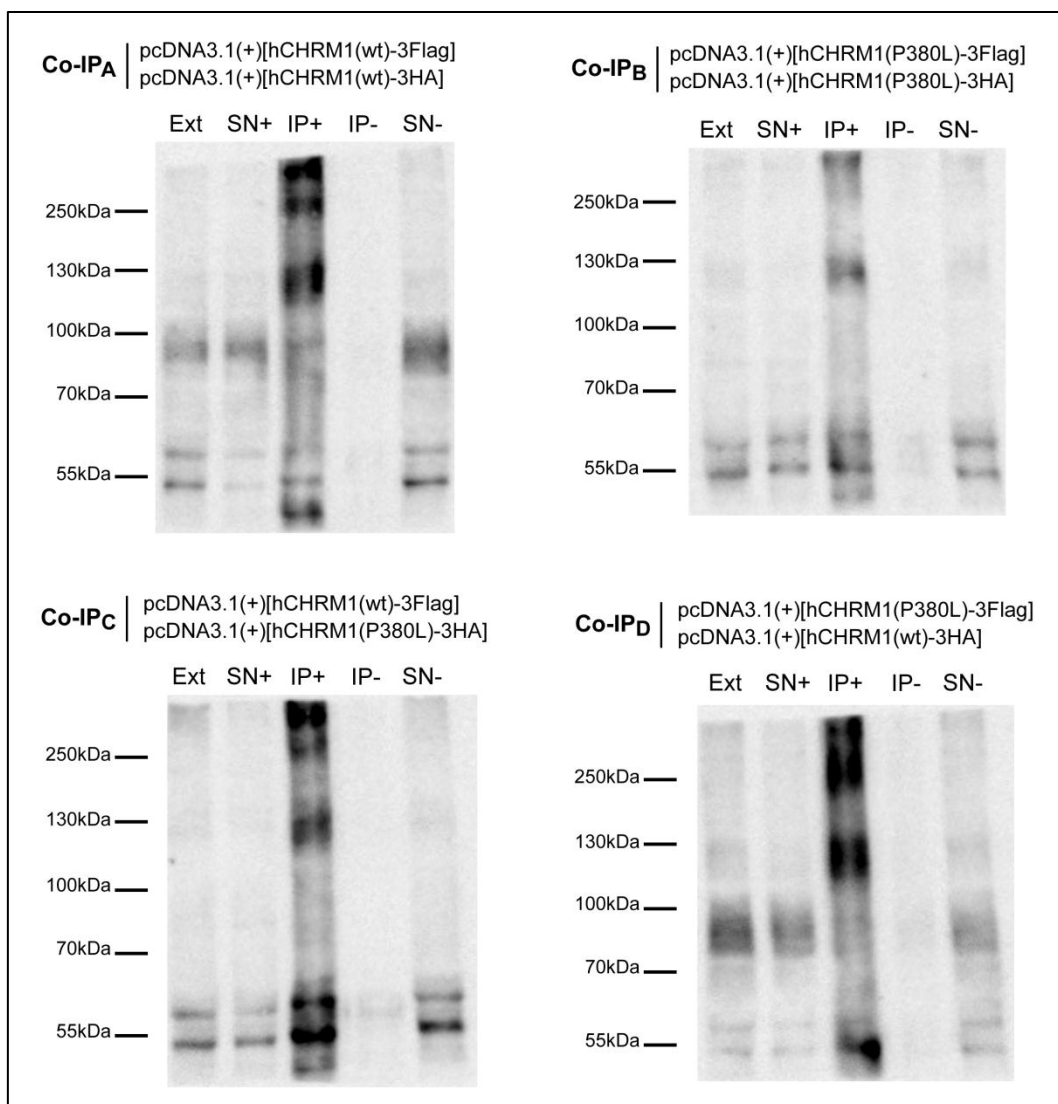


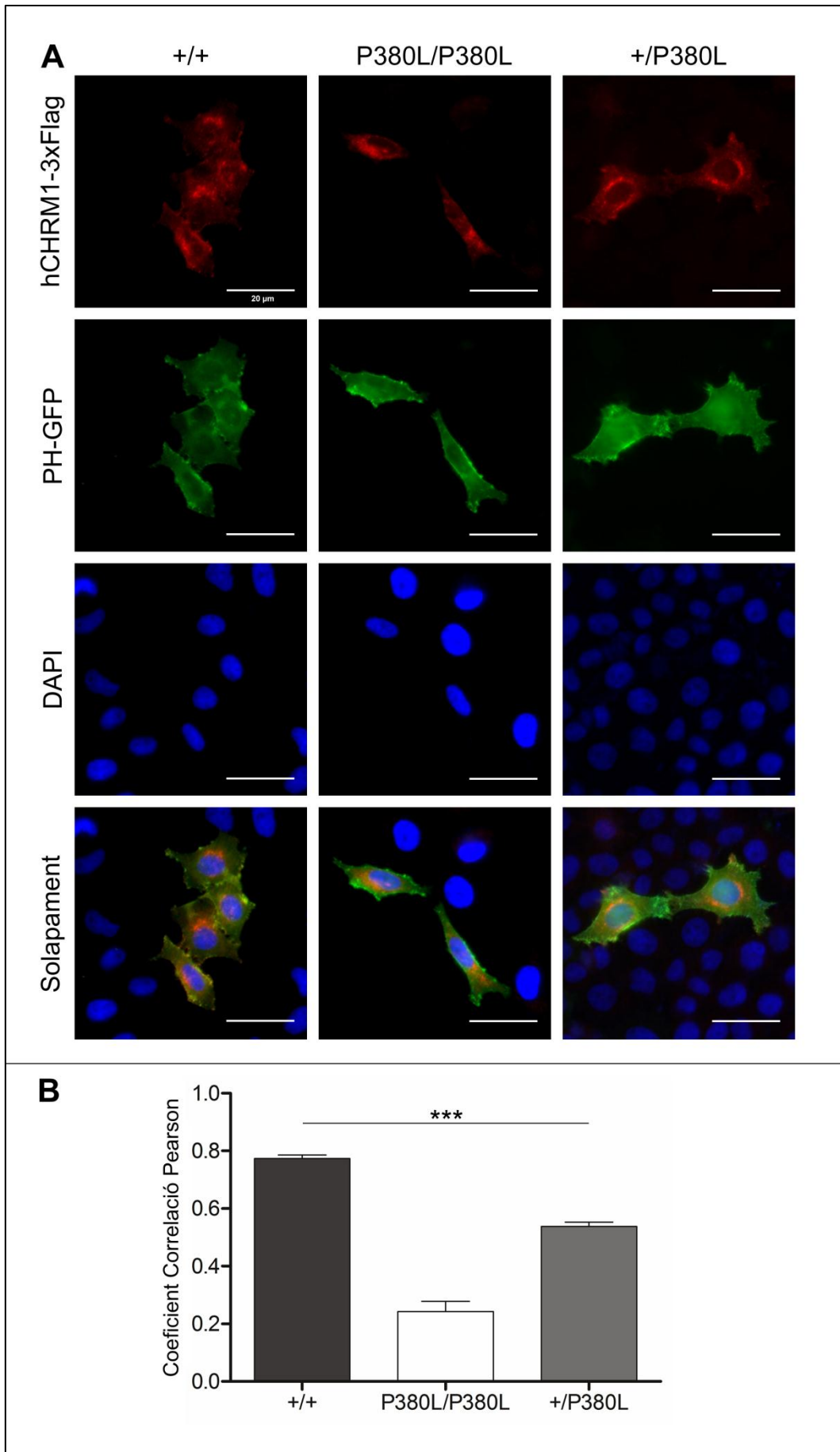
Figura 40 | Estudi de la dimerització de CHRM1. Immunoprecipitació amb anticòs anti-HA i *western blot* amb anticòs anti-Flag entre (A) CHRM1(wt)-3xFlag i CHRM1(wt)-3xHA, (B) CHRM1(P380L)-3xFlag i CHRM1(P380L)-3xHA, (C) CHRM1(wt)-3xFlag i CHRM1(P380L)-3xHA i (D) CHRM1(wt)-3xHA i CHRM1(P380L)-3xFlag.

Els resultats mostren com en qualsevol de les combinacions, la interacció entre les diferents formes de la proteïna no està alterada, ja que en totes les figures apareix el patró de bandes corresponents a la forma CHRM1 detectada per l'anticòs 3xFlag per *western blot*, a partir de l'extracte immunoprecipitat amb anticòs 3xHA. Aquests resultats alhora indiquen que la interacció entre els diferents monòmers es forma al reticle endoplasmàtic, ja que en els casos de dimerització on intervenen formes mutades, la detecció posterior a la immunoprecipitació també detecta aquelles bandes corresponents a les formes no madures de CHRM1.

4.2.3. Tràfic cel·lular i localització transmembrana

Els oligòmers de CHRM1 s'ubiquen a la membrana plasmàtica per a desenvolupar el seu rol fisiològic com a receptors d'acetilcolina. D'aquesta manera, s'ha estudiat la localització cel·lular de CHRM1 homozigot *wildtype*, heterozigot i homozigot mutant a través de la transfecció en cèl·lules HeLa per immunofluorescència (Figura 41A) i la seva col·localització a membrana a partir del solapament amb el senyal PH-GFP que marca específicament la membrana plasmàtica. En les imatges del marcatge 3xFlag que representa la localització del receptor, s'aprecia subtilment un augment del marcatge vermell a les cèl·lules CHRM1(wt), el qual disminueix en les cèl·lules heterozigotes i acaba sent nul en les cèl·lules homozigotes per la mutació. Les diferències són més clares en comparar les imatges resultants de la superposició dels marcatges PH-GFP i CHRM1-3Flag, amb la corresponent quantificació del grau de col·localització a membrana plasmàtica a través del Coeficient de Correlació de Pearson (Figura 41B). Els resultats mostren una superposició de la proteïna *wildtype* (+/+) a membrana [0,8060 (0,6970-0,8485)], la qual disminueix quan s'expressa la mutació en heterozigosis (+/P380L) [0,5725 (0,4320-0,6750)]. Finalment, la superposició a membrana pràcticament desapareix quan s'expressa la proteïna mutant (P380L/P380L) [0,2328 +/- 0,2358]. Aquests resultats mostren una disminució de la col·localització altament significativa ($p < 0.0001$) entre les diferents formes de CHRM1 estudiades, indicant una alteració del tràfic cel·lular de la proteïna ens els casos on hi ha un al·lel mutat, que encara es fa més evident quan la variant afecta als dos al·lells.

Figura 41 | Localització cel·lular de CHRM1. A, Imatges d'immunofluorescència de cèl·lules HeLa transfectades amb els constructes *wildtype* (+/+), mutant (P380L/P380L) i heterozigot (+/P380L). Imatges dels diferents components estudiats: marcatge 3xFlag corresponent a la localització de la forma CHRM1 d'estudi (vermell), marcatge de membrana per detecció de PH-GFP (verd) i marcatge nuclear amb DAPI (blau). Imatges del solapament dels marcatges per a detectar el grau de senyal CHRM1 a membrana; B, Quantificació del coeficient de correlació de Pearson entre el senyal PH-GFP i 3xFlag. Test Kruskal-Wallis ($p < 0.0001$) i diferències entre el grups calculades amb el test de comparació múltiple de Dunn.



4.2.4. Senyalització intracel·lular per estimulació del receptor CHRM1

El receptor muscarínic d'acetilcolina tipus 1 està implicat, principalment, en la senyalització intracel·lular a través de IP₃-calci, però també s'ha descrit la seva intervenció en la via senyalitzadora de cAMP. Estudis de gens reporters, realitzats durant aquest treball, que contenen factors de transcripció activats per cAMP (CRE) i per calci (NFAT) per tal de quantificar el nivell de funcionalitat del receptor en ser activat per carbacol a través de l'expressió d'un senyal luciferasa (Figura 42). L'estudi mostra que, l'assaig realitzat activa de forma més eficient la via cAMP que la del IP₃-calci, efecte observat en l'estimulació dels controls positius amb foskolina i CA+PMA respectivament. Aquestes dades crues no es mostren als resultats, però expliquen les diferències en els nivells d'activació entre les dues vies, amb enriquiments de 0 a 40 en la via cAMP i de 0 a 5 en la IP₃-Ca²⁺.

Els resultats del senyal luciferasa detectada en l'activar el receptor en qualsevol de les tres variants (homozigot *wildtype*, mutant o heterozigot) mostra la mateixa tendència significativa en ambdues vies de senyalització estudiades ($p < 0,0001$). L'activació de la via cAMP (Figura 42A) mostra en un senyal de 18,29 (17,72-37,79) en CHRM1(wt), 0,9054 +/- 0,3629 a CHRM1(P380L) i 9,561 +/- 3,261 a CHRM1(het). Aquestes dades indiquen que la senyalització és superior en les cèl·lules que contenen el receptor CHRM(wt) en comparació amb el receptor CHRM1(P380L) ($p < 0,001$) o CHRM1(het) ($p < 0,01$) i la senyalització per cAMP en les cèl·lules heterozigotes resulta, alhora, superior a la de les cèl·lules homozigotes per P380L ($p < 0,05$).

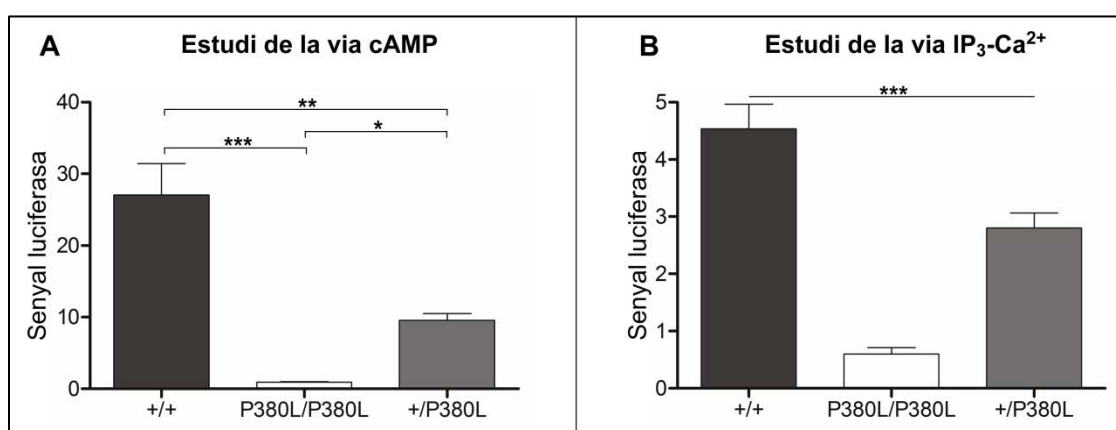


Figura 42 | Nivells de senyal luciferasa en funció del grau d'activació quan el receptor s'uneix a un agonista d'acetilcolina (Carbacol) A, Nivells d'activació de la via de senyalització de cAMP a través del gen reporter CRE. Normalització dels valors pels controls negatius i positius amb foskolina. Test estadístic Kruskal-Wallis ($p > 0,0001$) i comparació entre grups representada d'acord amb el test comparatiu múltiple de Dunn; B, Nivells d'activació de la via IP₃-Ca²⁺ a través del factor de transcripció NFAT. Normalització dels valors pel control negatiu i positiu amb CA+PMA. Test ANOVA d'una via ($p > 0,0001$) i comparació entre grups pel test de comparació múltiple Bonferroni.

Per altra banda, l'activació de la via IP_3 -Calci (Figura 42B) presenta senyalització per l'homozigot *wildtype* de 4,535 +/- 1,212, per l'homozigot P380L de 0,6020 +/- 0,3402 i de 2,801 +/- 0,8782 per l'heterozigot. Això es tradueix en una major senyalització de la via quan CHRM1(wt) és activat respecte CHRM1(het), i a la vegada aquest té una senyalització superior a l'activació de CHRM1(P380L), tots ells amb diferències de senyalització significatives ($p < 0,001$). Aquestes dades proporcionen una evidència més de la incapacitat que presenten els receptors d'acetilcolina M1 mutats per activar correctament les cascades de senyalització fisiològiques que li corresponen.

DISCUSSIÓ

Les encefalopaties epilèptiques d'inici precoç (EIEE) són un conjunt de síndromes desencadenades pel debut de crisis epilèptiques durant el primer any de vida caracteritzades per un seguit d'alteracions estructurals, metabòliques i genètiques que resulten en un fenotip heterogeni, molt greu, i generalment de mal pronòstic³⁸. La causa de les EIEE sol ser generalment genètica, sent múltiples les possibilitats de gens causants d'aquest fenotip. L'elevada heterogènia fenotípica i genètica d'aquestes malalties, implica una gran dificultat a l'hora de poder diagnosticar correctament aquests pacients³⁹, requerint el desenvolupament de noves eines diagnòstiques que facilitin la identificació molecular de la causa de l'encefalopatia epilèptica de cada pacient.

1. L'ús de les tècniques NGS com a eina diagnòstica per a les encefalopaties epilèptiques d'inici precoç

Les tècniques estàndard d'elecció per a l'estudi genètic dels pacients amb EIEE acostumen a ser seqüenciació dirigida pel mètode Sanger quan existeix sospita diagnòstica d'un gen concret o l'estudi de variants estructurals (cromosòmiques o CNVs), com ara reordenaments grans del genoma o delecions i duplicacions (cariotip, *arrayCGH* o MLPA)¹⁸¹. Aquestes darreres són útils per a la detecció de grans alteracions en l'estructura del DNA, però queden sense cobrir les mutacions que afecten regions massa petites per la sensibilitat de les diferents tècniques. La seqüenciació dirigida és el mètode utilitzat per a detectar mutacions puntuals (SNVs) i petites delecions i insercions, però la dificultat de discriminar la correlació fenotip-genotip en les EIEE³⁹, fa complicat cobrir tots els gens necessaris mitjançant aquesta tècnica, degut al seu desequilibri cost-benefici¹⁸². Això queda patent en els resultats d'aquest estudi, ja que el 66,25% dels pacients estudiats presentaven tests genètics previs corresponent a una d'aquestes dues proves, i cap d'ells ha estat diagnosticat a través d'aquestes aproximacions. A més, s'ha de tenir en compte els possibles errors resultants de l'anàlisi de la seqüenciació dirigida per Sanger, el qual es duu a terme a través d'inspecció visual de l'electroferograma o programes d'alineament de seqüències. Aquest és el cas del pacient 34, diagnosticat de Síndrome de Dravet, a qui se li va realitzar seqüenciació directa del canal de sodi *SCN1A* per sospita clínica, en un laboratori genètic extern, sense detecció de cap variant. L'estudi posterior de l'exoma complet per trios desenvolupat en aquest projecte va detectar la mutació p.I953Dfs*44 en aquest mateix gen, produïda per una inserció d'una guanina a la posició 2857 del cDNA (NM_001202435). La validació d'aquesta variant, i de la seva

segregació, es va realitzar per seqüenciació Sanger, fent evident l'error en l'anàlisi genètica realitzada anteriorment i posant de reclam la necessitat de desenvolupar nous mètodes diagnòstics que permetin formes d'anàlisi més automàtiques per tal d'evitar errors d'aquest tipus.

La seqüenciació de nova generació (NGS) permet seqüenciar múltiples gens de forma simultània, reduint el temps invertit i agilitzant-ne l'anàlisi de variants¹⁸³. Sota el paraigüa de les NGS s'hi classifiquen els panells específics de grups de gens, la seqüenciació exòmica completa (WES), la seqüenciació genòmica completa (WGS) i l'estudi del transcriptoma (RNA-seq)¹⁸¹. Tots ells es basen en la fragmentació del material genètic i la selecció de les regions d'interès a estudiar, amb les quals es crea una llibreria per a seqüenciar en un aparell de seqüenciació massiva. La diferència entre cada tècnica és, precisament, la selecció de les regions d'interès i la cobertura amb què es llegeix cada fragment, la qual és inversament proporcional a la grandària de la regió estudiada¹⁸⁴. Els panells de gens específics capturen, en una sola reacció, les regions exòniques juntament amb les regions intròniques flanquejants d'un grup de gens d'interès per a la malaltia a estudiar, fet que els converteix en un mètode amb un balanç cost-efectivitat-temps altament positiu¹⁸². Entre la cohort estudiada en el present treball, s'ha realitzat seqüenciació NGS en panells de gens associats a epilèpsia en 12 dels casos estudiats, dels quals 2 d'ells (16.7%) han resultat positius. Aquests resultats coincideixen amb les dades descrites a la bibliografia, on la taxa de diagnòstic en estudis de seqüenciació massiva mitjançant panell se situa entre el 15,1 i el 48%¹⁸⁵⁻¹⁹⁰. En el cas dels panells, al ser el volum de regions seqüenciades limitat, s'espera que la cobertura sigui molt elevada, tot i així, existeixen zones mal cobertes que poden donar lloc a falsos negatius. Aquest és el cas del pacient 59 amb Sd. d'Ohtahara, el qual va ser negatiu després de realitzar-ne un panell de gens associats a epilèpsia en un laboratori diagnòstic extern. El posterior estudi de l'exoma ha detectat la variant *de novo* c.833T>C (NM_172408) que resulta en el canvi d'aminoàcid lle278Thr a la proteïna KCNQ2. Aquest gen està altament classificat com a causa d'encefalopaties epilèptiques d'inici precoç des de 1998¹⁹¹, per tant, qualsevol panell dissenyat per a cobrir els gens relacionats amb el fenotip epilèptic el conté, motiu pel què es relaciona el resultat negatiu del panell o bé amb un error de cobertura o bé amb un error d'anàlisi.

1.1. Diagnòstic de les EIEE mitjançant WES

Les encefalopaties epilèptiques d'inici precoç es caracteritzen per la seva heterogeneïtat genètica, la qual resulta, no només en múltiples gens associats al fenotip, sinó que també en la constant descripció de nous gens contribuïdors a la malaltia. Aquest fet posa en dubte la idoneïtat de l'ús de panells com a mètode d'elecció per al diagnòstic rutinari de les epilèpsies, ja que en ells es limita l'estudi al gens seleccionats per al seu disseny¹⁸⁸. La seqüenciació de l'exoma complet, en canvi, captura totes les regions codificants del genoma i les seves regions flanquejants, cobrint, a una profunditat de lectura superior a 10x, aproximadament el 90% de les regions¹⁸⁴, en funció de la tecnologia de captura utilitzada. Els diferents mètodes utilitzats en aquest projecte han anat augmentant el percentatge de regions d'interès cobertes a profunditats mínimes. Així, dels exomes inicials fets al CNAG al 2013 que cobrien un 80% de l'exoma, es va augmentar a un 89% en els WES posteriors realitzats a l'UCL, fins a assolir una cobertura del 97% de la regió d'interès amb l'última versió dels protocols d'Illumina en els anys 2017-2018 a Centogene. Això, tot i que en procés de millora exponencial, implica una cobertura menor que l'obtinguda en els panells, però en contraposició es disposa de l'anàlisi de tots els gens, i no únicament dels considerats d'interès en el moment del disseny¹⁸¹. Aquest aspecte permet reanalitzar les dades a mesura que nous gens van afegint-se al llistat de causants d'epilèpsia, de manera que s'evita reseqüenciar els pacients. És per aquesta raó que l'estudi genètic mitjançant la seqüenciació de l'exoma complet, analitzant, en primer lloc, aquells gens associats al fenotip, es postula com a nova eina diagnòstica per a patologies com les EIEE. De la mateixa manera, aquesta tècnica NGS obre la possibilitat de detectar variants en nous gens candidats potencialment causants del fenotip epilèptic¹⁹². En el present estudi s'ha seqüenciat la mostra de 80 pacients EIEE, fent ús de diferents mètodes diagnòstics, assolint una taxa d'èxit del 52,5%. Si es considera únicament els estudis WES-trio en què se centra aquest treball, el percentatge de diagnòstics resulta en un 50%, xifra que es troba a l'extrem superior del rang on se situen la majoria d'estudis realitzats fins al moment, on el percentatge d'èxit es mou entre el 10 i el 50%^{76,181,192-197}. D'aquests resultats de l'estudi en trios, el 35,53% dels pacients presenten variants en gens prèviament descrits com a causants d'EIEE, valor que es troba en consonància amb el que s'ha reportat^{56,198}. En aquest estudi s'han detectat un major nombre de pacients amb variants a *STXBP1* (10% dels pacients), seguit *KCNQ2* (8,75%) i *SCN1A* (2,5%). Altres estudis NGS en pacients amb epilèpsia neonatal reportats a la literatura, determinen que el major nombre de pacients presenten variants a *SCN1A* (entre el 15 i el 25%)^{185,186,189}, valor molt superior a la detectada en aquest treball. Probablement, l'explicació a tal diferència és la

certesa de que l'alteració es trobi al gen *SCN1A* (causant de la Síndrome de Dravet, amb fenotip molt característic) pel que es dirigeix de forma directa a l'estudi específic d'aquest. Això produeix un biaix en els resultats d'aquest estudi cap a una baixa proporció de pacients amb aquest diagnòstic. En els mateixos estudis realitzats per altres autors, es descriu la prevalença de variants a *KCNQ2* entre un 5 i un 10% dels pacients, valors que coincideixen amb els d'aquest estudi. *STXBP1* es troba sobrerrepresentada en la cohort analitzada en aquest treball, ja que els estudis anteriors determinen variants en aquest gen en un 3-5% dels pacients estudiats, suggerint que variants en aquest gen podrien caracteritzar l'espectre genotípic dels pacients EIEE en l'àmbit geogràfic mediterrani. D'altra banda, el 14,47% presenten alteracions en gens proposats com a nous candidats, una dada lleugerament superior a l'establerta segons estudis realitzats fins ara¹⁹². Probablement, una de les claus de l'èxit diagnòstic en el present estudi és l'ús de trios per a realitzar el WES. Aquests faciliten l'anàlisi gràcies a la possibilitat d'afegir les dades de segregació familiar que contribueixen al filtratge segons l'herència esperada¹⁹⁷.

La seqüenciació exòmica en aquest estudi s'ha realitzat en tres centres diferents entre els que s'aprecia una diferència en el percentatge de diagnòstic (Taula 15): 53,66% al CNAG, 33,33% a Centogene i 31,03% a l'UCL. Aquestes diferències poden ser degudes, en part, a la variabilitat dels pacients enviats a cada centre, però un factor important descrit a la literatura és el *pipeline* utilitzat per al processament de les dades, des de l'alineament amb el genoma de referència fins a la crida de variants i conseqüent filtratge per qualitat de la seqüenciació¹⁹⁹. Els resultats diferencials segons el tipus de *pipeline* d'anàlisi utilitzada es fa evident observant els resultats obtinguts dels 19 exomes negatius realitzats al CNAG entre el 2013 i el 2015 i del seu posterior reanàlisi, partint de l'arxiu fastQ, dut a terme a l'UCL. Aquest reanàlisi va resultar en la detecció de 3 variants en gens descrits (*RARS2*, *SPATA5* i *SLC12A5*) i 3 variants en gens candidats nous (*PARS2*, *SETDB1* i *FMN1*). La comparació detallada entre els dos resultats obtinguts mostra una diferència en el nombre i el tipus de variants detectades, principalment a conseqüència dels diferents *softwares* de processament de dades utilitzats. També hi contribueixen els paràmetres llindar que s'estableixen en cada cas per a considerar la veracitat d'una variant. Alhora, però, també tenen un paper rellevant les actualitzacions dels programes utilitzats pel processament de les dades crues. Aquestes milloren, entre altres coses, l'alineament amb el genoma de referència o les bases de dades que permeten anotar les diferents variants segons diversos elements, com ara la patogenicitat o la freqüència poblacional. Els diferents paràmetres van refinant-se a mesura que la recerca en genètica de malalties avança.

Finalment, l'estudi dels pacients a través d'un equip multidisciplinari, format per clínics, biòlegs, genetistes i bioinformàtics resulta beneficiós per a assolir la major taxa de diagnòstics possible en estudis NGS¹⁹⁶. Aquest treball demostra el que ja s'hipotetitzava en anteriors treballs¹⁹⁰: el correcte fenotipat dels pacients abans de qualsevol estudi genètic proporciona una major taxa de diagnòstic, ja que el desenvolupament d'una sospita clínica clara implicarà un millor enfocament de la cerca dels gens causants a través de l'anàlisi bioinformàtic. Alhora, un dels factors claus que va guanyant importància a l'hora de plantejar un estudi genètic és l'edat de debut de les crisis epilèptiques²⁰⁰. Tal com indiquen els resultats de l'estudi realitzat en 80 pacients d'EIEE, la probabilitat d'arribar a un diagnòstic genètic augmenta en aquells pacients on l'inici de les crisis es troba entre els primers sis mesos de vida, i aquesta elevada capacitat diagnòstica es fa encara més evident quan els pacients pateixen un debut neonatal. No obstant això, a vegades la seguretat en la sospita clínica d'un pacient epilèptic pot portar al clínic a realitzar múltiples proves genètiques prèvies a un exoma complet, la qual cosa pot ser contraproductiu. Aquest fenomen s'ha descrit prèviament en patologies que afecten el múscul esquelètic²⁰¹, però les dades d'aquest treball apunten en la mateixa direcció per a les encefalopaties epilèptiques, ja que la taxa de diagnòstic entre els pacients als que no se'ls havia realitzat cap assaig genètic previ és tres vegades superior a la taxa de diagnòstic dels que havien estat sotmesos a altres proves. Especialment, s'observa una reducció de l'èxit diagnòstic de l'exoma complet per trios en aquells pacients als que se'ls hi havia realitzat un panell de gens d'epilèpsia, ja que a l'analitzar l'exoma es redueixen les opcions de trobar una variant en un gen prèviament descrit. Si es tenen en compte les dades d'aquest estudi, el diagnòstic genètic, entenent-lo com a detecció de variants en gens coneguts com a causants d'EIEE, de pacients als que se'ls havia realitzat un panell de gens d'epilèpsia és d'un 16,7%. Aquest valor ha resultat molt superior en els pacients estudiats per WES (36,36%), evidenciant la millora del rendiment diagnòstic dels estudis d'exoma complet respecte els panells.

1.1.1. WES i les variants de significat incert

Malgrat existir, en alguns casos, un diagnòstic clar de les EIEE encara resten molts pacients on no es detecten variants en els gens associats a aquest fenotip. És per aquesta raó, que trobar la causa genètica a aquest trastorn encara se solapa de forma considerable amb la recerca dirigida a detectar nous gens que contribueixin al fenotip epilèptic. Com s'ha comentat anteriorment, l'ús de la seqüenciació de l'exoma complet proporciona la possibilitat d'estudiar més enllà dels gens coneguts, per tal d'identificar causes noves que puguin explicar la malaltia que pateix un pacient concret. De fet, tal

com es descrivia l'any 2012¹¹¹, l'aparició de les tècniques de seqüenciació massiva han augmentat exponencialment el nombre de gens associats a les epilèpsies. És precisament en l'anàlisi dels resultats de l'exoma amb la finalitat de detectar variants en nous gens candidats, on la utilitat de la seqüenciació per trios és fa més rellevant. En un sol individu es poden detectar aproximadament 95000 variants, les quals es redueixen fins a unes 2000 després del filtratge en termes de qualitat, freqüència poblacional i efecte proteic predit (Taula 12). El filtratge per a detectar variants en gens coneguts redueix el nombre de variants a un nombre molt petit, però quan s'analitza la resta del genoma, l'anàlisi guanya molta complexitat. La seqüenciació per trios proporciona les variants dels progenitors, el que permet afegir l'herència com a factor addicional al filtratge, reduint substancialment les variants a considerar i facilitant la selecció de nous gens candidats. Alhora, proporciona un control intern de seqüenciació, ja que es realitza un creuament de resultats entre les tres seqüències. D'aquesta manera permet donar major veracitat als resultats obtinguts i eliminar falsos positius deguts a errors de lectura durant el procés.

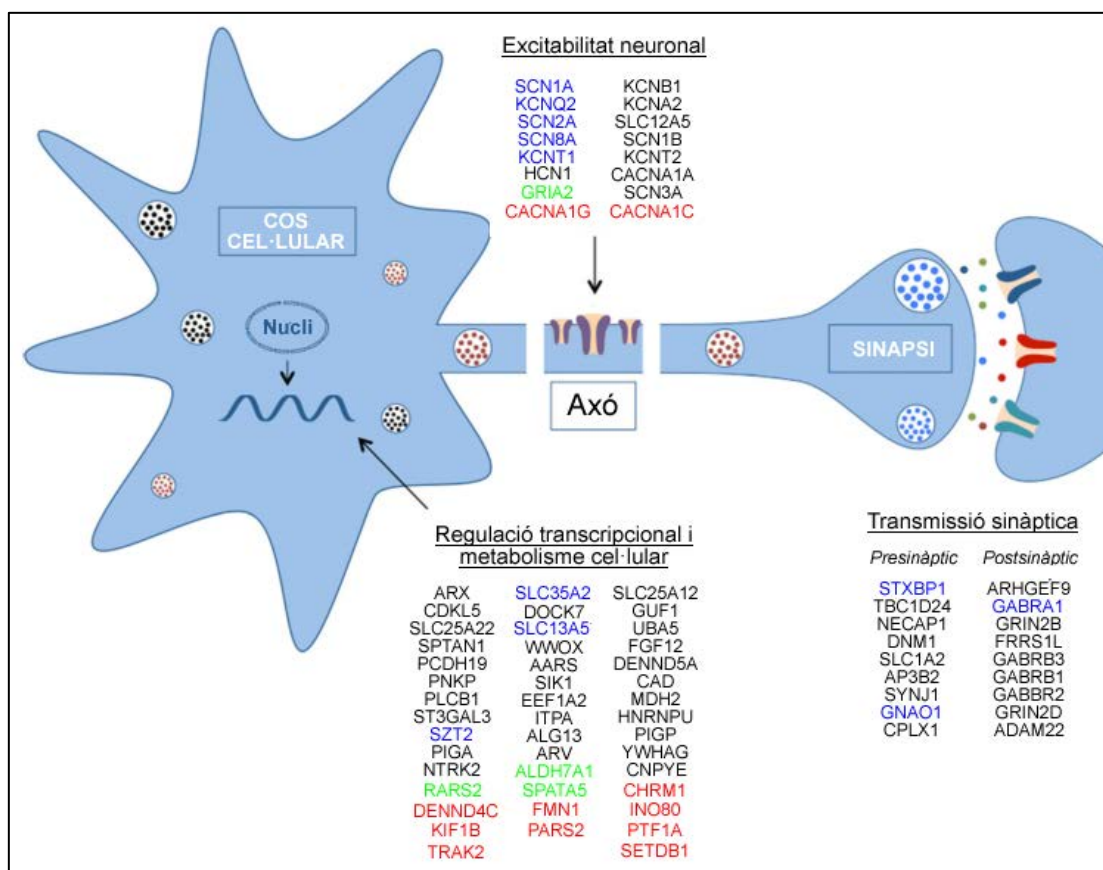


Figura 43 | Participació dels gens detectats en aquest treball en els diferents mecanismes implicats en les EIEE. En blau, els gens descrits a l'OMIM detectats en pacients d'aquesta tesi; en verd, gens associats a EIEE en treballs anteriors detectats en els pacients analitzats; en vermell, gens nous candidats a contribuir al fenotip epilèptic detectats en la cohort d'aquest estudi (*Adaptació de Von Deimlig, 2017³⁶*)

L'estudi de potencials gens com a causant del fenotip epilèptic que afecta el pacient radica, en una part molt important, en la descripció de la implicació del gen seleccionat en processos biològics associats al control de l'excitabilitat neuronal, a la morfogènesi del sistema nerviós central i sinaptogènesi o a la regulació de l'expressió gènica. En el millor dels casos, apareixeran en una mateixa cohort, o en cohorts de diferents estudis, dos o més pacients amb una variant en un mateix gen, com és el cas de *PARS2*²⁰². En altres casos, el gen candidat estarà estretament relacionat amb altres gens prèviament descrits com a causants d'epilèpsia, com *CACNA1G* i *CACNA1C*, *CHRM1*, *TRACK2* i *KIF1B*, o als processos biològics enriquits en el fenotip epilèptic, en el qual estan representats *PTF1A* i *FMN1*. Finalment, en els casos més complicats de definir, no hi ha cap relació directa amb les EIEE però la literatura els relaciona amb fenotips similars o amb processos rellevants per al desenvolupament o funcionalitat del sistema nerviós central (*INO80* i *SETDB1*). D'aquesta manera, aquests gens s'afegirien a la classificació funcional dels gens causants d'epilèpsia corresponent a l'excitabilitat neuronal o a la regulació del metabolisme i la transcripció cel·lular (Figura 43).

Les variants proposades en nous gens es classifiquen com a variants de significat incert (VUS), degut al desconeixement de la seva patogenicitat real¹²⁶, tot i això, diverses eines contribueixen a la seva caracterització *in silico*. Per una banda, els predictors *in silico* apliquen algorismes per a determinar la probabilitat que una variant donada sigui patogènica. Aquests però, només són indicadors, ja que en alguns casos hi ha discrepàncies entre els diferents predictors utilitzats. Resulten especialment problemàtics a l'hora d'aplicar-los a variants que afectarien l'*splicing*²⁰³, ja que gran part dels algorismes no estan actualitzats amb les dades relacionades amb aquestes posicions. Per altra banda, la freqüència poblacional indica la probabilitat de trobar la variant en la població general sana, i en casos on s'espera una herència recessiva, el nombre d'homozigots descrits en població general també és un indicador. En general, s'esperaria que la freqüència fos molt baixa o nul·la en les variants en heterozigosis que actuarien de forma dominant, mentre que en les homozigotes o CHET, detectades per a trastorns autosòmics recessius, pogués ser lleugerament més elevada, però en tots els casos la presència d'homozigots descrits en població general sana hauria de ser nul·la. No obstant això, en dos dels gens proposats com a nous candidats recessius (*FMN1* i *SETDB1*), en els pacients 5 i 15 respectivament, portadors de dues variants en heterozigositat composta, s'observa que una de les dues variants presenta una freqüència superior a l'esperada en població general: per a *FMN1*, NM_001103184: c.110C>A; p.S37Y i per a *SETDB1*, NM_001145416: c.3062C>T;

p.A1021V. Això suggereix que aquestes variants no serien patogèniques per elles mateixes, però si en combinació amb una variant amb un efecte més sever sobre la proteïna final. Recentment, s'han descrit casos en el gen *NDUFAF6*, on la presència de variants aparentment no patogèniques en homozigosi, podrien estar alterant punts d'*splicing* de manera que per si soles permetessin un equilibri entre les formes defectuoses i les *wildtype*, no alterant la funcionalitat fisiològica de la proteïna. Però aquestes, al trobar-se en CHET amb altres variants patogèniques, trencarien aquest equilibri resultant en una alteració de la funció final de la proteïna²⁰⁴. El predictor *in silico* específic per a variants d'*splicing*, considera que les dues variants a *FMN1* i *SETDB1* detectades en aquest treball, podrien estar alterant posicions exòniques promotores d'*splicing* (*ESE sites*) i en el cas de *SETDB1*, també prediu que podria estar, a més, activant alguna posició ESE nova o una posició crítica donadora d'*splicing*. Malgrat ser prediccions, això podria suggerir que aquestes variants en heterozigositat composta amb una segona variant patogènica, donaria lloc a una alteració que podria explicar el fenotip d'aquests pacients.

Totes les mutacions detectades com a resultat d'un estudi NGS, classificades com a VUS, tot i classificar-se com a causants de malaltia a través de les diverses aproximacions *in silico* descrites anteriorment, haurien de ser validades funcionalment per tal de provar la seva contribució real. Les possibilitats són diverses, des de la utilització de l'anàlisi del transcriptoma a partir de l'extracció de RNA per a les variants amb potencial afectació de l'*splicing*, passant per l'expressió de l'alteració genètica en tipus cel·lulars per a estudiar-ne els efectes *in vitro*, fins a la generació d'un model animal *in vivo* per a estudiar-ne l'efecte sobre l'organisme sencer. Per als casos detectats en aquest estudi, la variant VUS amb major interès dintre els gens prèviament coneguts és la detectada a *SLC35A2* (NM_001032289:c.92-2A>G). Aquest canvi es prediu com a potencial modificador d'*splicing*, per tant, caldria estudiar la possible alteració de la seqüència final de mRNA. Per altra banda, els gens proposats com a nous candidats haurien de ser estudiats per tal de poder considerar els pacients portadors com a diagnosticats. Diversos assaigs es proposen per a aquests gens segons la seva funció, com ara estudis d'expressió de RNA i localització cel·lular en el gen *FMN1*, estudis de transport cel·lular i, concretament, transport entre el reticle endoplasmàtic i l'aparell de Golgi en el gen *DENND4C* o assaigs electrofisiològics en les subunitats del canal de calci (*CACNA1G* i *CANCA1C*). De la seqüenciació dels 80 pacients d'aquest estudi, han resultat com a nous candidats diversos gens relacionats amb control de la regulació de la cromatina, *INO80* i *SETDB1*, pels que es podrien realitzar experiments relacionats amb els mecanismes epigenètics. També ha sorgit un

grup de gens implicats en la fisiologia de les mitocondries, *TRAK2*, *PARS2* i *KIF1B*. Per a estudiar-los, assaigs relacionats amb la morfologia i xarxa mitocondrial, així com amb la funció de la cadena respiratòria podrien ajudar a definir l'associació s'aquests nous gens amb el fenotip epilèptic. Aquests experiments, idealment, haurien de ser duts a terme amb cèl·lules obtingudes del teixit neuronal del pacient, però al ser poc accessible, altres tipus de teixits on s'expressi el gen podrien utilitzar-se. Com a alternativa davant la impossibilitat d'aconseguir cultius primaris neuronals del pacient, existeix la possibilitat de generar constructes amb minigens per a desenvolupar els diferents assaigs en línies cel·lulars establertes²⁰⁵.

1.2. Els casos negatius de l'estudi WES

La seqüenciació de l'exoma complet presenta com a principal limitació la variabilitat de la cobertura degut a la captura de les regions codificants, cosa que va associada al fet que quedin excloses de l'anàlisi les regions intròniques i reguladores¹⁸⁴. Els avanços realitzats gràcies a la recerca relacionada amb el genoma humà han demostrat la potencial implicació d'aquestes regions en l'expressió gènica¹¹⁶, cosa que podria explicar una part del 50% de pacients d'aquest estudi que resten sense diagnòstic després de realitzar WES.

La seqüenciació del genoma complet (WGS) podria ser una alternativa al mètode WES, ja que cobreix el 100% del genoma amb una cobertura menor que l'exoma, però més uniforme, i no utilitza PCR per a seqüenciar, cosa que elimina errors introduïts durant aquest procés²⁰⁶. En el present treball s'ha realitzat el genoma complet d'un trio que havia estat negatiu per a WES, obtenint un gran nombre de variants en regions intròniques profundes o reguladores de gens prèviament associats a EIEE. Aquestes variants també són considerades VUS, ja que tot i afectar gens candidats, produeixen canvis que, fins fa poc, no es consideraven patogènics. Tot i no produir un canvi en la seqüència proteica, les variants intròniques profundes, i inclús les sinònimes, poden intervenir en l'elongació i l'eficiència de la traducció: creen interaccions per a estabilitzar el tRNA²⁰⁷, alteren el plegament i l'estabilitat del mRNA²⁰⁸ i també poden alterar el procés d'*splicing*²⁰⁹. La implicació real d'aquest tipus de variants sobre la seqüència de la proteïna final requereix ser comprovada. La forma més senzilla és l'estudi del transcriptoma, o bé a través de l'assaig clàssic de retrotranscripció i amplificació del gen d'interès al cDNA, o a través de la tècnica NGS del RNA-seq²¹⁰.

Un segon grup de variants que han emergit com a potencials contribuïdores al fenotip de l'epilèpsia són les variants de nombre de còpia (CNVs). Aquestes, es poden

detectar per mètodes de detecció de variants estructurals, com el *microarray*, però la sensibilitat d'aquests és superior a 100kb¹⁸⁴. Existeixen *softwares* específics de detecció de CNVs per a WES, els quals s'han d'utilitzar per a processar les dades crues. No obstant això, la variabilitat de cobertura i l'exclusió de les regions intròniques dificulten l'anàlisi obligant a fer una aproximació respecte a les regions no cobertes per a detectar la deleció o duplicació d'un fragment genòmic¹¹⁷. La cobertura uniforme proporcionada pel WGS el converteixen en un mètode més adequat a l'hora d'aplicar programes per a detectar CNVs²¹¹. Tot i això, en primera instància i partint d'un exoma negatiu, caldria aprofitar les dades crues per a reanalitzar-les amb un programari específic que permeti la seva detecció. Alguns *softwares* ja han estat desenvolupats per a tal fi, com ara ExomeDepth, CoNIFER o XHMM²¹², i actualment al laboratori de Neurologia Pediàtrica del VHIR s'està treballant per a implantar-los a l'anàlisi de dades WES.

Finalment, en els darrers anys s'ha descrit la presència de mosaïcismes en gens descrits com a causants de defectes del neurodesenvolupament i epilèpsia, tot i que la freqüència d'aparició no estava estimada. Un estudi de principis del 2018 ha establert la identificació de variants patogèniques en mosaicisme somàtic en 9 gens relacionats amb l'epilèpsia (*CDKL5*, *GABRA1*, *GABRG2*, *GRIN2B*, *KCNQ2*, *MECP2*, *PCDH19*, *SCN1A* i *SCN2A*) amb una freqüència del 3,5%²¹³. Aquest fet indica la necessitat de realitzar reanàlisi a tots aquells exomes negatius, baixant el llindar de selecció segons la qualitat de la seqüenciació. D'aquesta manera serà possible la detecció de variants amb una freqüència de l'al·lel mutat inferior al 40% en gens autosòmics dominants i inferior al 80% en gens d'herència recessiva lligada al X²¹⁴.

Tots els exemples descrits anteriorment, tant els relacionats amb l'aparició constant de nous gens o variants de difícil interpretació o detecció, com les limitacions de la seqüenciació exòmica, posen en evidència la necessitat de realitzar actualitzacions del processament de les dades crues de seqüenciació de forma periòdica, per tal d'introduir a la *pipeline* bionfomàtica utilitzada les noves versions del programari d'anàlisi juntament amb les noves dades reportades a la literatura. D'aquesta manera s'augmentaria la detecció de variants de diversos tipus (SNVs, indels, CNVs i mosaics), maximitzant el rendiment de la seqüenciació de l'exoma complet.

2. Estudi de la correlació genotip-fenotip en gens causals d'EIEE

L'elevada heterogenicitat fenotípica i genètica que caracteritza les encefalopaties epilèptiques d'inici precoç en dificulta el diagnòstic, ja que resulta molt complex establir-ne una correlació genotip-fenotip³⁹. No obstant això, existeixen diferents grups de pacients que es poden estudiar en conjunt per tal de determinar, o bé un mateix patró fenotípic a partir d'un mateix gen afectat, o bé les causes que estableixen les diferències clíniques en pacients amb diferents mutacions en un mateix gen.

2.1. GNAO1: trastorn del moviment associat a epilèpsia

El gen *GNAO1* codifica per un receptor acoblat a proteïna G, específicament a la subunitat G α de la proteïna d'unió a GTP. La seva expressió és elevada al cervell i està involucrada en la regulació de l'excitabilitat neuronal i la neurotransmissió a través de modular l'auto-inhibició sinàptica sobre els receptors muscarínics M2/M4, alfa(2) adrenèrgic, mu/delta opioides i GABA β ²¹⁵. Estudis funcionals *in vitro* de mutacions en aquest gen han resultat en una localització citoplasmàtica anormal de la proteïna. Estudis electrofisiològics demostren una alteració en la inhibició del canal de calci tipus N després d'estimular-los amb norepinefrina⁶⁰. Alhora, existeixen diversos models de ratolí per a estudiar *in vivo* diferents alteracions a *GNAO1*. El model deficient per aquest gen presenta crisis epilèptiques ocasionals, alteració severa del control motor i un comportament anormal amb mortalitat precoç postnatal²¹⁶. No obstant això, les mutacions descrites per a *GNAO1* solen ser heterozigotes, per això es va desenvolupar un model murí heterozigot *knock out* que no presentava atacs epilèptics. Així es va generar un segon model heterozigot *knock in* de guany de funció que presentava crisis severes amb descàrregues epileptiformes d'elevada freqüència i mort prematura sobtada, suggerint que les mutacions causants de patologia en humans són de guany de funció²¹⁷.

En el nostre estudi s'ha detectat la variant *de novo* NM_020988: c.596T>C a *GNAO1* que produeix un canvi a la posició 199 de leucina a prolina, modificant una posició altament conservada evolutivament (Figura 25). Els estudis computacionals realitzats per a estudiar l'efecte d'aquesta mutació demostren un defecte significatiu en l'estabilitat de la proteïna final, i consegüentment, podria estar-ne alterant el plegament proteic, especialment del domini GTPasa on se situa la variant, però també de regions pròximes. Estudis posteriors d'altres autors indiquen que l'efecte predit *in silico* implica, tant una reducció dels nivells proteics com una baixa capacitat inhibidora de la subunitat G α , donant lloc a una pèrdua de funció de la proteïna²¹⁸.

En els últims anys s'han descrit fins a 25 pacients amb mutacions a *GNAO1*, incloent-hi el nostre pacient. Majoritàriament, solen ser variants de canvi d'aminoàcid i acostumen a afectar a les regions d'unió de GTP. Les variants heterozigotes a *GNAO1* donen lloc a dos tipus principals de fenotips neurològics en funció de la conseqüència del canvi. Les variants de pèrdua de funció, produeixen EIEE, en canvi, les de guany de funció tenen com a característica clínica principal el trastorn de moviment (Figura 44)²¹⁹.

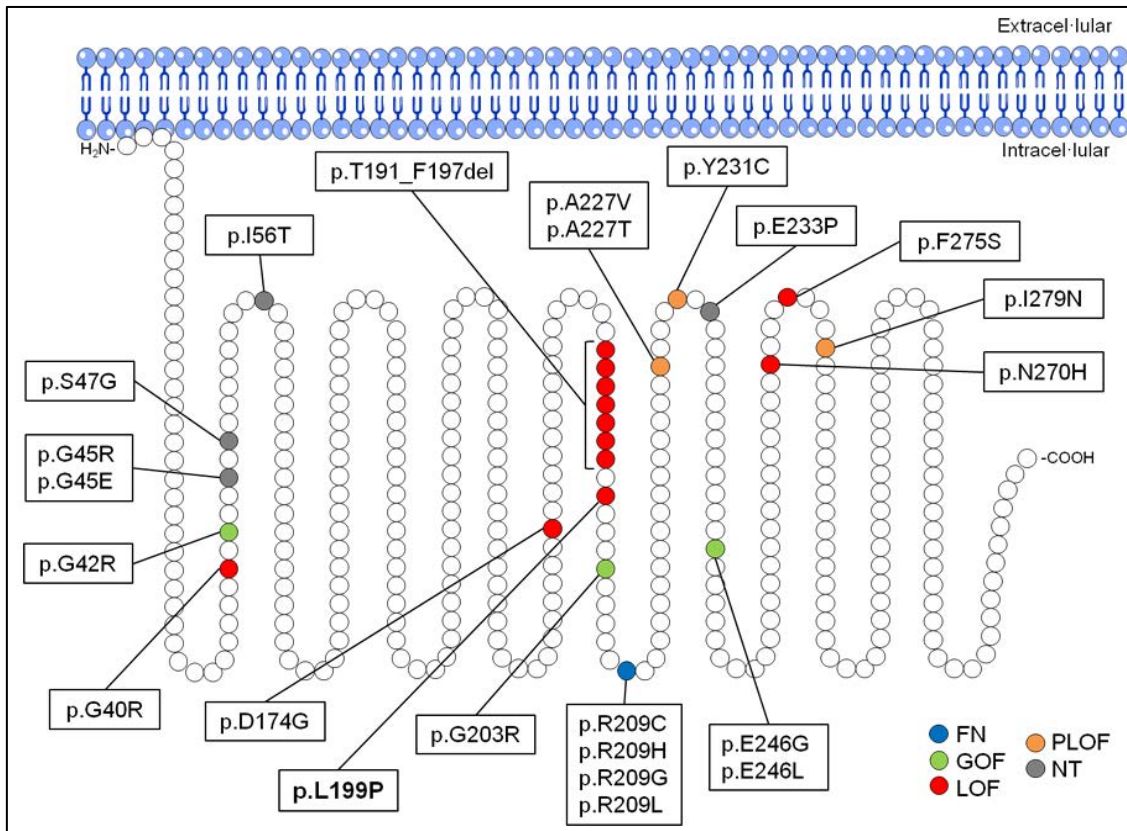


Figura 44 | Topologia de *GNAO1* on s'indiquen les mutacions descrites en pacients EIEE i amb trastorn del moviment. FN (funció normal), GOF (guany de funció), LOF (pèrdua de funció), PLOF (pèrdua parcial de funció) i NT (no testat).

Tal com s'esperaria per la naturalesa de la mutació p.L199P, la pacient estudiada en aquest treball presenta una encefalopatia severa amb crisis epilèptiques neonatals. A l'edat de 21 mesos es troba amb una severa discapacitat, tetraparèsia espàstica, hipotonia axial i amb moviments paroxístmics que impliquen les extremitats i el tronc¹⁷⁵. En aquest estudi es va proposar que *GNAO1* podria estar causant letalitat lligada al sexe, però estudis posteriors han detectat variants en pacients mascles. Independentment del gènere, la majoria d'ells comparteixen un fenotip bastant uniforme que permetria realitzar un diagnòstic diferencial de trastorn hiperkinètic del

moviment. Aquest pot ser paroxístic o no, en un context de retard del desenvolupament i amb possibilitat de patir epilèpsia. D'aquesta manera, la reducció de la variabilitat fenotípica en aquests pacients facilitaria el diagnòstic genètic dirigint l'estudi a la detecció de variants en el gen *GNAO1*, sigui quina sigui la metodologia emprada. Alhora, la caracterització de la naturalesa de la variant permetria predir el tipus de trastorn neurològic que afectarà al portador de la variant. Aquest aspecte és molt rellevant en el context de la medicina de precisió, ja que s'ha descrit que els pacients amb variants a *GNAO1* causants del fenotip associat a trastorn del moviment responen a la DBS (*deep brain stimulation*) a nivell pal·lidal. Aquesta tècnica consisteix en implantar un neuroestimulador que envia estímuls elèctrics a diferents àrees del cervell, i provoca una millora en la qualitat de vida d'aquests pacients²²⁰.

2.2. Encefalopaties epilèptiques associades a *KCNQ2*

El canal de potassi depenent de voltatge regula el corrent M al sistema nerviós central. Aquest és responsable de la regulació, a través de la lenta hiperpolarització per potassi, del potencial de membrana en el punt del llindar d'excitació i de la inhibició de la producció repetitiva de potencials d'acció activadors²²¹. Tal regulació de l'hiperexcitabilitat neuronal es realitza a través d'homotetràmers i heterotetràmers constituïts, principalment, per les subunitats Kv7.2 (*KCNQ2*) i Kv7.3 (*KCNQ3*).

Les encefalopaties epilèptiques causades per mutacions a la subunitat del canal de potassi depenent de voltatge *KCNQ2* presenten una alta variabilitat fenotípica que dificulta l'establiment d'una correlació genotip-fenotip. Múltiples pacients s'han descrit per a aquest trastorn, identificant que els dominis del gen més afectats per variants patogèniques. Aquests són el sensor de voltatge del segment 4, la unitat formadora del porus que alhora conté el filtre de sensibilitat i l'extrem C-terminal que conté els dominis d'unió a PIP₂ i a la calmodulina (CaM)²²². De les quatre mutacions estudiades funcionalment en col·laboració amb el Biofísica Institutua, les variants W270R i G281R es localitzen al segment formador del porus, i en concret, G281R pertany a la regió que constitueix el filtre de selectivitat. L243P queda situada al segment 5, molt proper a la regió formadora de porus, mentre que E130K queda fora de les regions *hotspot* que concentren la majoria de variants patogèniques (Figura 45). Això demostraria, que malgrat haver-se reportat que les variants concentrades en certes regions, com ara al domini del sensor de voltatge, correlacionarien el domini afectat amb la severitat de la malaltia²²³, en general no es pot assumir tal premissa.

Una segona característica acceptada de forma generalitzada per a les epilèpsies causades per variants a *KCNQ2* és la descripció de l'haploinsuficiència causada per mutacions en un sol al·lel. L'estructura tetramèrica dels canals *Kv7* fan altament factible l'alteració de la funcionalitat de tot el complex com a conseqüència de la incorporació d'una sola subunitat defectuosa, donant lloc a un efecte de supressió de la funció dominant negatiu²²². No obstant això, l'estudi funcional realitzat en aquest treball ha detectat únicament dues variants (E130K i G281R) amb un clar efecte dominant negatiu (Figura 30B) sobre el tetràmer format únicament per *Kv7.2*. Cap efecte significant s'ha detectat quan s'ha expressat la variant en combinació amb *Kv7.3* i *Kv7.2 wildtype* per tal de mimetitzar la configuració fisiològica predominant del corrent M al cervell. D'aquesta manera, els resultats d'aquest estudi tampoc coincideixen completament amb la hipòtesi que postula que les EIEE causades per variants a *KCNQ2* requereixen la pèrdua del corrent M com a conseqüència dels efectes dominants negatius de les mutacions en aquest gen. De fet, altres treballs ja han considerat mecanismes alternatius a aquest, com ara variants amb efecte de guany de funció com a causa d'encefalopatia epilèptica d'inici precoç²²⁴.

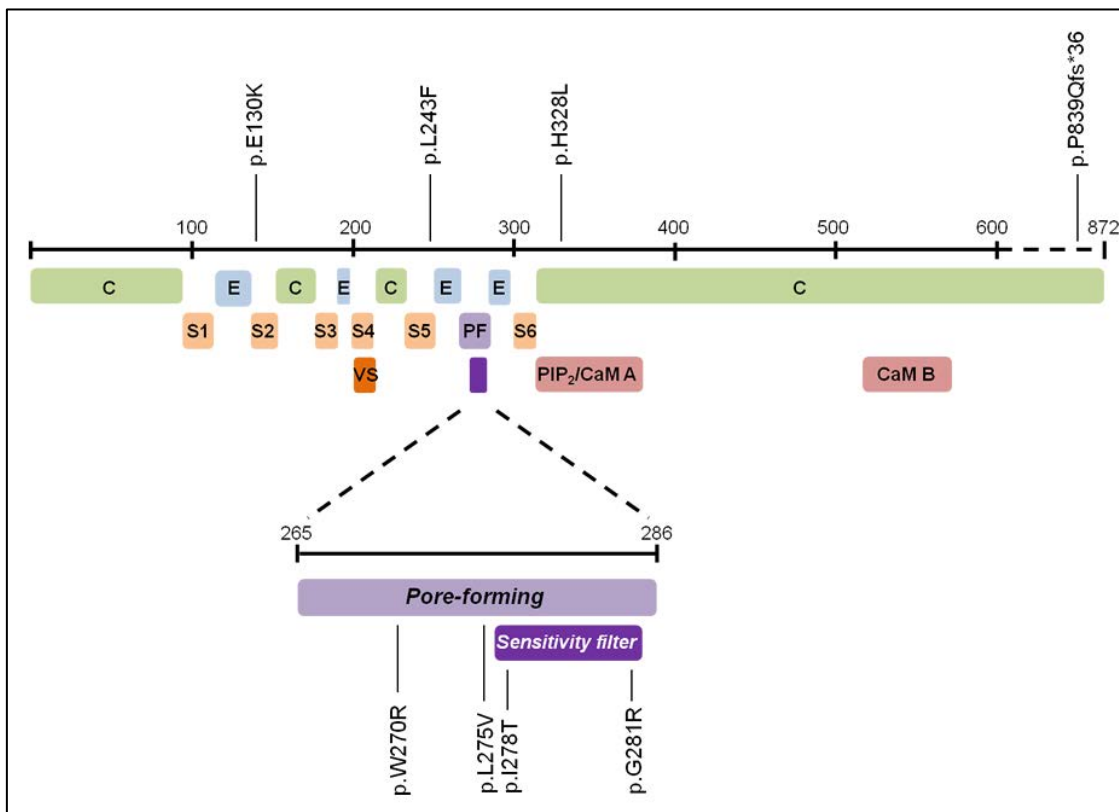


Figura 45 | Localització de les variants *KCNQ2* detectades en els diferents dominis de la proteïna. C (regió citoplasmàtica), E (regió extracel·lular), S (segment transmembrana), PF (regió formadora de por o *pore-forming*), VS (sensor de voltatge), PIP₂/CaM A (domini d'unió a PIP₂ i calmodulina proximal), CaM B (domini d'unió a calmodulina distal).

Els estudis funcionals realitzats en aquest treball van destinats a analitzar l'impacte de quatre mutacions en la subunitat 2 del canal de potassi sobre la densitat de corrent, la dependència de voltatge i la sensibilitat a PIP₂ en diferents combinacions amb les subunitats *wildtype* Kv7.2 i Kv7.3. L'objectiu és determinar si l'efecte sobre la funcionalitat del canal i el corrent M correlacionen amb la gravetat del fenotip d'aquests pacients afectes d'encefalopatia epilèptica. Els resultats obtinguts, però, no demostren una homogeneïtat en l'efecte produït entre tots ells, a excepció del corrent en la conformació homomèrica per Kv7.2, suggerint que podria ser principalment l'alteració d'aquesta subunitat la que determinés l'aparició de l'encefalopatia.

El pacient portador de la variant G281R presenta el fenotip més sever, tal com ja s'havia descrit prèviament en altres treballs²²⁵, amb aparició de crisis al segon dia de vida i amb una evolució psicomotora amb absència d'adquisicions. Aquesta variant exerceix un efecte dominant negatiu en combinació amb Kv7.2 o Kv7.3, però la funció es recupera en combinar amb ambdues subunitats *wildtype*. Es creu que aquest efecte és degut a l'assemblatge aleatori dels complexos, els quals per probabilitat, només afegiran en el seu 25% dues subunitats mutades, quantitat necessària per a eliminar el corrent dels heterotetràmers Kv7.2/Kv7.3²²⁶. De forma similar, la variant E130K també presenta un efecte dominat negatiu en combinació amb la subunitat *wildtype* Kv7.2, però la funció es recupera parcialment en combinació amb Kv7.3 i en un 60% en combinació amb les dues subunitats simultàniament. El pacient diagnosticat amb aquesta variant presenta un fenotip bastant més lleu que l'anterior.

Les dues mutacions restants no tenen un efecte dominant negatiu rellevant, ja que l'activitat del canal és recuperada en combinació amb Kv7.3. A més, en configuració fisiològica Kv7.2/mut/Kv7.3 s'obtenen densitats de corrent semblants a la forma *wildtype*. La principal diferència entre aquests dos canvis és la diferencial sensibilitat a PIP₂, augmentada en W270R quan es combina amb Kv7.3, efecte que es perd amb la configuració Kv7.2/W270R/Kv7.3. Malgrat la similitud a nivell *in vitro* entre aquestes dues variants, el fenotip dels pacients que les presenten resulta de major severitat en W270R. Això suggereix una possible relació entre el domini formador del porus i la regió d'unió a PIP₂, que explicaria el potencial paper d'aquest en el grau de severitat de l'encefalopatia epilèptica.

Si extrapolem aquesta informació obtinguda de l'estudi funcional de mutacions a *KCNQ2* a la resta de variants detectades en aquest gen a la cohort estudiada en aquest treball (Figura 45), trobem L275V (pacient 75) situada al segment formador del

porus, tan sols a 5 aminoàcids de distància de W270R, localitzat a la mateixa regió. En aquest mateix domini, però coincidint també amb el filtre de selectivitat del canal, se situa la variant I278T (pacient 59), a tres aminoàcids de G281L. Les variants H328L i P839Qfs*36 (pacients 79 i 55), se situen a l'extrem citoplasmàtic C-terminal de la seqüència proteica, però és la variant que afecta la posició 328 que coincideix amb el domini d'unió a PIP₂ i CaM A. Tots els casos pateixen d'EIEE, però la severitat varia, sent més lleu en els pacients 75 i 55. El pacient 75 presenta encefalopatia amb un retard psicomotor moderat sense trets autistes aparents i sense anomalies estructurals (Taula 6), cosa que resulta en un fenotip lleugerament menys sever que en la resta de pacients. En aquest cas, aquesta petita reducció de la severitat, malgrat ser considerada EIEE, no seria l'esperada si es té en compte la posició en la seqüència proteica i la proximitat a la variant W270R, la qual produeix un fenotip amb retard psicomotor sever, retard en la mielinització i atròfia frontal bilateral moderada. La mutació P839Qfs*36 (pacient 55), en canvi, resulta en encefalopatia amb retard psicomotor lleu, absència de trets autistes i sense alteració estructural del cervell (Taula 6). Aquesta variant modifica la seqüència en els 37 aminoàcids finals de la proteïna, i no afecta cap domini conegut fins ara, raó per la qual es podria explicar millor la reducció de la severitat d'aquest fenotip.

Finalment, l'herència de la variant és un dels aspectes més rellevants a tenir en compte a l'intentar explicar la correlació genotip-fenotip de les variants en *KCNQ2*. En el present estudi, la majoria de variants detectades han estat d'aparició espontània, a excepció de les variants L243F, d'herència materna, i P839Qfs*36 d'herència paterna. La història familiar dels pacients portadors d'aquestes variants contempla la presència de crisis epilèptiques neonatals benignes (BFNS) explicada per la transmissió de la variant al llarg de les generacions. Aquest fet planteja un problema a l'hora d'afirmar que les variants trobades en els pacients siguin l'única explicació a l'encefalopatia epilèptica d'inici precoç, de fenotip més sever que BFNS. Una possible hipòtesi que podria explicar el diagnòstic d'EIEE a partir de variants associades a BFNS és el concepte de factors modificadors, el qual postula l'existència de variants genètiques com a potencials factors de susceptibilitat per a provocar encefalopatia epilèptica²²⁷. Aquest fenomen consistiria en la presència de variants en gens anomenats "de susceptibilitat" que provocarien interaccions gèniques amb altres gens coneguts com a causants de la malaltia que, no només podrien desencadenar-la incrementant-ne la severitat, sinó que podrien explicar la gran variabilitat de fenotip que hi ha entre pacients afectes per variants en un mateix gen, i inclús per una mateixa variant. Alhora, un altre factor similar que podria contribuir a la modificació de l'efecte d'una

determinada mutació és la dinàmica de l'epigenètica, la qual ja ha estat proposada com a factor clau en la determinació de la variabilitat del fenotip en moltes patologies²²⁸. Tota aquesta informació suggereix la necessitat de seguir estudiant els múltiples factors que influeixen en l'expressió de *KCNQ2*, així com de molts altres gens, per tal d'arribar a establir una bona correlació genotip-fenotip que faciliti l'abordatge clínic i genètic dels pacients afectats per encefalopaties epilèptiques d'inici precoç.

3. La sobreexpressió de RNA en peix zebra com a model animal per a la ràpida selecció de nous gens candidats

De l'estudi NGS de pacients amb EIEE han sorgit múltiples hipòtesis relacionades amb potencials gens candidats que podrien estar causant el fenotip epilèptic que presenten els diferents individus. Així com el diagnòstic de pacients amb variants no descrites en gens prèviament associats resulta molt senzill simplement amb l'estudi *in silico* de la variant, en el cas de potencials gens nous es requereixen estudis addicionals en models *in vitro* o *in vivo* per a comprovar la seva contribució al fenotip.

El peix zebra ha estat descrit com a un model d'elecció per a l'estudi *in vivo*, no només de les epilèpsies²²⁹ sinó també de malalties en general, tan neurològiques²³⁰ com d'altres²³¹. La sobreexpressió de RNA directa en l'ou del peix zebra és una forma ràpida d'obtenir un model transitori, i aparentment, una bona aproximació per a estudiar de forma ràpida i senzilla la potencial alteració fenotípica resultant de variants en diferents gens a partir de la comparació de les larves injectades amb el RNA *wildtype* i el mutat. No obstant això, el conjunt de resultats obtinguts en aquest estudi suggereixen que en cap d'aquests casos el model de sobreexpressió de cRNA humà afecta el comportament dels peixos, inclús en els gens ja associats a epilèpsia, com són les subunitats del canal de potassi. L'extensiu ús del peix zebra com a model animal porta a plantejament de quina és la raó dels resultats negatius del present estudi: és realment la mutació innòcua per al peix zebra o ha estat errònia l'estratègia escollida?

La majoria de tècniques descrites en peix zebra²³² tracten de modificar el propi genoma del peix. En l'estratègia proposada en aquest treball, el repte era introduir una seqüència de cRNA humana per tal de sobreexpressar la proteïna final en comparació amb la pròpia del peix, per així competir-hi. Després de la recerca exhaustiva de les diferents aproximacions possibles per a estudis d'aquest tipus, és altament probable que l'estratègia de la sobreexpressió, tal com ha estat dissenyada, no funcioni; ja que la proteïna del peix per si sola podria ser suficient per a realitzar la funció fisiològica. Addicionalment, com es mostra als alineaments realitzats entre les diferents formes del peix zebra i humà (Figures 32-34), les seqüències són similars, però no iguals. Així, existiria la possibilitat que les proteïnes resultants de les dues espècies no siguin capaces d'interaccionar, resultant en què la forma humana no pugui afectar a la funció de la proteïna *wildtype* del peix. A més, podria donar-se també el cas, que la injecció d'altres concentracions de cRNA humà fos tòxica per als embrions, ja que en els casos on s'han injectat concentracions elevades de cRNA, la mortalitat dels embrions s'ha

incrementat exponencialment en comparació amb els experiments on s'ha injectat una menor dosi de cRNA.

També cal tenir en compte, a l'hora de plantejar experiments de sobreexpressió de RNA en peix zebra, la naturalesa de les variants a estudiar. El mecanisme fisiopatològic pel qual un canvi en un gen donarà lloc a un efecte patogènic és important per predir l'èxit d'aquests tipus d'experiments. Caldria esperar que aquests només fossin útils en casos on la variant actua a través d'un guany de funció o un efecte dominant negatiu, on l'al·lel defectuós introduït a l'organisme sobreposa la seva funció sobre l'al·lel sa de l'organisme injectat. En canvi, quan la variant actua a través de pèrdua de funció o haploinsuficiència, no és presumible que aquest model funcioni. És per aquest motiu que, en casos on el mecanisme pel qual actua una variant és desconegut, tal com succeeix en els casos estudiats en aquest treball, utilitzar aquesta aproximació resulta altament arriscat.

Per altra banda, una explicació addicional als problemes detectats al realitzar aquests experiments són les condicions del registre de comportament. Tal com està descrit, les condicions de les larves determinen els resultats i minimitzen la variabilitat²³³. En el present estudi, el protocol de registre de comportament, juntament amb l'aparell utilitzat, es trobaven en fase d'implementació. El fet que la comparació entre els diferents grups control no injectats utilitzats en els diferents experiments mostri una alta variabilitat entre registres i poblacions, teòricament iguals, fa pensar que independentment dels problemes derivats pròpiament de l'aproximació de sobreexpressió, pugui haver-hi factors a tenir en compte del mateix procés d'estandardització en què es trobava la metodologia emprada. Aquests podien contribuir a l'elevada variabilitat i la manca de resultats entre grups.

Existeixen altres models per a assajar la patogenicitat d'una variant. En primer lloc, com s'ha comentat a l'apartat 1.1.1 d'aquesta discussió, una opció són els anomenats minigens. Aquests són constructes transfectats en línies cel·lulars estables que permeten estudiar *in vitro* l'efecte d'una variant determinada. Aquest sistema fa possible l'estudi quan no és possible obtenir cèl·lules del pacient, però precisament aquest és el seu major desavantatge, ja que no sempre és correcte inferir-ne el resultat a l'organisme viu. Una forma de solucionar aquest problema és treballar directament amb cèl·lules IPs. Aquestes s'obtenen a partir de teixit accessible del pacient, com ara fibroblasts obtinguts d'una biòpsia de pell, per tant, contenen el defecte tal com es troba en l'individu afecte²³⁴. Tot i això, aquest mètode segueix sent

un model *in vitro*, pel que es perden totes aquelles interaccions superiors a nivell d'organisme sencer que molts cops són importants per entendre el mecanisme fisiopatològic d'una mutació. A més, la generació d'iPS a partir de cèl·lules de pacients, tot i ser una opció molt prometedora, no es podria definir com a una opció de selecció ràpida de variants interessants. A nivell *in vivo*, a part del peix zebra, també s'han realitzat experiments en *Drosophila Melanogaster*, ja que els mecanismes cel·lulars i subcel·lulars del sistema nerviós de la mosca tenen un gran paral·lelisme amb el dels humans, especialment a nivell dels components d'excitabilitat de membrana. Malgrat això, la mosca segueix sent un organisme molt més senzill i encara més allunyat filogenèticament de l'humà que el peix. Per últim, la generació de models transgènics *in vivo* on l'eliminació de l'expressió d'un gen (*knock out*) o la introducció d'una modificació al genoma (*knock in*) de forma dirigida i estable representa el millor mètode per a estudiar l'efecte d'una mutació sobre un organisme viu. Les tècniques d'edició del genoma han evolucionat notablement en els últims anys, i tot i que la implementació de la tecnologia CRISPR/Cas9 implica una gran millora per al desenvolupament d'aquests models²³⁵, la seva generació encara requereix una inversió de temps i recursos massa elevada per a poder convertir-se la tècnica d'elecció per al cribratge ràpid de mutacions potencialment patogèniques.

Amb tot això, el desenvolupament d'un model *in vivo* per a una selecció ràpida, tant de noves mutacions en gens prèviament associats a les EIEE, com de potencials nous gens causants de fenotip, segueix sent una necessitat important en l'estudi d'aquestes malalties. El peix segueix sent una bona opció, i molt probablement gràcies a les noves tècniques en desenvolupament per a l'edició genòmica²³⁶, juntament amb l'aportació de tecnologies més precises per a dur-les a terme, permetran que en poc temps el model de cribratge *in vivo* de nous gens candidats sigui possible.

4. Associació de la variant p.P380L a CHRM1 al fenotip EIEE

El receptor muscarínic d'acetilcolina tipus 1 (CHRM1) es troba situat a la membrana cel·lular de les neurones piramidals CA1 i de les interneurons inhibidores del neocortex i l'hipocamp, regulant el balanç excitació-inhibició d'aquesta regió del cervell²³⁷. Aquest control el desenvolupa a través de la regulació del corrent M generat pels canals de potassi activats per voltatge (Kv)²³⁸.

Quan el corrent M està actiu, Kv té units PIP₂ i a calmodulina (CaM) als seu extrem C-terminal per a afavorir l'assemblatge i la localització a membrana del tetràmer que forma el canal de potassi i així potenciar la sortida de ions potassi a l'espai extracel·lular, efecte que hiperpolaritza la membrana²³⁹. L'activació de CHRM1 induïx l'activació d'una fosfolipasa C (PLCB1), la qual hidrolitza PIP₂ donant lloc a diacilglicerol (DAG) i inositol-trifosfat (IP₃). DAG, alhora, activa la fosfoquinasa C (PKC), la qual fosforil·la residus serina dels dominis d'unió a PIP₂ de KCNQ2, reduint-ne l'afinitat. Per altra banda, IP₃ activa els canals de calci del reticle endoplasmàtic per a augmentar la concentració de calci citoplasmàtic. Aquest augment de calci, en primer lloc potencia l'activitat de PKC, i en segon lloc, interacciona amb la calmodulina reduint la seva afinitat pels dominis d'unió del canal de potassi (Figura 46). Aquest procés inhibeix la funció del canal de potassi degut a la reducció de PIP₂ disponible a la cèl·lula per l'acció de PLCB1, així com per la pèrdua d'afinitat de PIP₂ i calmodulina pels dominis d'unió al canal²⁴⁰.

Amb aquest mecanisme, el receptor d'acetilcolina M1 regula el procés d'excitació-inhibició, influïnt en el processament de la informació al sistema nerviós central. Per una banda, la hiperpolarització inhibeix l'activitat de les neurones piramidals. En canvi, quan es produeix l'activació del receptor per un estímul d'acetilcolina, s'inactiva el canal de potassi desencadenant la despolarització de la neurona. Aquesta transmet el potencial d'acció, alhora que afavoreix l'activació dels canals de calci responsables de reomplir els dipòsits interns cel·lulars de calci per preparar a la cèl·lula per a futures hiperpolaritzacions. Aquests mecanismes també contribueixen al control de la dinàmica d'activació del potencial d'acció durant els períodes d'activitat sostinguda²⁴¹.

El pacient 24 estudiat en aquest treball, presenta una variant *de novo missense* al gen que codifica pel receptor muscarínic d'acetilcolina tipus 1. L'estudi experimental d'aquest canvi demostra que l'alteració produïda en la proteïna final afecta al tràfic cel·lular del receptor, ja que queda retingut a l'espai intracel·lular sense arribar a la membrana, localització on desenvolupa la seva funció (Figura 38). Dels resultats

obtinguts s'extreu que el defecte que estaria impeding aquest tràfic cel·lular, seria una alteració en la maduració proteica en termes de glicosilació complexa adquirida a l'aparell de Golgi (Figura 39), mentre que la dimerització no es veuria afectada. La posició mutada (Pro380) en el pacient es troba molt propera a una regió clau en la seva estructura, per a la unió del lligand i conseqüent funcionalitat del receptor²⁴². El canvi de prolina a leucina, eliminaria un colze rellevant a nivell estructural per a l'hèlix implicada en aquestes funcions, cosa que podria estar alterant el seu plegament. Un error en l'estructura de la proteïna, o bé dificultaria el correcte tràfic de la proteïna cap a l'aparell de Golgi, o bé podria estar alterant la pròpia glicosilació a Golgi. En ambdós casos, l'incorrecte processament de CHRM1 alteraria el seu transport a membrana, cosa que impediria la correcta senyalització del receptor (Figura 41), i la conseqüent pèrdua de la seva funció.

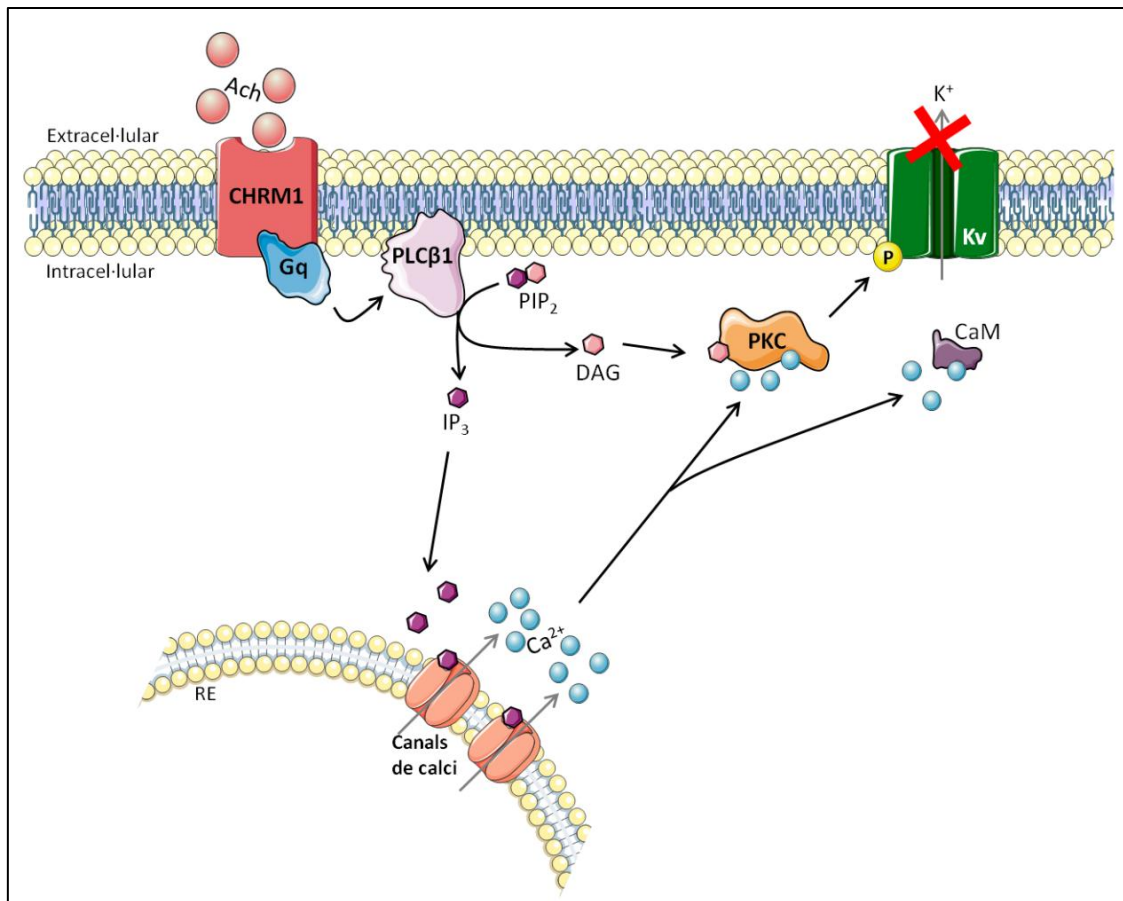


Figura 46 | Via de senyalització colinèrgica activada pel receptor muscarínic d'acetilcolina tipus 1 (CHRM1). L'activació del CHRM1 per acetilcolina desencadena una cascada de missatgers secundaris que inhibeixen l'activitat del canal de potassi dependent de voltatge, i com a conseqüència produeix la despolarització de la cèl·lula. Ach (acetilcolina), Gq (proteïna Gq), PLCβ1 (fosfolipasa C beta-1), PIP₂ (fosfatidilinositol 4.5 bifosfat), IP₃ (inositol-trifosfat), RE (reticle endoplasmàtic), DAG (diacilglicerol), PKC (fosfoquinasa C), CaM (calmodulina), P en un cercle groc (fosforil·lació de Kv), Kv (canal de potassi dependent de voltatge).

CHRM1 s'ha descrit com el principal receptor muscarínic d'acetilcolina a nivell postsinàptic a l'hipocamp. Els models de ratolí demostren que l'eliminació d'aquest receptor desequilibra l'excitabilitat en l'individu, mentre que l'efecte de la pèrdua de CHRM3 i CHRM5 es veu compensat per l'acció de M1²⁴³. La pèrdua de l'activitat d'aquest receptor produeix una alteració en el control del corrent M, la qual cosa implicaria una hiperpolarització permanent de la neurona. Aparentment, aquest efecte suggereix una protecció envers l'hiperexcitabilitat, però estudis en variants de guany de funció dels canals de potassi demostren que la hiperpolarització permanent de la neurona piramidal li proporciona una major susceptibilitat a l'excitabilitat degut als mecanismes compensatoris de la cèl·lula. El sosteniment de potencials de membrana per sota del llindar d'activació del potencial d'acció, produeixen un augment de l'expressió de canals de sodi a la membrana cel·lular, i per tant, una entrada massiva de sodi a la cèl·lula. Això no és suficient per superar el llindar d'excitabilitat, però la predisposa davant d'un estímul despolaritzant²⁴⁴. Una segona conseqüència de la pèrdua de control del corrent M és la hiperpolarització permanent de les neurones inhibidores, les quals deixaran de desenvolupar el seu paper fisiològic de control de l'excitabilitat de les neurones principals¹⁷⁸. Aquesta inhibició selectiva d'interneurones, juntament amb la susceptibilitat descrita a les neurones principals piramidals, resulta en un desequilibri en el balanç d'excitació-inhibició hipotalàmic i cortical, predisposant a l'individu a patir hiperexcitabilitat davant de qualsevol estímul.

L'encefalopatia epilèptica desencadenada per la pèrdua de la senyalització a la via colinèrgica ja ha estat descrita en pacients amb alteracions genètiques homozigotes que aboleixen la funció de *PLCB1*^{55,245}. Aquesta proteïna és activada per la proteïna Gq vinculada a l'activitat de CHRM1 davant l'estímul d'acetilcolina. Per tant, l'alteració de la senyalització de la via, deguda a la variant P380L heterozigota estudiada en aquest treball (Figura 42), correlacionaria amb l'efecte descrit en els pacients amb variants a *PLCB1*. Aquesta associació, juntament amb els resultats obtinguts dels estudis funcionals, permet concloure que la variant P380L a CHRM1 present en el pacient estudiat en aquest treball és patogènica. Això suggereix la implicació del receptor muscarínic d'acetilcolina tipus 1 com a causant d'encefalopatia epilèptica d'inici precoç.

La utilització de les tècniques de seqüenciació massiva permet superar, en gran part, les limitacions de les tècniques tradicionals per a estudiar les malalties amb una alta

variabilitat fenotípica i genètica. L'estudi de les encefalopaties epilèptiques d'inici precoç a través de NGS, no només millora el diagnòstic dels pacients, sinó que també contribueix a plantejar noves línies de recerca amb l'objectiu final d'establir correlacions genotip-fenotip. Alhora, la magnitud de les dades obtingudes en aquests estudis permeten detectar nous gens candidats, els quals a partir de validacions funcionals *in vitro* o *in vivo*, podran ser proposats com a gens associats a EIEE.

CONCLUSIONS

1. Les noves tècniques de seqüenciació massiva faciliten l'anàlisi de les causes genètiques de les encefalopaties epilèptiques d'inici precoç degut a la capacitat per a estudiar múltiples gens d'interès de forma simultània i amb eines bioinformàtiques, reduint el cost i el temps invertit i minimitzant els errors de l'anàlisi visual de l'investigador.
2. La seqüenciació de l'exoma complet augmenta el diagnòstic molecular de pacients EIEE, tant per a la detecció de variants en gens prèviament associats com en nous gens candidats, gràcies a la possibilitat d'analitzar les regions codificants de tot el genoma. És mandatori revisar les dades periòdicament per a detectar variants prèviament descartades, a mesura que s'amplien el nombre de gens i tipus de variants associats al fenotip epilèptic.
3. L'estudi de trios permet optimitzar l'anàlisi de variants en gens coneguts com a causants del fenotip, ja que incorpora la informació sobre l'herència esperada. També millora la detecció de variants en nous gens candidats a contribuir al fenotip epilèptic, ja que permet filtrar segons la segregació familiar, reduint considerablement el nombre de gens a estudiar.
4. El *pipeline* utilitzat per al processament de les dades NGS és un factor clau en els resultats obtinguts, ja que existeixen múltiples *softwares* que utilitzen diferents paràmetres. La renovació periòdica del processament bioinformàtic de les variants obtingudes és imprescindible per a incorporar les actualitzacions, tant del programari com les descrites a la literatura, i maximitzar el rendiment de les dades crues resultants de cada exoma.
5. Les limitacions de la seqüenciació de l'exoma complet son la dificultat de detectar variants de nombre de còpia i la falta de cobertura de les regions reguladores i intròniques no codificants. En els últims anys, aquests dos tipus de variants s'estan associant a alteracions que produirien la malaltia, per tant, els pacients negatius en l'anàlisi i reanàlisi de les dades WES haurien de seguir sent estudiats a través del transcriptoma o genoma complet per a descartar la presència d'aquestes variants.

6. El correcte fenotipat dels pacients EIEE és determinant per a dirigir correctament la sospita diagnòstica i augmentar les probabilitats d'obtenir resultats positius en la seqüenciació NGS. L'èxit de diagnòstic molecular resulta inversament proporcional a l'edat de debut de les crisis epilèptiques i al nombre de proves genètiques realitzades de forma prèvia a l'exoma complet.

7. La difícil correlació genotip-fenotip en els pacients amb encefalopatia d'inici precoç recau en la ampla variabilitat fenotípica i genètica que la caracteritza. No obstant, existeix algun cas aïllat, com *GNAO1*, on es postula una potencial associació entre la naturalesa de la mutació i les manifestacions clíniques. La contribució de factors modificadors genètics o epigenètics a l'epilèpsia es postula com a potencial explicació a la gran diversitat fenotípica implicada a les EIEE.

8. La sobreexpressió de RNA en peix zebra no és una bona estratègia per a testar i filtrar de forma efectiva i ràpida les variants potencialment patogèniques detectades en els pacients EIEE. Malgrat això, el desenvolupament d'un mètode per a tal fi és imprescindible per a poder seleccionar, d'entre totes les variants candidates, aquelles amb potencial patogènic real.

9. L'estudi funcional dels nous gens candidats és imprescindible per a determinar-ne la contribució al fenotip epilèptic. Aquests han determinat la patogenicitat de la variant P380L en el receptor muscarínic d'acetilcolina tipus 1, suggerint l'associació d'alteracions en aquest gen com a nova causa d'encefalopatia epilèptica d'inici precoç.

10. Els avanços en l'optimització de les tècniques NGS i la recerca en gens implicats en les EIEE permeten descriure nous mecanismes fisiopatològics implicats en el fenotip epilèptic. Això és imprescindible per a poder desenvolupar noves estratègies de medicina personalitzada per a tractar de forma efectiva aquests pacients.

BIBLIOGRAFIA

1. Avena-Koenigsberger, A., Misic, B. & Sporns, O. Communication dynamics in complex brain networks. *Nat. Rev. Neurosci.* **19**, 17–33 (2017).
2. Lee, J. H., Kreitzer, A. C., Singer, A. C. & Schiff, N. D. Illuminating Neural Circuits: From Molecules to MRI. *J. Neurosci.* **37**, 10817–10825 (2017).
3. Bullock, T. H. *et al.* The neuron doctrine, redux. *Science (80-.)*. **310**, 791–793 (2005).
4. Vulovic, M., Divac, N. & Jakovcevski, I. Confocal Synaptology: Synaptic Rearrangements in Neurodegenerative Disorders and upon Nervous System Injury . *Frontiers in Neuroanatomy* **12**, 11 (2018).
5. Südhof, T. C. & Malenka, R. C. Understanding Synapses: Past, Present, and Future. *Neuron* **60**, 469–476 (2008).
6. Alberts, B. *et al.* El sistema nervioso. in *La Celula* 1087–1180 (1986).
7. Südhof, T. C. Synaptic Neurexin Complexes: A Molecular Code for the Logic of Neural Circuits. *Cell* **171**, 745–769 (2017).
8. Mathews, C. K., Van Holde, K. & Ahern, K. *Bioquímica*. (Pearson Addison Wesley, 2002).
9. Coyle, J. E. & Nikolov, D. B. GABARAP: Lessons for synaptogenesis. *Neuroscientist* **9**, 205–216 (2003).
10. Moss, S. J. & Smart, T. G. Constructing inhibitory synapses, *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 240–250 (2001).
11. Scannevin, R. H. & Huganir, R. L. Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**, 133–141 (2000).
12. Camfield, P. R. & Camfield, C. S. Pediatric Epilepsy : An Overview. in *Pediatric Neurology. Principles and Practice* 703–789 (Elsevier Inc, 2012).
13. Newman, E. L., Gupta, K., Climer, J. R., Monaghan, C. K. & Hasselmo, M. E. Cholinergic modulation of cognitive processing: insights drawn from computational models. *Front. Behav. Neurosci.* **6**, 1–19 (2012).
14. Haam, J. & Yakel, J. L. Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. *J. Neurochem.* **142**, 111–121 (2017).
15. Russell, S. A. & Bashaw, G. J. Aon guidance pathways and the control of gene expression. *Dev. Dyn.* 1–35 (2017). doi:10.1002/dvdy.24609
16. Lu, W., S, B.-C. & Li, J. Regulation of GABAergic synapse development by postsynaptic membrane proteins. *Brain Res Bull* **129**, 30–42 (2017).
17. Kim, S., Kim, H. & Um, J. W. Synapse development organized by neuronal activity-regulated immediate-early genes. *Exp. Mol. Med.* **50**, 1–7 (2018).
18. Sassoè-Pognetto, M. & Patrizi, A. The Purkinje cell as a model of synaptogenesis and synaptic specificity. *Brain Res. Bull.* **129**, 12–17 (2017).
19. Frej, J. A. & Stoekli, E. T. SynCAMs – From axon guidance to neurodevelopmental disorders. *Mol. Cell. Neurosci.* **81**, 41–48 (2017).
20. Stoekli, E. Where does axon guidance lead us? *F1000Research* **6**, 78 (2017).
21. Aronica, E. & Mühlebner, A. Neuropathology of epilepsy. *Handb. Clin. Neurol.* **145**, 193–216 (2017).

22. Chang, R. S. kwan, Leung, C. Y. W., Ho, C. C. A. & Yung, A. Classifications of seizures and epilepsies, where are we? – A brief historical review and update. *J. Formos. Med. Assoc.* **116**, 736–741 (2017).
23. Fisher, R. S. *et al.* Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy(ILAE) and the International Bureau for Epilepsy(IBE). *Epilepsia* **46**, 470–472 (2005).
24. Fisher, R. S. *et al.* ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* **55**, 475–482 (2014).
25. Falco-Walter, J. J., Scheffer, I. E. & Fisher, R. S. The new definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy Res.* **139**, 73–79 (2018).
26. Pitkänen, A., Lukasiuk, K., Dudek, F. E. & Staley, K. J. Epileptogenesis. 1–17 (2015).
27. Lasoń, W., Chlebicka, M. & Rejdak, K. Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action. *Pharmacol. Reports* **65**, 787–801 (2013).
28. Łukawski, K. *et al.* Mechanisms of epileptogenesis and preclinical approach to antiepileptogenic therapies. *Pharmacol. Reports* **70**, 284–293 (2018).
29. Mormann, F. & Jefferys, J. G. R. Evidence of an inhibitory restraint of seizure activity in humans. *Nat. Commun.* **3**, 100–102 (2012).
30. Gunn, B. G. & Baram, T. Z. Stress and Seizures: Space, Time and Hippocampal Circuits. *Trends Neurosci.* **40**, 667–679 (2017).
31. Fisher, R. S. The New Classification of Seizures by the International League Against Epilepsy 2017. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **17**, 1–6 (2017).
32. Fisher, R. S. *et al.* Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia* **58**, 531–542 (2017).
33. Scheffer, I. E. *et al.* ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* **58**, 512–521 (2017).
34. 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* **51**, 676–685 (2010).
35. Khan, S. & Al Baradie, R. Epileptic Encephalopathies: An Overview. *Epilepsy Res. Treat.* **2012**, 1–8 (2012).
36. von Deimling, M., Helbig, I. & Marsh, E. D. Epileptic Encephalopathies—Clinical Syndromes and Pathophysiological Concepts. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **17**, (2017).
37. Berg, A. T., Tarquinio, D. & Koh, S. Early life epilepsies are a co-expression of developmental brain disorders. *Semin. Pediatr. Neurol.* (2017). doi:10.1016/j.spen.2017.10.008
38. OHTAHARA, S., ISHIDA, T. & OKA, E. *On the Specific Age Dependent Epileptic Syndrome: The Early-Infantile Epileptic Encephalopathy with Suppression-Burst. No To Hattatsu* **8**, (1976).
39. Tavyev Asher, Y. J. & Scaglia, F. Molecular bases and clinical spectrum of early infantile epileptic encephalopathies. *Eur. J. Med. Genet.* **55**, 299–306 (2012).

40. Katsarou, A. M., Galanopoulou, A. S. & Moshé, S. L. Epileptogenesis in neonatal brain. *Semin. Fetal Neonatal Med.* (2018). doi:10.1016/j.siny.2017.12.004
41. Howard, M. A. & Baraban, S. C. Catastrophic Epilepsies of Childhood. *Annu. Rev. Neurosci.* **40**, 149–166 (2017).
42. Holmes, G. L. Effect of Seizures on the Developing Brain and Cognition. *Semin. Pediatr. Neurol.* **23**, 120–126 (2016).
43. Nickels, K. C. & Wirrell, E. C. Cognitive and Social Outcomes of Epileptic Encephalopathies. *Semin. Pediatr. Neurol.* **24**, 264–275 (2017).
44. Scheffer, I. E. *et al.* X-linked myoclonic epilepsy with spasticity and intellectual disability: Mutation in the homeobox gene ARX. *Neurology* **59**, 348–356 (2002).
45. Weaving, L. S. *et al.* Mutations of CDKL5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 1079–93 (2004).
46. Molinari, F. *et al.* Mutations in the mitochondrial glutamate carrier SLC25A22 in neonatal epileptic encephalopathy with suppression bursts. *Clin. Genet.* **76**, 188–194 (2009).
47. Saitsu, H. *et al.* De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat. Genet.* **40**, 782–788 (2008).
48. Writzl, K. *et al.* Early onset West syndrome with severe hypomyelination and coloboma-like optic discs in a girl with SPTAN1 mutation. *Epilepsia* **53**, 106–110 (2012).
49. Fujiwara, T. *et al.* Mutations of sodium channel α subunit type 1 (SCN1A) in intractable childhood epilepsies with frequent generalized tonic-clonic seizures. *Brain* **126**, 531–546 (2003).
50. Dedek, K., Fusco, L., Teloy, N. & Steinlein, O. K. Neonatal convulsions and epileptic encephalopathy in an Italian family with a missense mutation in the fifth transmembrane region of KCNQ2. *Epilepsy Res.* **54**, 21–27 (2003).
51. Shimojima, K. *et al.* Loss-of-function mutation of collybistin is responsible for X-linked mental retardation associated with epilepsy. *J. Hum. Genet.* **56**, 561–565 (2011).
52. Dibbens, L. M. *et al.* X-linked protocadherin 19 mutations cause female-limited epilepsy and cognitive impairment. *Epilepsy and Cognitive Impairment.* *October* **40**, 776–781 (2009).
53. Shen, J. *et al.* HHS Public Access. **42**, 245–249 (2010).
54. Baasch, A. L. *et al.* Exome sequencing identifies a de novo SCN2A mutation in a patient with intractable seizures, severe intellectual disability, optic atrophy, muscular hypotonia, and brain abnormalities. *Epilepsia* **55**, 25–29 (2014).
55. Kurian, M. A. *et al.* Phospholipase C beta 1 deficiency is associated with early-onset epileptic encephalopathy. *Brain* **133**, 2964–2970 (2010).
56. Veeramah, K. R. *et al.* De novo pathogenic SCN8A mutation identified by whole-genome sequencing of a family quartet affected by infantile epileptic encephalopathy and SUDEP. *Am. J. Hum. Genet.* **90**, 502–510 (2012).
57. Barcia, G. *et al.* De novo gain of function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy. *Giulia.* **44**, 1255–1259 (2012).

58. Edvardson, S. *et al.* West syndrome caused by ST3Gal-III deficiency. *Epilepsia* **54**, 24–27 (2013).
59. Milh, M. *et al.* Novel Compound Heterozygous Mutations in TBC1D24 Cause Familial Malignant Migrating Partial Seizures of Infancy. *Hum. Mutat.* **34**, 869–872 (2013).
60. Nakamura, K. *et al.* De novo mutations in GNAO1, encoding a α subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 496–505 (2013).
61. Basel-Vanagaite, L. *et al.* Biallelic SZT2 mutations cause infantile encephalopathy with epilepsy and dysmorphic corpus callosum. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 524–529 (2013).
62. Carvill, G. L. *et al.* GABRA1 and STXBP1: Novel genetic causes of Dravet syndrome. *Neurology* **82**, 1245–1253 (2014).
63. Kato, M. *et al.* PIGA mutations cause early-onset epileptic encephalopathies and distinctive features. *Neurology* **82**, 1587 LP-1596 (2014).
64. Alazami, A. M., Hijazi, H., Kentab, A. Y. & Alkuraya, F. S. NECAP1 loss of function leads to a severe infantile epileptic encephalopathy. *J. Med. Genet.* **51**, 224–228 (2014).
65. Kodera, H. *et al.* De Novo Mutations in SLC35A2 Encoding a UDP-Galactose Transporter Cause Early-Onset Epileptic Encephalopathy. *Hum. Mutat.* **34**, 1708–1714 (2013).
66. Perrault, I. *et al.* Mutations in DOCK7 in individuals with epileptic encephalopathy and cortical blindness. *Am. J. Hum. Genet.* **94**, 891–897 (2014).
67. Nava, C. *et al.* De novo mutations in HCN1 cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat. Genet.* **46**, 640–645 (2014).
68. Thevenon, J. *et al.* Mutations in SLC13A5 cause autosomal-recessive epileptic encephalopathy with seizure onset in the first days of life. *Am. J. Hum. Genet.* **95**, 113–120 (2014).
69. Torkamani, A. *et al.* De novo KCNB1 mutations in epileptic encephalopathy. *Ann. Neurol.* **76**, 529–540 (2014).
70. Lemke, J. R. *et al.* GRIN2B mutations in west syndrome and intellectual disability with focal epilepsy. *Ann. Neurol.* **75**, 147–154 (2014).
71. Mignot, C. *et al.* WWOX -related encephalopathies: delineation of the phenotypical spectrum and emerging genotype-phenotype correlation. *J. Med. Genet.* **52**, 61 LP-70 (2015).
72. Simons, C. *et al.* Loss-of-function alanyl-tRNA synthetase mutations cause an autosomal-recessive early-onset epileptic encephalopathy with persistent myelination defect. *Am. J. Hum. Genet.* **96**, 675–681 (2015).
73. Hansen, J. *et al.* Erratum: De Novo Mutations in SIK1 Cause a Spectrum of Developmental Epilepsies (American Journal of Human Genetics (2015) 96(4) (682–690)). *Am. J. Hum. Genet.* **96**, 1009 (2015).
74. Appenzeller, S. *et al.* De Novo Mutations in Synaptic Transmission Genes Including DNM1 Cause Epileptic Encephalopathies. *Am. J. Hum. Genet.* **95**, 360–370 (2014).
75. Syrbe, S. *et al.* De novo loss- or gain-of-function mutations in KCNA2 cause epileptic encephalopathy. **47**, 393–399 (2015).

- 76.Veeramah, K. R. *et al.* Exome sequencing reveals new causal mutations in children with epileptic encephalopathies. *Epilepsia* **54**, 1270–1281 (2013).
- 77.Stödberg, T. *et al.* Mutations in SLC12A5 in epilepsy of infancy with migrating focal seizures. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
- 78.Kevelam, S. H. *et al.* Recessive ITPA mutations cause an early infantile encephalopathy. *Ann. Neurol.* **78**, 649–658 (2015).
- 79.Smith-Packard, B., Myers, S. M. & Williams, M. S. Girls with Seizures Due to the c.320A>G Variant in ALG13 Do Not Show Abnormal Glycosylation Pattern on Standard Testing. *JIMD Rep.* **22**, 95–98 (2015).
- 80.Madeo, M. *et al.* Loss-of-Function Mutations in FRRS1L Lead to an Epileptic-Dyskinetic Encephalopathy. *Am. J. Hum. Genet.* **98**, 1249–1255 (2016).
- 81.Palmer, E. E. *et al.* Neuronal deficiency of ARV1 causes an autosomal recessive epileptic encephalopathy. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 3042–3054 (2016).
- 82.Alfaiz, A. A. *et al.* West syndrome caused by homozygous variant in the evolutionary conserved gene encoding the mitochondrial elongation factor GUF1. *Eur. J. Hum. Genet.* **24**, 1001 (2015).
- 83.Myers, C. T. *et al.* De Novo Mutations in SLC1A2 and CACNA1A Are Important Causes of Epileptic Encephalopathies. *Am. J. Hum. Genet.* **99**, 287–298 (2016).
- 84.Møller, R. S. *et al.* Mutations in GABRB3 From febrile seizures to epileptic encephalopathies. *Neurology* **88**, 483–492 (2017).
- 85.Colin, E. *et al.* Biallelic Variants in UBA5 Reveal that Disruption of the UFM1 Cascade Can Result in Early-Onset Encephalopathy. *Am. J. Hum. Genet.* **99**, 695–703 (2016).
- 86.Espen, L., Karine, V. A., Rune, Ø., Ivar, H. B. & Gunnar, H. A second patient with a De Novo GABRB1 mutation and epileptic encephalopathy. *Ann. Neurol.* **80**, 311–312 (2016).
- 87.Li, D. *et al.* GRIN2D Recurrent De Novo Dominant Mutation Causes a Severe Epileptic Encephalopathy Treatable with NMDA Receptor Channel Blockers. *Am. J. Hum. Genet.* **99**, 802–816 (2016).
- 88.Siekierska, A. *et al.* Gain-of-function *FHF1* mutation causes early-onset epileptic encephalopathy with cerebellar atrophy. *Neurology* **86**, 2162 LP-2170 (2016).
- 89.Assoum, M. *et al.* Autosomal-Recessive Mutations in AP3B2, Adaptor-Related Protein Complex 3 Beta 2 Subunit, Cause an Early-Onset Epileptic Encephalopathy with Optic Atrophy. *Am. J. Hum. Genet.* **99**, 1368–1376 (2016).
- 90.Han, C. *et al.* Epileptic Encephalopathy Caused by Mutations in the Guanine Nucleotide Exchange Factor DENND5A. *Am. J. Hum. Genet.* **99**, 1359–1367 (2016).
- 91.Koch, J. *et al.* CAD mutations and uridine-responsive epileptic encephalopathy. *Brain* **140**, 279–286 (2017).
- 92.Ait-El-Mkadem, S. *et al.* Mutations in MDH2, Encoding a Krebs Cycle Enzyme, Cause Early-Onset Severe Encephalopathy. *Am. J. Hum. Genet.* **100**, 151–159 (2017).
- 93.Ogiwara, I. *et al.* A homozygous mutation of voltage-gated sodium channel β_1 gene *SCN1B* in a patient with Dravet syndrome. *Epilepsia* **53**, e200–e203 (2012).

94. Hardies, K. *et al.* Loss of SYNJ1 dual phosphatase activity leads to early onset refractory seizures and progressive neurological decline. *Brain* **139**, 2420–2430 (2016).
95. Bramswig, N. C. *et al.* Heterozygous HNRNPU variants cause early onset epilepsy and severe intellectual disability. *Hum. Genet.* **136**, 821–834 (2017).
96. Johnstone, D. L. *et al.* Compound heterozygous mutations in the gene PIGP are associated with early infantile epileptic encephalopathy. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 1706–1715 (2017).
97. Guella, I. *et al.* De Novo Mutations in YWHAG Cause Early-Onset Epilepsy. *Am. J. Hum. Genet.* **101**, 300–310 (2017).
98. Gururaj, S. *et al.* A De Novo Mutation in the Sodium-Activated Potassium Channel KCNT2 Alters Ion Selectivity and Causes Epileptic Encephalopathy. *Cell Rep.* **21**, 926–933 (2018).
99. Hamdan, F. F. *et al.* High Rate of Recurrent De Novo Mutations in Developmental and Epileptic Encephalopathies. *Am. J. Hum. Genet.* **101**, 664–685 (2017).
100. Yongjin, Y. *et al.* GABBR2 mutations determine phenotype in rett syndrome and epileptic encephalopathy. *Ann. Neurol.* **82**, 466–478 (2017).
101. Mutoh, H. *et al.* Biallelic Variants in CNPY3 , Encoding an Endoplasmic Reticulum Chaperone, Cause Early-Onset Epileptic Encephalopathy. *Am. J. Hum. Genet.* **102**, 321–329 (2018).
102. Muona, M. *et al.* Dysfunctional ADAM22 implicated in progressive encephalopathy with cortical atrophy and epilepsy. *Neurol. Genet.* **2**, (2016).
103. Tariq, Z. *et al.* Mutations in SCN3A cause early infantile epileptic encephalopathy. *Ann. Neurol.* **0**, (2018).
104. Redler, S. *et al.* Variants in CPLX1 in two families with autosomal-recessive severe infantile myoclonic epilepsy and ID. *Eur. J. Hum. Genet.* **25**, 889–893 (2017).
105. Hazrat, B. *et al.* De novo variants in RHOTB2, an atypical Rho GTPase gene, cause epileptic encephalopathy. *Hum. Mutat.* **0**, (2018).
106. Mitsuko, N. *et al.* De novo hotspot variants in CYFIP2 cause early-onset epileptic encephalopathy. *Ann. Neurol.* **83**, 794–806 (2018).
107. Yang, Y. *et al.* Clinical Whole-Exome Sequencing for the Diagnosis of Mendelian Disorders. *N. Engl. J. Med.* **369**, 1502–1511 (2013).
108. Elger, C. E. & Hoppe, C. Diagnostic challenges in epilepsy: seizure under-reporting and seizure detection. *Lancet Neurol.* **17**, 211–212 (2018).
109. Stavropoulos, D. J. *et al.* Whole-genome sequencing expands diagnostic utility and improves clinical management in paediatric medicine. *npj Genomic Med.* **1**, 15012 (2016).
110. Gilissen, C., Hoischen, A., Brunner, H. G. & Veltman, J. A. Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur. J. Hum. Genet.* **20**, 490–497 (2012).
111. Kearney, J. A. Advances in epilepsy genetics and genomics. *Epilepsy Curr.* **12**, 143–146 (2012).
112. Scheffer, I. E. Genetic testing in epilepsy: What should you be doing? *Epilepsy Curr.* **11**, 107–111 (2011).

113. Wei, X. *et al.* Identification of sequence variants in genetic disease-causing genes using targeted next-generation sequencing. *PLoS One* **6**, (2011).
114. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. . DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5463–5467 (1977).
115. Németh, A. H. *et al.* Next generation sequencing for molecular diagnosis of neurological disorders using ataxias as a model. *Brain* **136**, 3106–3118 (2013).
116. Dunn, P. *et al.* Next Generation Sequencing Methods for Diagnosis of Epilepsy Syndromes. *Front. Genet.* **9**, 1–11 (2018).
117. Goh, G. & Choi, M. Application of Whole Exome Sequencing to Identify Disease-Causing Variants in Inherited Human Diseases. *Genomics Inform.* **10**, 214 (2012).
118. Hunt, R. C., Simhadri, V. L., Iandoli, M., Sauna, Z. E. & Kimchi-Sarfaty, C. Exposing synonymous mutations. *Trends Genet.* **30**, 308–321 (2014).
119. Weber, A., Kreth, J. & Müller, U. Intronic PRRT2 mutation generates novel splice acceptor site and causes paroxysmal kinesigenic dyskinesia with infantile convulsions (PKD/IC) in a three generation family. *BMC Med. Genet.* **17**, 16 (2016).
120. Jiang, T., Tan, M.-S., Tan, L. & Yu, J.-T. Application of next-generation sequencing technologies in Neurology. *Ann. Transl. Med.* **2**, 125 (2014).
121. Gokben, S. *et al.* Targeted next generation sequencing: the diagnostic value in early-onset epileptic encephalopathy. *Acta Neurol. Belg.* **117**, 131–138 (2017).
122. Bodi, K. *et al.* Comparison of commercially available target enrichment methods for next-generation sequencing. *J. Biomol. Tech.* **24**, 73–86 (2013).
123. Smedley, D. & Robinson, P. N. Phenotype-driven strategies for exome prioritization of human Mendelian disease genes. *Genome Med.* **7**, 1–11 (2015).
124. Ruderfer, D. M. *et al.* HHS Public Access. **48**, 1107–1111 (2017).
125. Requena, T., Gallego-Martinez, A. & Lopez-Escamez, J. A. A pipeline combining multiple strategies for prioritizing heterozygous variants for the identification of candidate genes in exome datasets. *Hum. Genomics* **11**, 1–11 (2017).
126. Taylor JC, Martin HC, Lise S, Broxholme J, Cazier JB, Rimmer A, Kanapin A, Lunter G, Fiddy S, Allan C, Aricescu AR, Attar M, Babbs C, Becq J, Beeson D, Bento C, Bignell P, Blair E, Buckle VJ, Bull K, Cais O, Cario H, Chapel H, Copley RR, Cornall R, Craft, M. G. Factors influencing success of clinical genome sequencing across a broad spectrum of disorders _ Nature Genetics _ Nature Publishing Group. *Nat Genet* **47**, 717–726 (2015).
127. Miller, S. A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1215 (1988).
128. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754–1760 (2009).
129. Li, H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics* **27**, 2987–2993 (2011).
130. McLaren, W. *et al.* The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol.* **17**, 122 (2016).

131. Poplin, R. *et al.* Scaling accurate genetic variant discovery to tens of thousands of samples. *bioRxiv* (2017).
132. Wang, K., Li, M. & Hakonarson, H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **38**, (2010).
133. Garrison, E. & Marth, G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. 1–9 (2012). doi:arXiv:1207.3907 [q-bio.GN]
134. Auton, A. *et al.* A global reference for human genetic variation. *Nature* **526**, 68–74 (2015).
135. Lek, M. *et al.* Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* **536**, 285–291 (2016).
136. Landrum, M. J. *et al.* ClinVar: Improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* **46**, D1062–D1067 (2018).
137. Sherry, S. T. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* **29**, 308–311 (2001).
138. Fokkema, I. F. A. C. *et al.* LOVD v.2.0: The next generation in gene variant databases. *Hum. Mutat.* **32**, 557–563 (2011).
139. D., S. P. *et al.* The Human Gene Mutation Database (HGMD) and Its Exploitation in the Fields of Personalized Genomics and Molecular Evolution. *Curr. Protoc. Bioinforma.* **39**, 1.13.1-1.13.20 (2012).
140. Trujillano, D. *et al.* A comprehensive global genotype–phenotype database for rare diseases. *Mol. Genet. Genomic Med.* **5**, 66–75 (2017).
141. Cingolani, P. *et al.* A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff. *Fly (Austin)*. **6**, 80–92 (2012).
142. Adzhubei, I. A. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* **7**, 248–249 (2010).
143. Choi, Y., Sims, G. E., Murphy, S., Miller, J. R. & Chan, A. P. Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS One* **7**, e46688 (2012).
144. Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M. & Seelow, D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat. Methods* **11**, 361 (2014).
145. Desmet, F.-O. *et al.* Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* **37**, e67–e67 (2009).
146. Hebsgaard, S. M. *et al.* Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* pre-mRNA by combining local and global sequence information. *Nucleic Acids Res.* **24**, 3439–3452 (1996).
147. Pertea, M., Lin, X. & Salzberg, S. L. GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1185–1190 (2001).
148. Pollard, K. S., Hubisz, M. J., Rosenbloom, K. R. & Siepel, A. Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies. *Genome Res.* **20**, 110–121 (2010).
149. NCBI Resource Coordinators. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* **45**, D12–D17 (2017).

150. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, M. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Available at: <https://omim.org/>.
151. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **45**, D158–D169 (2017).
152. Rappaport, N. *et al.* Rational confederation of genes and diseases: NGS interpretation via GeneCards, MalaCards and VarElect. *Biomed. Eng. Online* **16**, 77–90 (2017).
153. Szklarczyk, D. *et al.* STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* **43**, D447–D452 (2015).
154. The Gene Ontology Consortium. Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources. *Nucleic Acids Res.* **45**, D331–D338 (2017).
155. Consortium, T. G. O. *et al.* Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* **25**, 25–29 (2000).
156. Mi, H. *et al.* PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res.* **45**, D183–D189 (2017).
157. Jennings, L. J. & Kirschmann, D. Genetic Testing Requires NGS and Sanger Methodologies. *Pediatr. Neurol. briefs* **30**, 36 (2016).
158. Koressaar, T. & Remm, M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* **23**, 1289–1291 (2007).
159. Ye, J. *et al.* Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **13**, 134 (2012).
160. Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S. & Roskin, K. M. The Human Genome Browser at UCSC W. *J. Med. Chem.* **19**, 1228–31 (1976).
161. Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**, 95–98 (1999).
162. Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J. & Ram, S. J. Image processing with imageJ. *Biophotonics Int.* **11**, 36–41 (2004).
163. Christie, L. A. *et al.* AMPA receptor desensitization mutation results in severe developmental phenotypes and early postnatal lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 9412–7 (2010).
164. Coci, E. G. *et al.* Novel homozygous missense mutation in ALDH7A1 causes neonatal pyridoxine dependent epilepsy. *Mol. Cell. Probes* **32**, 18–23 (2017).
165. Nishri, D. *et al.* *RARS2* mutations cause early onset epileptic encephalopathy without ponto-cerebellar hypoplasia. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **20**, 412–417 (2016).
166. Tanaka, A. J. *et al.* Mutations in SPATA5 Are Associated with Microcephaly, Intellectual Disability, Seizures, and Hearing Loss. *Am. J. Hum. Genet.* **97**, 457–464 (2015).
167. Gürsoy, S. & Erçal, D. Diagnostic Approach to Genetic Causes of Early-Onset Epileptic Encephalopathy. *J. Child Neurol.* **31**, 523–532 (2016).

168. Mastrangelo, M. Novel genes of early-onset epileptic encephalopathies: From genotype to phenotypes. *Pediatr. Neurol.* **53**, 119–129 (2015).
169. Sokpor, G., Castro-Hernandez, R., Rosenbusch, J., Staiger, J. F. & Tuoc, T. ATP-dependent chromatin remodeling during cortical neurogenesis. *Front. Neurosci.* **12**, 1–25 (2018).
170. Jiang, Y. *et al.* The methyltransferase SETDB1 regulates a large neuron-specific topological chromatin domain. *Nat. Genet.* **49**, 1239–1250 (2017).
171. Andrej Šali. MODELLER A Program for Protein Structure Modeling. *Comp. protein Model. by Satisf. Spat. restraints.* 779–815 (1993). doi:10.1006/jmbi.1993.1626
172. F., P. E. *et al.* UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004).
173. Simons, K. T., Kooperberg, C., Huang, E. & Baker, D. Assembly of protein tertiary structures from fragments with similar local sequences using simulated annealing and bayesian scoring functions¹¹Edited by F. E. Cohen. *J. Mol. Biol.* **268**, 209–225 (1997).
174. Harvey, M. J., Giupponi, G. & De Fabritiis, G. ACEMD: Accelerating biomolecular dynamics in the microsecond time scale. *J. Chem. Theory Comput.* **5**, 1632–1639 (2009).
175. Marcé-Grau, A. *et al.* GNAO1 encephalopathy: further delineation of a severe neurodevelopmental syndrome affecting females. *Orphanet J. Rare Dis.* **11**, 38 (2016).
176. Chege, S. W., Hortopan, G. A., Dinday, M. T. & Baraban, S. C. Expression and function of KCNQ channels in larval zebrafish. *Dev. Neurobiol.* **72**, 186–198 (2012).
177. Mahabir, S. & Gerlai, R. The Importance of Holding Water: Salinity and Chemosensory Cues Affect Zebrafish Behavior. *Zebrafish* **14**, 444–458 (2017).
178. Miceli, F. *et al.* Early-Onset Epileptic Encephalopathy Caused by Gain-of-Function Mutations in the Voltage Sensor of Kv7.2 and Kv7.3 Potassium Channel Subunits. *J. Neurosci.* **35**, 3782–3793 (2015).
179. Bradford, Y. M. *et al.* Zebrafish models of human disease: Gaining insight into human disease at ZFIN. *ILAR J.* **58**, 4–16 (2017).
180. Cropley, V. L. *et al.* The effect of a muscarinic receptor 1 gene variant on grey matter volume in schizophrenia. *Psychiatry Res. - Neuroimaging* **234**, 182–187 (2015).
181. Weber, Y. G., Biskup, S., Helbig, K. L., Von Spiczak, S. & Lerche, H. *The role of genetic testing in epilepsy diagnosis and management. Expert Review of Molecular Diagnostics* **17**, (Taylor & Francis, 2017).
182. Lee, E. H. Epilepsy syndromes during the first year of life and the usefulness of an epilepsy gene panel. *Korean J. Pediatr.* **61**, 101 (2018).
183. Orsini, A., Zara, F. & Striano, P. Recent advances in epilepsy genetics. *Neurosci. Lett.* **667**, 4–9 (2018).
184. Sands, T. T. & Choi, H. Genetic Testing in Pediatric Epilepsy. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **17**, 1–11 (2017).
185. Zhang, Y. *et al.* Gene Mutation Analysis in 253 Chinese Children with Unexplained Epilepsy and Intellectual/Developmental Disabilities. *PLoS One* **10**, e0141782 (2015).

186. Lemke, J. R. *et al.* Targeted next generation sequencing as a diagnostic tool in epileptic disorders. *Epilepsia* **53**, 1387–1398 (2012).
187. Kodera, H. *et al.* Targeted capture and sequencing for detection of mutations causing early onset epileptic encephalopathy. *Epilepsia* **54**, 1262–1269 (2013).
188. Rim, J. H. *et al.* Efficient strategy for the molecular diagnosis of intractable early-onset epilepsy using targeted gene sequencing. *BMC Med. Genomics* **11**, 1–10 (2018).
189. Lindy, A. S. *et al.* Diagnostic outcomes for genetic testing of 70 genes in 8565 patients with epilepsy and neurodevelopmental disorders. *Epilepsia* (2018). doi:10.1111/epi.14074
190. Hesse, A. N., Bevilacqua, J., Shankar, K. & Reddi, H. V. Retrospective genotype-phenotype analysis in a 305 patient cohort referred for testing of a targeted epilepsy panel. *Epilepsy Res.* **144**, 53–61 (2018).
191. Singh, N. A. *et al.* A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nature Genetics* **18**, 25–29 (1998).
192. Perucca, P. *et al.* Real-world utility of whole exome sequencing with targeted gene analysis for focal epilepsy. *Epilepsy Res.* **131**, 1–8 (2017).
193. Allen, N. M. *et al.* Unexplained early onset epileptic encephalopathy: Exome screening and phenotype expansion. *Epilepsia* **57**, e12–e17 (2016).
194. Chihiro, O. *et al.* De novo KCNT1 mutations in early-onset epileptic encephalopathy. *Epilepsia* **56**, e121–e128 (2015).
195. Michaud, J. L. *et al.* The genetic landscape of infantile spasms. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 4846–4858 (2014).
196. Thevenon, J. *et al.* Diagnostic odyssey in severe neurodevelopmental disorders: Toward clinical whole-exome sequencing as a first-line diagnostic test. *Clin. Genet.* **89**, 700–707 (2016).
197. Dimassi, S. *et al.* Whole-exome sequencing improves the diagnosis yield in sporadic infantile spasm syndrome. *Clin. Genet.* **89**, 198–204 (2016).
198. Fung, C.-W., Kwong, A. K.-Y. & Wong, V. C.-N. Gene panel analysis for nonsyndromic cryptogenic neonatal/infantile epileptic encephalopathy. *Epilepsia Open* **2**, 236–243 (2017).
199. Elsensohn, M. H. *et al.* Statistical method to compare massive parallel sequencing pipelines. *BMC Bioinformatics* **18**, 1–11 (2017).
200. Staněk, D. *et al.* Detection rate of causal variants in severe childhood epilepsy is highest in patients with seizure onset within the first four weeks of life. 1–8 (2018). doi:10.1186/s13023-018-0812-8
201. Nigro, V. & Savarese, M. Next-generation sequencing approaches for the diagnosis of skeletal muscle disorders. *Curr. Opin. Neurol.* **29**, 621–627 (2016).
202. Peng, J. *et al.* Novel West syndrome candidate genes in a Chinese cohort. *CNS Neurosci. Ther.* 1–11 (2018). doi:10.1111/cns.12860
203. Chakravorty, S. & Hegde, M. Inferring the effect of genomic variation in the new era of genomics. *Hum. Mutat.* 1–47 (2018). doi:10.1002/humu.23427

204. Catania, A. *et al.* Compound heterozygous missense and deep intronic variants in NDUFAF6 unraveled by exome sequencing and mRNA analysis. *J. Hum. Genet.* **63**, 563–568 (2018).
205. Akita, T. *et al.* De novo variants in CAMK2A and CAMK2B cause neurodevelopmental disorders. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **5**, 280–296 (2018).
206. Belkadi, A. *et al.* Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 5473–5478 (2015).
207. Brule, C. E. & Grayhack, E. J. Synonymous Codons: Choose Wisely for Expression. *Trends Genet.* **33**, 283–297 (2017).
208. Fåhræus, R., Marin, M. & Olivares-Illana, V. Whisper mutations: Cryptic messages within the genetic code. *Oncogene* **35**, 3753–3759 (2016).
209. Maraia, R. J. & Iben, J. R. Different types of secondary information in the genetic code
Different types of secondary information in the genetic code. 977–984 (2014).
doi:10.1261/rna.044115.113.2
210. Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* **10**, 57–63 (2009).
211. Monlong, J. *et al.* Global characterization of copy number variants in epilepsy patients from whole genome sequencing. *PLOS Genet.* **14**, 1–24 (2018).
212. Tan, R. *et al.* An Evaluation of Copy Number Variation Detection Tools from Whole-Exome Sequencing Data. *Hum. Mutat.* **35**, 899–907 (2014).
213. Stosser, M. B. *et al.* High frequency of mosaic pathogenic variants in genes causing epilepsy-related neurodevelopmental disorders. *Genet. Med.* **20**, 403–410 (2018).
214. Beutner, D., Klussmann, J. & Guntinas-lichius, O. Parental Mosaicism in 'De Novo' Epileptic Encephalopathies. 1194–1195 (2008). doi:10.56/NEJMc1509759
215. Brown, D. A. & Sihra, T. S. Presynaptic signaling by heterotrimeric G-proteins. *Handb. Exp. Pharmacol.* **184**, 207–260 (2008).
216. Jiang, M. *et al.* Multiple neurological abnormalities in mice deficient in the G protein Go. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 3269–74 (1998).
217. Kehrl, J. M. *et al.* Gain-of-function mutation in Gnao1: A murine model of epileptiform encephalopathy (EIEE17)? *Mamm. Genome* **25**, 202–210 (2014).
218. Feng, H. *et al.* Movement disorder in GNAO1 encephalopathy associated with gain-of-function mutations. *Neurology* 10.1212/WNL.0000000000004262 (2017).
doi:10.1212/WNL.0000000000004262
219. Pearson, T. S. & Helbig, I. Epileptic encephalopathy, movement disorder, and the yin and yang of GNAO1 function. *Neurology* **89**, 754–755 (2017).
220. Waak, M. *et al.* GNAO1-related movement disorder with life-threatening exacerbations: movement phenomenology and response to DBS. *J. Neurol. Neurosurg. & Psychiatry* **89**, 221 LP-222 (2018).
221. Oyrer, J. *et al.* Ion Channels in Genetic Epilepsy: From Genes and Mechanisms to Disease-Targeted Therapies. *Pharmacol. Rev.* **70**, 142–173 (2018).

222. Millichap, J. J. *et al.* KCNQ2 encephalopathy: Features, mutational hot spots, and ezogabine treatment of 11 patients. *Neurol. Genet.* **2**, e96 (2016).
223. Millichap, J. J. *et al.* Infantile spasms and encephalopathy without preceding neonatal seizures caused by KCNQ2 R198Q, a gain-of-function variant. **58**, 1–10 (2017).
224. Miceli, F. *et al.* Early-Onset Epileptic Encephalopathy Caused by Gain-of-Function Mutations in the Voltage Sensor of K_v7.2 and K_v7.3 Potassium Channel Subunits. *J. Neurosci.* **35**, 3782 LP-3793 (2015).
225. Olson, H. E. *et al.* Genetics and genotype–phenotype correlations in early onset epileptic encephalopathy with burst suppression. *Ann. Neurol.* **81**, 419–429 (2017).
226. Stewart, A. P. *et al.* The Kv7.2/Kv7.3 heterotetramer assembles with a random subunit arrangement. *J. Biol. Chem.* **287**, 11870–11877 (2012).
227. Brien, J. E. O. Gene Interactions and Modifiers in Epileps. *Jasper's Basic Mech. Epilepsies, 4th Ed. NCBI Bookshelf Online B. Version 1–9* (2012).
228. Kobow, K. & Blümcke, I. Epigenetics in epilepsy. *Neurosci. Lett.* **667**, 40–46 (2018).
229. Cunliffe, V. T. Building a zebrafish toolkit for investigating the pathobiology of epilepsy and identifying new treatments for epileptic seizures. *J. Neurosci. Methods* **260**, 91–95 (2016).
230. Shams, S., Rihel, J., Ortiz, J. G. & Gerlai, R. The zebrafish as a promising tool for modeling human brain disorders: A review based upon an IBNS Symposium. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **85**, 176–190 (2018).
231. Marshall, R. A. & Osborn, D. P. S. Zebrafish: a vertebrate tool for studying basal body biogenesis, structure, and function. *Cilia* **5**, 16 (2016).
232. Ma, D. & Liu, F. Genome Editing and Its Applications in Model Organisms. *Genomics. Proteomics Bioinformatics* **13**, 336–344 (2015).
233. Orger, M. B. & de Polavieja, G. G. Zebrafish Behavior: Opportunities and Challenges. *Annu. Rev. Neurosci.* **40**, annurev-neuro-071714-033857 (2017).
234. Marinowic, D. R. *et al.* Induced pluripotent stem cells from patients with focal cortical dysplasia and refractory epilepsy. *Mol. Med. Rep.* **15**, 2049–2056 (2017).
235. SHAO, M., XU, T.-R. & CHEN, C.-S. The big bang of genome editing technology: development and application of the CRISPR/Cas9 system in disease animal models. *Zool. Res.* **37**, 191–204 (2016).
236. Zhang, Y. *et al.* Programmable base editing of zebrafish genome using a modified CRISPR-Cas9 system. *Nat. Commun.* **8**, 118 (2017).
237. Drever, B. D., Riedel, G. & Platt, B. The cholinergic system and hippocampal plasticity. *Behav. Brain Res.* **221**, 505–514 (2011).
238. Wuttke, T. V. *et al.* Neutralization of a negative charge in the S1-S2 region of the KV7.2 (KCNQ2) channel affects voltage-dependent activation in neonatal epilepsy. *J. Physiol.* **586**, 545–555 (2008).

239. Chung, H. J. Role of calmodulin in neuronal Kv7/KCNQ potassium channels and epilepsy. *Frontiers in Biology* **9**, 205–215 (2014).
240. Soldovieri, M. V. *et al.* Early-onset epileptic encephalopathy caused by a reduced sensitivity of Kv7.2 potassium channels to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
241. Gullledge, A. T., Bucci, D. J., Zhang, S. S., Matsui, M. & Yeh, H. H. M1 Receptors Mediate Cholinergic Modulation of Excitability in Neocortical Pyramidal Neurons. *J. Neurosci.* **29**, 9888–9902 (2009).
242. Huang, X. P., Williams, F. E., Peseckis, S. M. & Messer, W. S. Differential modulation of agonist potency and receptor coupling by mutations of Ser388Tyr and Thr389Pro at the junction of transmembrane domain VI and the third extracellular loop of human M(1) muscarinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* **56**, 775–83 (1999).
243. Dasari, S. & Gullledge, A. T. M1 and M4 Receptors Modulate Hippocampal Pyramidal Neurons. *J. Neurophysiol.* **105**, 779–792 (2011).
244. Abidi, A. *et al.* A recurrent KCNQ2 pore mutation causing early onset epileptic encephalopathy has a moderate effect on M current but alters subcellular localization of Kv7 channels. *Neurobiol. Dis.* **80**, 80–92 (2015).
245. Schoonjans, A. S., Meuwissen, M., Reyniers, E., Kooy, F. & Ceulemans, B. PLCB1 epileptic encephalopathies; Review and expansion of the phenotypic spectrum. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **20**, 474–479 (2016).
246. Cheng, Z. *et al.* Luciferase Reporter Assay System for Deciphering GPCR Pathways. *Curr. Chem. Genomics* **4**, 84–91 (2010).

ANNEX I

Marcé-Grau A et al, 2015

***GNAOI* encephalopathy: further delineation of a severe neurodevelopmental syndrome affecting females**

Anna Marcé-Grau ¹	(anna.marce@vhir.org)
James Dalton ²	(james.dalton@uab.es)
Javier López Pisón ³	(jlopezpi@salud.aragon.es)
María Concepción García Jiménez ⁴	(igarciaji@salud.aragon.es)
Lorena Monge Galindo ⁵	(lmonge@salud.aragon.es)
Ester Cuenca-León ¹	(estercuenca@gmail.com)
Jesús Giraldo ²	(jesus.giraldo@uab.es)
Alfons Macaya ¹	(amacaya@vhebron.net)

¹Grup de Recerca en Neurologia Pediàtrica, Vall d'Hebron Institut de Recerca, Universitat Autònoma de Barcelona, Pg Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain.

²Laboratory of Molecular Neuropharmacology and Bioinformatics, Institut de Neurociències and Unitat de Bioestadística, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain.

³Sección de Neuropediatría. Hospital Universitario Miguel Servet. Pº Isabel la Católica 1,3. 50009. Zaragoza, Spain.

⁴Sección de Metabolismo. Hospital Universitario Miguel Servet. Pº Isabel la Católica 1,3. 50009. Zaragoza, Spain.

⁵Secciones de Neuropediatría y Metabolismo. Hospital Universitario Miguel Servet. Pº Isabel la Católica 1,3. 50009. Zaragoza, Spain.

Correspondence:

Dr. Alfons Macaya

Pediatric Neurology Section, Hospital Universitari Vall d'Hebron

Pg Vall d'Hebron 119-129

08035 Barcelona, Spain

Abstract

Background: *De novo* heterozygous mutations in the *GNAO1* gene, encoding the G α o subunit of G-proteins, are the cause of a severe neurodevelopmental disorder, featuring early infantile seizures, profound cognitive dysfunction and, occasionally, movement disorder (early infantile epileptic encephalopathy-17). **Methods:** We report a further case of this association in a 20 month-old Spanish girl with neonatal-onset refractory seizures, progressive microcephaly, oral-lingual dyskinesia and nearly absent psychomotor development. We performed whole-exome sequencing, a computational structural analysis of the novel gene variant identified and reviewed the previously reported cases **Results:** Trio whole-exome-sequencing uncovered a *de novo* p.Leu199Pro *GNAO1* mutation. Computational structural analysis indicates this novel variant adversely affects the stability of the G-protein heterotrimeric complex as a whole. Of note, our patient showed a sustained seizure reduction while on a ketogenic diet. **Conclusions:** With this observation, a total of twelve patients with *GNAO1* encephalopathy have been reported. Oral-lingual dyskinesia and responsiveness of seizures to ketogenic diet are novel features. The distorted sex ratio (12/12 females) of the condition remains unexplained; a differential gender effect of the disruption of G-protein-mediated signal transduction on the developing brain can be hypothesized. **Keywords:** Early infantile epileptic encephalopathy; *GNAO1*, exome sequencing, ketogenic diet.

Background

Epileptic encephalopathy is a group of neurological disorders characterized by severe and progressive cognitive and behavioral impairments, which are most probably caused or worsened by epileptic activity [1]. Heterozygous mutations in the *GNAO1* gene (MIM*139311), encoding the alpha subunit of the heterotrimeric guanine nucleotide-binding proteins (G proteins), were first described as a cause of early infantile epileptic encephalopathy (EIEE) in 2013 [2]. Subsequent reports have broadened the spectrum of clinical presentation [3-5] which includes prominent dyskinesia and intellectual disability with few or no seizures (4) and the condition is currently classified as EIEE17 (MIM #615473). Interestingly, all the cases reported to date involve female subjects despite the disease-causing gene maps to chromosome 16q13.

The *GNAO1* gene product is the alpha subunit of G_o , a member of the G-protein family, involved in cellular signal transduction. Three functional G-protein subtypes are defined, namely inhibitory G-proteins (G_i), stimulatory G-proteins (G_s) and “other” (G_o) the latter being abundantly expressed in the brain [6]. Typically, G-proteins are characterized by their alpha subunit, which binds and hydrolyzes GTP and interacts with specific GPCRs (G-protein coupled receptors) or effector molecules, such as adenylate cyclase. Relevant to neuronal excitability, G_o proteins modulate neurotransmitter release by mediating the presynaptic auto-inhibitory effect of several neurotransmitters on their receptors, including M2/M4 muscarinic, alpha(2) adrenergic, mu/delta opioid and GABA-B receptors [7].

We here report the first Spanish girl with this disorder carrying a de novo *GNAO1* heterozygous mutation. State-of-the-art computational analyses suggest that this novel variant causes significant defects in protein structural stability.

Methods

Clinical Report

The patient is a 21 month-old girl with a severe encephalopathy presenting with neonatal seizures. She is the second child of unrelated, healthy parents. A 4 year-old sister is healthy. Pregnancy and delivery were uneventful. Neonatal physical examination was reportedly normal, with head circumference of 34 cm (35th percentile). Seizures appeared on the third day of life and were tonic generalized or manifested as facial congestion, drooling, or motor phenomena such as sucking, grimacing or winking. They lasted from seconds to a few minutes, recurred up to 40 times per day and were refractory to treatment, including a pyridoxal phosphate-containing vitamin cocktail.

She was referred for study at the age of 3 months. The physical examination revealed a head growth deceleration (head circumference at 38,8 cm, 3rd percentile), low-set ears without other dysmorphic features, drowsiness with lack of visual fixation when awake, decreased muscle tone, reduced spontaneous movements and occasional startle.

Interictal EEG recordings showed diffuse background slowing, and multifocal high-voltaged sharp waves and spike and slow-wave complexes, with predominance over both central-parietal areas. An extensive metabolic workup, including CSF lactate, amino acids and neurotransmitter metabolites, array CGH, fundoscopic examination and visual evoked potentials were normal. A previous brain MRI study, performed at 18 days of life, showed signs consistent with mild cerebral atrophy, thin corpus callosum and delayed myelination (Figure 1).

On follow-up, EEG's continued to show a slowed and high-voltaged background activity with poor differentiation and absent sleep elements plus very abundant, almost constant, bilateral sharp wave elements, consistent with severe epileptic

encephalopathy. Seizures persisted unchanged despite the use of multiple antiepileptic drugs, including phenobarbital, valproate, levetiracetam, vigabatrin, carbamazepine, zonisamide, clobazam, topiramate and lacosamide in different combinations as well as a short trial with hydroaltesone. Although a slight improvement in seizure frequency was eventually obtained with a carbamazepine, topiramate and clobazam at age 11 months she was still suffering 15-20 seizures per day, mostly tonic generalized with upgaze deviation. With the institution of a 1:3 ketogenic diet (KD) seizure frequency progressively diminished and she remained seizure-free for almost two months. However non-compliance with the KD resulted in recurrence of seizures. She currently averages 1-4 seizures per day. At age 19 months an EEG performed during sleep captured two seizures with, respectively, right and left mesial frontal origin. At age 21 months, the patient is severely disabled; she has not attained cephalic control or visual fixation and does not respond to any social cues. On examination, head circumference is 43 cm (<-3SD), height 86 cm (33th percentile) and weight 14 Kg (96th percentile). There is severe axial hypotonia, spastic tetraparesis, brisk deep tendon reflexes and paucity of voluntary movements. She has recently begun to display dyskinetic buccolingual movements, but without evidence of adventitious movements involving the trunk or limbs.

Genetic Studies and Whole-Exome Sequencing.

Peripheral blood samples were collected from the trio (patient and both progenitors). Genomic DNA was isolated using a standard salting-out method. The study was approved by the local Ethics Committees and informed consent was obtained from the patient's parents according to the Helsinki declaration.

Exome sequencing of DNA samples from the trio was performed at the Centre Nacional d'Anàlisi Genòmica (CNAG) in Barcelona. 1µg of genomic DNA was fragmented with an ultra sound device (Covaris, Woburn, MA, USA), denatured and hybridized with capture oligos (NimbleGen SeqCap EZ Exome v3.0 exome enrichment kit, Roche, Madison, WI, USA) which enriches for ~44 Mb of the human exonic regions. Captured sequences were enriched with streptavidin-conjugated paramagnetic beads. End repair, A-tailing, Illumina adapter ligation and post-capture amplification were done with TruSeq PE Cluster Kit v3, Illumina Corp, La Jolla, CA). Each captured exome was sequenced in one HiSeq2000 lane using version 3 chemistry. Coverage over 30X -was achieved for more than 80 % of the target. Alignment and variant calling were carried out following the GATK best practices for whole-exome sequencing. Sequencing reads were aligned to b37-decoy reference using BWA (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>), then we marked duplicates, performed local realignment around indels, recalibrated the base quality scores, called variants with HaplotypeCaller and filtered them using Variant Quality Score Recalibration (VQSR) and hard filters. Refinement was done considering the pedigree, the population frequencies from Exome aggregation consortium (<http://exac.broadinstitute.org/>) [8], NHLBI Exome Sequencing Project (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) [9], 1000 genomes project (<http://www.1000genomes.org/>) [10] and dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) [11] and finally, the functional annotation (SnpEff, SnpSift) and the disease. In a first tier analysis (diagnostic exome sequencing) we investigated any variants within genes previously associated with epilepsy. This was followed by consideration of variants in any other gene covered by WES (research exome sequencing). Both, *de novo* mutations and transmitted alleles were analyzed. All candidate selected *de novo* mutations were

absent in ExAC, and passed visual inspection of alignment quality using the Integrative Genomics Viewer (IGV).

Sanger sequencing was performed to confirm the *GNAOI de novo* missense variant identified through whole-exome sequencing. To that end, exon six from the proband and progenitors was amplified by Polymerase-Chain-Reaction (PCR), purified and sequenced using the BigDye Terminator cycle sequencing kit v3.1 and an automated sequencer ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (primer sequences and PCR conditions available upon request).

Structural Modeling and Free-Energy Calculations

Homology modeling human G α protein

The human WT G α protein was homology modeled from the crystal structure of mouse G α (PDB id: 3C7K) with MODELLER [12] (residues 22-346, see Supplementary Table 1 for sequence alignment). The sequence identity between mouse and human protein is 98%. During homology modeling, conserved residues were maintained in their original crystal structure rotameric orientation. The co-crystallized ligands GDP and MG were directly transferred from the crystal structure into the homology model. The WT homology model was energy-minimized in the AMBER14SB force-field [13] with 1000 steps of steepest descent and 100 steps of conjugate gradients in CHIMERA [14]. The L199P mutation was inserted into the WT homology model with CHIMERA by applying the most appropriate side-chain rotamer and then energy-minimizing the mutant protein as performed previously in the AMBER14SB force-field.

Calculation of free-energy change

The predicted free-energy change ($\Delta\Delta G$) of the L199P mutation in human Gao was made using ROSETTA [15] with a conversion factor of 0.73 employed to convert Rosetta Energy Units to kcal/mol [16]. The program was executed in “high-resolution mode” with full protein flexibility in side-chains and backbone (without bound GDP) and with the following flags: “iterations” set to 50, “local_opt_only” set to false, “sc_min_only” set to false, “opt_radius” set to 12.0, and “fa_max_dis” set to 9.0.

Molecular dynamics simulations

Both Gao WT and Gao L199P molecular dynamics (MD) systems were built using Amber LEap from AmberTools14 [13]. Ions were added to neutralize both systems and salt was added at a concentration of 0.2 M in each. Each system was then equilibrated with MD using ACEMD (Accelerating Biomolecular Dynamics in the Microsecond Time Scale) [17] at 300° and a pressure of 1 atmosphere (NPT) in the AMBER14SB force-field for a total of 7.0 ns with harmonic restraints on the protein progressively relaxed from 10 kcal mol⁻¹ Å⁻² to 0 kcal mol⁻¹ Å⁻². Production run MD simulations of 1000 ns were then performed for both WT and mutant L199P proteins at 300° (NVT) in the AMBER14SB force-field using ACEMD [17]. VMD 1.9.2 [18] was used for RMSD (root-mean-square deviation) analyses of MD simulations, including heat-map generation.

Results

Whole-exome sequencing

Whole exome sequencing from the patient and her parents (trio-based variant analysis) identified a single *de novo* variant within the epilepsy candidate genes, a heterozygous mutation GRCh37/hg19:chr16:56370645, NM_020988.2: c.596T>C in *GNAO1*, producing the amino acid change p.Leu199Pro (NP_066268.1) in the proband. Read depth at the variant position was 38X, 42X and 50X for the proband and progenitors, respectively. The mutation was confirmed by PCR and Sanger sequencing (Figure 2). This variant has not been previously described as related to the phenotype and is not present in any of the public genomic databases listed above. *In silico* prediction softwares (SIFT [19], Mutation Taster [20] and PolyPhen-2 [21]) classified the novel variant as damaging. Despite the location of the variant in close proximity to a splice junction, the ESEfinder [22,23] and Netgene2 [24,25] scores did not indicate an effect on splicing (data not shown).

Computational structural analysis

The human WT G α o protein with bound GDP was homology modeled from the crystal structure of mouse G α o (PDB id: 3C7K) using MODELLER [8]. As these proteins share 98% sequence identity, homology modeling accuracy can be considered very high (see Methods for details and Supplementary Information). The Leu199Pro mutation was introduced with CHIMERA [14]. The Leu199Pro mutation site is located in the GTPase domain of G α o, specifically residing in the interior of a β -sheet that is packed between the N- and C-termini and interacting with adjacent α -helices. According to the homology model of human G α o, Leu199 is not involved in GDP/GTP binding so its mutation to proline is not predicted to directly affect ligand binding or hydrolysis (see Figure 3A).

The WT and mutant forms of human G α o were analysed with ROSETTA [15] to calculate the predicted free-energy change ($\Delta\Delta G$) of the mutation. Using a conversion factor of 0.73 to convert from Rosetta Energy Units to kcal/mol [12], the predicted $\Delta\Delta G$ of Leu199Pro is +6.1 kcal/mol. This suggests the mutation has a destabilizing effect on the protein and could possibly cause defects in its folding. To investigate this effect in more detail, both the WT protein and Leu199Pro mutant were subjected to a 1 micro-second MD simulation using ACEMD [13]. During these simulations, the WT protein remains stable in terms of both its secondary and tertiary structure with an RMSD that fluctuates between 1.0-2.0 Å (Figure 3D). However the Leu199Pro mutant displays significant structural change in its GTPase domain, with multiple H-bonding in its central B-sheet broken, causing the creation of a large flexible loop region and increased positional fluctuation (Figure 3C), with a protein RMSD of 1.5-3.0 Å across the simulation (Figure 3D). In addition, the mutation also affects other areas of the domain, in particular α -helices: 208-217 and 257-262, both which lose their structural integrity and experience greater positional fluctuation during the simulation (Figure 3C). In the context of the protein as a whole, heat-map representations of positional fluctuation reveal structural disturbances across both domains, GTPase and helical, in the mutant Leu199Pro protein (see Figure 4). These disturbances occur in areas already described in the GTPase domain but also in several loop regions throughout the protein.

Discussion

Early infantile epileptic encephalopathy-17 is a severe neurological disorder characterized by onset of intractable seizures in the first weeks or months of life, usually associated with EEG abnormalities, caused by heterozygous mutations in *GNAO1*.

Neurological outcome is uniformly poor in all the infants described thus far. Imaging

may disclose indistinct brain abnormalities, such as cerebral atrophy, delayed myelination, and/or or thin corpus callosum.

Including the present report, twelve patients with *GNAOI* encephalopathy have been described (Table 1). Early-onset epileptic encephalopathy has been the most frequent presentation (n=9), but two out of the eight described Japanese patients, showed either few, late-onset seizures or none at all [4]. Clinical-EEG patterns are variable, and patients are referred to as suffering from Ohtahara, malignant migrating partial epilepsy of infancy, West syndrome or other forms of early epileptic encephalopathy phenotype [2-5]. Some patients show involuntary movements, including chorea, dystonia, athetosis or stereotypies [2,4].

Refractoriness to antiepileptic drugs appears a common feature in all patients displaying the EIEE phenotype. In our patient a complete cessation of seizures was noted one month after the institution of a ketogenic diet and the patient remains seizure-free five months into the diet. Considering the widely admitted deleterious effect of seizures on the developing brain, institution of this therapeutic modality early in the evolution of *GNAOI* encephalopathy seems advisable. Based on the loss of calcium-current inhibition found *in vitro* in *GNAOI* mutants, resulting from altered G α o-mediated signaling induced by norepinephrine, Nakamura et al suggested the use of selective calcium-channel blockers or the use of the high-voltage activated calcium channels modulator topiramate to alleviate epilepsy in patients with *GNAOI* mutations [2]. Our patient, at variance with previous cases where treatment was specified, did receive topiramate since the age of 8 months, but without noticeable improvement in seizures or changes in her developmental profile.

All twelve patients described carried heterozygous de novo missense mutations [2-5]. Indeed, the p.Leu199Pro is predicted to cause protein dysfunction in both of the

described GNAO1 isoforms, according to the used in silico prediction tools.

Furthermore, the application of the recently published ACMG guidelines for interpretation of sequence variants [26] to the p.Leu199Pro variant classified it as pathogenic by virtue of fulfilling one strong (PS2) plus two moderate (PM1, PM2) and two supporting (PP2,PP3) pathogenic criteria.

In vitro functional studies showed that three out of four analyzed missense *GNAO1* mutations resulted in abnormal, cytoplasmic localization of the protein, while electrophysiological studies proved that all four variants produced impaired N-type calcium channel current inhibition after norepinephrine application [2]. Interestingly, a mouse model harboring a heterozygous (p.Gly184Ser) *Gnao1* missense mutation displayed a severe and lethal epileptic phenotype that was absent in the *Gnao1* hemizygous knock-out mouse, suggesting that pathogenic *GNAO1* mutations may act through a gain-of-function, dominant effect [27].

In our present work, we investigated the effect of the novel Leu199Pro mutation in the structure of the human G α o protein using state-of-the-art computational tools. These provide evidence that the mutation causes significant defects in protein stability. The observed disturbances occur locally in the GTPase domain where the mutation is situated but also in several loop regions throughout the protein. This suggests the p.Leu199Pro mutation decreases overall structural stability and perhaps folding of the G α o protein. From a functional point of view, the location of the p.Leu199Pro mutation may be particularly significant in terms of interactions G α o makes with its binding partner G $\beta\gamma$ and others. With respect to the crystal structure of the complete heterotrimeric guanine-nucleotide-binding protein Gi (PDB id: 1GG2), when the G α o subunit is superimposed, the mutation p.Leu199Pro is in direct contact with G $\beta\gamma$ (see Figure 1B). Therefore any introduced structural instability in this interface would likely

adversely affect the stability of the $G\alpha\beta\gamma$ complex as a whole. From the observed results, it is certainly conceivable that the p.Leu199Pro mutation could generate this level of instability. The issue of a female gender bias in this disorder deserves special consideration. A distorted sex ratio can be found in many complex disorders, for instance autism spectrum disorder [28] and a male-biased effect has been described for 16p13.11 copy number variants as predisposing factor to a range of neurodevelopmental disorders [29]. Possible causes include hormonal factors, sexual dimorphic brain differences, imprinting or genetic modifiers, with a net effect of greater protection of the female brain. It is conceivable that the penetrance of *GNAOI* mutation is higher in the less resilient male brain thus producing a more severe phenotype. While female bias in EIEE-17 remains unexplained, it could be posited that disruption of G-protein signal transduction may lead to prenatal lethality in males.

Conclusions

We describe a further female patient with *GNAOI*-associated neonatal-onset epilepsy and a severe neurodevelopmental disorder. Seizures were amenable to treatment with KD. Structural analysis of the novel mutation suggests it introduces significant structural instability into both the $G\alpha$ subunit and the whole G-protein heterotrimeric complex. The resulting defective cellular signal transduction is in all probability deleterious during brain development and putatively fatal in the male embryo.

List of abbreviations

EEIE: Early infantile epileptic encephalopathy

Gi: Inhibitory G-proteins

Gs: Stimulatory G-proteins

Go: "other" G-proteins

GTP: Guanosine triphosphate

GPCRs: G-protein coupled receptors

GABA: Gamma-aminobutyric acid

EEG: Electroencephalography

CSF: Cerebrospinal fluid

CGH: Comparative genomic hybridization

MRI: Magnetic resonance imaging

KD: Ketogenic diet

GATK: Genome analysis toolkit

BWA: Burrows-wheeler aligner

PCR: Polymerase-chain-reaction

VQSR: Variant Quality Score Recalibration

IGV: Integrative Genome Viewer

WT: Wildtype

PDB: Protein data bank

GDP: Guanosine diphosphate

MG: Magnesium

ddG: Predicted free-energy change

MD: Molecular dynamics

ACEMD: Accelerating biomolecular dynamics in the microsecond time scale

RMSD: Root-mean-square deviation

Competing Interests:

The authors declare that they have no competing interests

Author's contributions:

AMG carried out the molecular genetic studies and validated the findings, JD performed the computational structural analyses, JLP provided the clinical and neuroradiological data, MCGJ and LMG carried out metabolic studies related to treatment and helped to draft the manuscript, ECL set up the bioinformatic analysis pipeline, JG devised the computational approach to mutation analysis and interpreted the data, AM conceived the study and drafted the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgements: This work was funded by grants from Instituto de Salud Carlos III Madrid, Spain (PI12/01005), Ministerio de Economía y Competitividad, Spain (SAF2014-58396-R) and AGAUR, Barcelona, Spain (SGR2009/0078); AM-G is the recipient of a scholarship from Vall d'Hebron Institut de Recerca (Barcelona, Spain); EC-L supported by a Beatriu de Pinós post-doctoral grant from AGAUR (Barcelona, Spain).

The authors would like to thank the Exome Aggregation Consortium and the groups that provided exome variant data for comparison (a full list of contributing groups can be found at <http://exac.broadinstitute.org/about>) and the NHLBI GO Exome Sequencing Project and its ongoing studies which produced and provided exome variant calls for comparison: the Lung GO Sequencing Project (HL-102923), the WHI Sequencing Project (HL-102924), the Broad GO Sequencing Project (HL-102925), the Seattle GO Sequencing Project (HL-102926) and the Heart GO Sequencing Project (HL-103010).

References

1. Dulac O. Epileptic encephalopathy. *Epilepsia*. 2001;42 Suppl 3: 23-26.
2. Nakamura, K., Kodera, H., Akita, T., Shiina, M., Kato, M., Hoshino, et al. De novo mutations in *GNAO1*, encoding a G-alpha-o subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 2013;93:496-505.
3. EuroEPINOMICS-RES Consortium; Epilepsy Phenome/Genome Project; Epi4K Consortium. De novo mutations in synaptic transmission genes including *DNM1* cause epileptic encephalopathies. *Am J Hum Genet.* 2014; 95: 360-70.
4. Saitsu H, Fukai R, Ben-Zeev B, Sakai Y, Mimaki M, Okamoto N, et al. Phenotypic spectrum of *GNAO1* variants: epileptic encephalopathy to involuntary movements with severe developmental delay. *Eur J Hum Genet.* 2016;24:129-34. .
5. Talvik I, Moller R, Vaher M, Vaher U, Larsen LHG, Dahl H, et al. Clinical Phenotype of De Novo *GNAO1* Mutation: Case Report and Review of Literature. *Child Neurology Open.* 2015;doi:10.1177/2329048X15583717.
6. Strathmann, M, Wilkie TM, Simon MI. Alternative splicing produces transcripts encoding two forms of the alpha subunit of GTP-binding protein Go. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:6477-81.
7. Brown DA, Sihra TS. Presynaptic signaling by heterotrimeric G-proteins. *Handb Exp Pharmacol.* 2008;184:207-60.
8. Exome Agregation Consortium, Lek M, Karczewski KJ, Minkel EV, Samocha KE, Banks E et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans.

bioRxiv preprint first posted online Oct. 30, 2015; doi:
<http://dx.doi.org/10.1101/030338>..

9. Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA
(URL: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) (accessed January, 2016)
10. A global reference for human genetic variation, The 1000 Genomes Project Consortium, Nature 526, 68-74 (01 October 2015) doi:10.1038/nature15393.
11. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K.
dbSNP: the NCBI database of genetic variation. Nucleic Acids Res. 2001 Jan
1;29(1):308-11.
12. Sali A. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. Mol Med
Today. 1995;1:270-7.
13. Case DA, Cheatham TE 3rd, Darden T, Gohlke H, Luo R, Merz KM Jr, et al. The
Amber biomolecular simulation programs. J Comput Chem. 2005;26:1668-88.
14. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al.
UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. J
Comput Chem. 2004;25:1605-12.
15. Simons KT, Kooperberg C, Huang E, Baker D. Assembly of protein tertiary
structures from fragments with similar local sequences using simulated annealing
and Bayesian scoring functions. J Mol Biol. 1997;268:209-25.
16. Kellogg EH, Leaver-Fay A, Baker D, Role of conformational sampling in computing
mutation-induced changes in protein structure and stability. Proteins. 2011;79: 830-
8.

17. Harvey MJ, Giupponi G, De Fabritiis G. ACEMD: Accelerating Biomolecular Dynamics in the Microsecond Time Scale. *J Chem Theory Comput.* 2009;5:1632-1639.
18. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph.* 1996;14: 33-8, 27-8.
19. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS ONE.* 2012;7: e46688.
20. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* 2014; 11:361-2.
21. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. *Nat Methods.* 2010;7:248-249.
22. Smith P J, Zhang C, Wang J, Chew S L, Zhang M Q, Krainer A R. An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Hum Mol Genet* 2006;15: 2490-2508.
23. Cartegni L., Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer A R.
ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers.
Nucl Acids Res. 2003; 31: 3568-3571.
24. Hebsgaard SM, Korning PG, Tolstrup N, Engelbrecht J, Rouze P, Brunak S: Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* DNA by combining local and global sequence information. *Nucl Acids Res.* 1996;24: 3439-3452.
25. Brunak S, Engelbrecht J, Knudsen S. Prediction of Human mRNA Donor and Acceptor Sites from the DNA Sequence. *J Mol Biol.* 1991; 220: 49-65.

26. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J 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;17:405-24.
27. Kehrl JM, Sahaya K, Dalton HM, Charbeneau RA, Kohut KT, Gilbert K, et al. Gain-of-function mutation in *Gnao1*: a murine model of epileptiform encephalopathy (EIEE17)? *Mammalian Genome.* 2014;25: 202-210.
28. Whiteley P, Todd L, Carr K, Shattock P. Gender Ratios in Autism, Asperger Syndrome and Autism Spectrum Disorder. *Autism Insights.* 2010; 2: 17–24.
29. Tropeano M, Ahn JW, Dobson RJ, Breen G, Rucker J, Dixit A, et al. Male-biased autosomal effect of 16p13.11 copy number variation in neurodevelopmental disorders. *PLoS One.* 2013; 18:e61365.

Figure Legends

Figure 1: Brain MRI at age 18 days. Sagittal T1WI view showing thinning of the corpus callosum (arrow), with anterior predominance, and some degree of frontal lobe volume reduction (A). Axial T2WI view showing asymmetric enlargement of temporal subarachnoidal spaces (arrow) and mildly prominent sulci over the cerebral convexity, suggesting incipient atrophy. Myelination is delayed with minimal signals observed at the posterior limb of the internal capsule (arrowhead) and corpus callosum (B).

Figure 2: A) Left, pedigree of the affected patient, showing the carrier of the heterozygous of the *de novo* mutation (filled symbol) and her unaffected sister and parents. Right, validation of the identified mutation by means of PCR and Sanger sequencing: electropherograms show the wild-type sequence in the progenitors (top) and the novel *GNAO1* c.596T>C (NM_020988.2) variant in the proband (bottom), producing the amino acid change p.Leu199Pro (NP_066268.1). B) Multiple sequence alignment of the *GNAO1* protein region containing Leucine 199 (NP_066268.1) illustrating the high degree of evolutionary conservation of the affected residue.

Figure 3: A) Homology model of human WT *Gαo*. The mutation L199 is highlighted in yellow space-fill, protein backbone with secondary structure in beige, GDP in red/orange space-fill, magnesium in green. B) Structural superposition of mutant L199P *Gαo* protein after 1 micro-second of MD simulation (in pink with mutation L199P shown as red space-fill) and heterotrimeric guanine-nucleotide-binding protein *Gi* (PDB id: 1GG2, *Giα* in beige, *Giβ* in cyan, *Giγ* in green). C) GTPase domain of mutant L199P *Gαo* (in pink) compared to WT (in green) after 1 micro-second MD

simulations (mutation L199P shown in red space-fill). D) Plot of RMSD (Å) for C α atoms of WT G α o protein and L199P mutant during 1 micro-second MD simulations (RMSD comparisons made against initial structure).

Figure 4: A) RMSD per residue heat-map (scale 0-15, from low/blue to high/red) for WT G α o throughout a 1 micro-second MD simulation. B) RMSD per residue heat-map for mutant L199P G α o. RMSD comparisons made against respective initial structures.

Table 1. Clinical features of 12 reported patients with GNAO1 encephalopathy

Case (ref)	Sex	Age	Age at seizure onset	Seizures type at onset	Epileptic syndrome	Dyskinesia	MRI findings	Global outcome	Epilepsy outcome	EEG features	Mutation	Inheritance
1 (2)	F	13y	4d	Tonic	OS	-	Normal (1mo), atrophy (5y)	Profound GDD	Intractable seizures	BS, multifocal	c.836T>A (p.Ile279Asn)	<i>de novo</i>
2 (2)	F	4y	29d	Tonic	OS	-	DM, thin corpus callosum (10mo)	Profound GDD	Intractable seizures	BS, HS	c.521A>G (p.Asp174Gly)	<i>de novo</i> *
3 (2)	F	Died 11mo	2w	Tonic/spasms	OS	-	Normal (3 mo)	Profound GDD	Intractable seizures	BS, HS	c.572_592del (p.Thr191_Phe197del)	<i>de novo</i>
4 (2)	F	8y	7mo	Opisthotonic	EE	+	DM (1y), thinning white matter, corpus callosum (4y)	Profound GDD	Intractable seizures	diffuse SSW discharges	c.607G>A (p.Gly203Arg)	<i>de novo</i>
5 (3)	F	3y	3mo	Infantile spasms	EE	-	Mild atrophy	Severe to profound GDD	Seizure-free since age 5m	HS	c.808A>C (p.Asn270His)	<i>de novo</i>
6 (3)	F	9y	3d	Tonic	EE-neonatal	-	DM, thinning of white matter	Severe to profound GDD	Daily tonic seizures	BS, HS	c.824T>C (p.Phe275Ser)	<i>de novo</i>
7 (4)	F	20mo	2mo	Infantile spasms	EE	+	Cerebral atrophy, thin corpus callosum (10mo)	Profound GDD	Intractable CPS	HS, multifocal	c.680C>T (p.Ala227Val)	<i>de novo</i>
8 (4)	F	14mo	7d	Tonic-clonic	EE-neonatal	+	Normal (20d), cerebral atrophy, DM (14mo)	Profound GDD	Intractable CPS	SW bursts, migrating focal, multifocal discharges	c.607G>A (p.Gly203Arg)	<i>de novo</i>
9 (4)	F	13y		No seizures	-	+	Normal (4y, 12y)	Profound GDD		Normal	c.736G>A (p.Glu246Lys)	<i>de novo</i>
10 (4)	F	18y	10y	Complex partial	-	+	Global atrophy, thin corpus callosum (11y, 14y)	Severe GDD	Complex partial seizures (11y)	Normal at 4 years, later diffused low	c.625C>T (p.Arg209Cys)	<i>de novo</i>
11 (5)	F	4y	1mo	Myoclonic	OS	+	Asymmetrical subarachnoidal space in temporal regions, myelination delay in corpus callosum	Profound GDD	Intractable seizures	BS, HS, multifocal	c.692A>G (p.Tyr231Cys)	<i>de novo</i>
Present report	F	20mo	3d	Tonic	EE-neonatal	+	DM, thin corpus callosum	Profound GDD	Seizure-free, ketogenic diet	Background slowing, multifocal	c.596T>C (p.Leu199Pro)	<i>de novo</i>

OS: Ohtahara syndrome; EE: Epileptic Encephalopathy; ID: Intellectual Disability; BS: burst-suppression; HS: Hypsarrhythmia; SSW: spike and slow wave; DM: delayed myelination; GDD: global developmental delay; NA: not available; *somatic mosaicism.

Supplementary Table 1: Sequence alignment as calculated by NCBI-BLAST between human Gao (Query) and mouse Gao (Sbjct, PDB id: 3C7K)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps		
686 bits(1769)	0.0		Compositional matrix adjust.		326/333(98%)	328/333(98%)	0/333(0%)
Query	22	NLKEDGISAAKDVKLLLLGAGESGKSTIVKMKIIHEDGFSGEDVKQYKPVVYSNTIQSL				81	
Sbjct	1	NLKEDGISAAKDVKLLLLGAGESGKSTIVKMKIIHEDGFSGEDVKQYKPVVYSNTIQSL				60	
Query	82	AAIVRAMDTLGI EYGDKERKADAKMVC DVSRMEDTEPFSAELLSAMMRLWGDSGIQECF				141	
Sbjct	61	AAIVRAMDTLG+EYGDKERK D+KMVCDVSRMEDTEPFSAELLSAMMRLWGDSGIQECF				120	
Query	142	NRSREYQLNDSAKYYLDSLDRIGAADYQTEQDILRTRVKTGIVETHFTFKNLHFRLFD				201	
Sbjct	121	NRSREYQLNDSAKYYLDSLDRIGA DYQTEQDILRTRVKTGIVETHFTFKNLHFRLFD				180	
Query	202	VGGQRSERKKWIHCFEDVTAIIFCVALSGYDQVLHEDETTNRMHESLMLFDSICNNKFFI				261	
Sbjct	181	VGGQRSERKKWIHCFEDVTAIIFCVALSGYDQVLHEDETTNRMHESLMLFDSICNNKFFI				240	
Query	262	DTSIILFLNKKDLFGEKIKKSPLTICFPEYTGPNYEDAAAYIQAFESKNRSPNKEIYC				321	
Sbjct	241	DTSIILFLNKKDLFGEKIKKSPLTICFPEY G NTYEDAAAYIQ QFESKNRSPNKEIYC				300	
Query	322	HMTCATDTNNIQVVFDAVTDIIIANNLRGCGLY		354			
Sbjct	301	HMTCATDTNNIQVVFDAVTDIIIANNLRGCGLY		333			

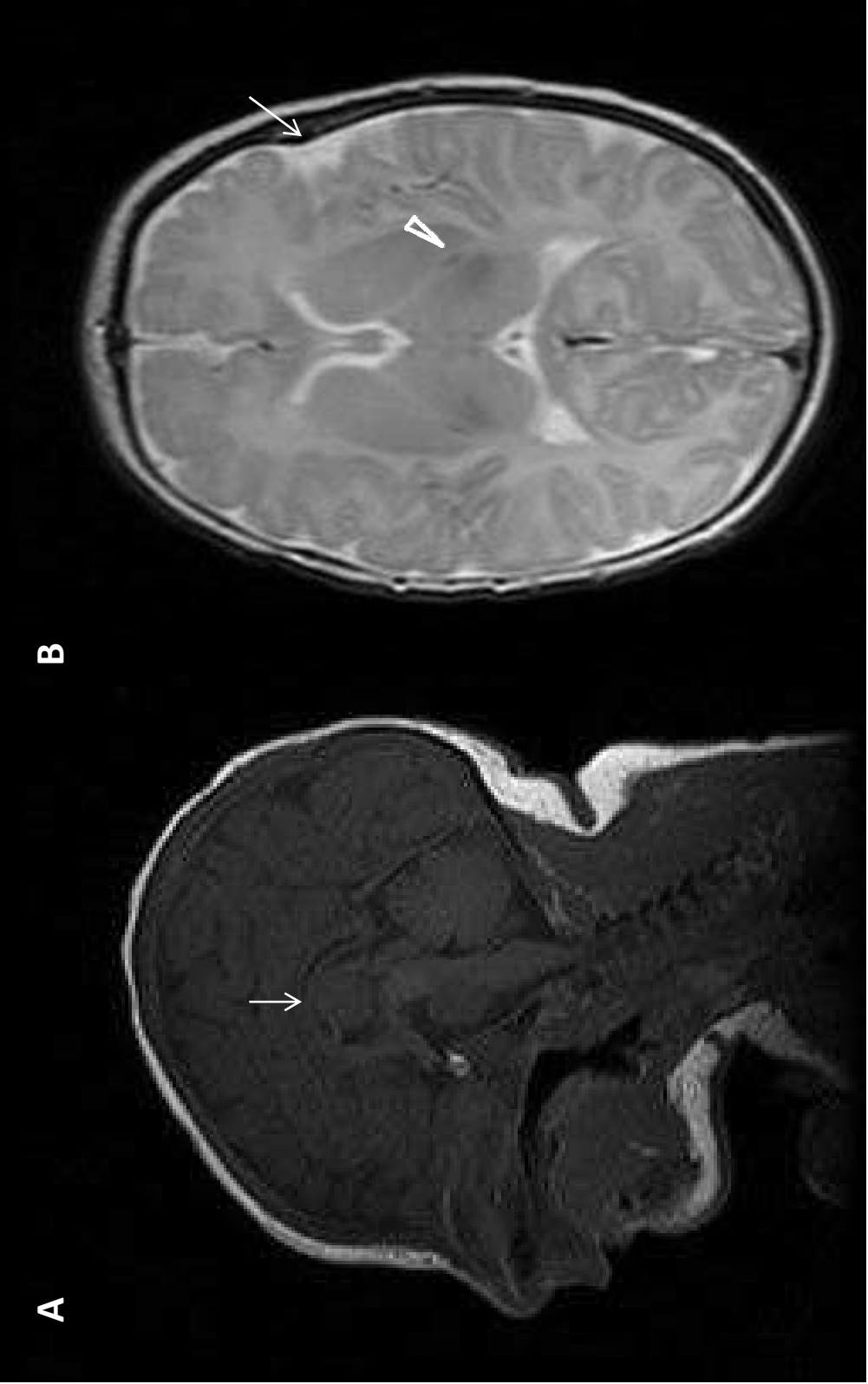


Figure 1

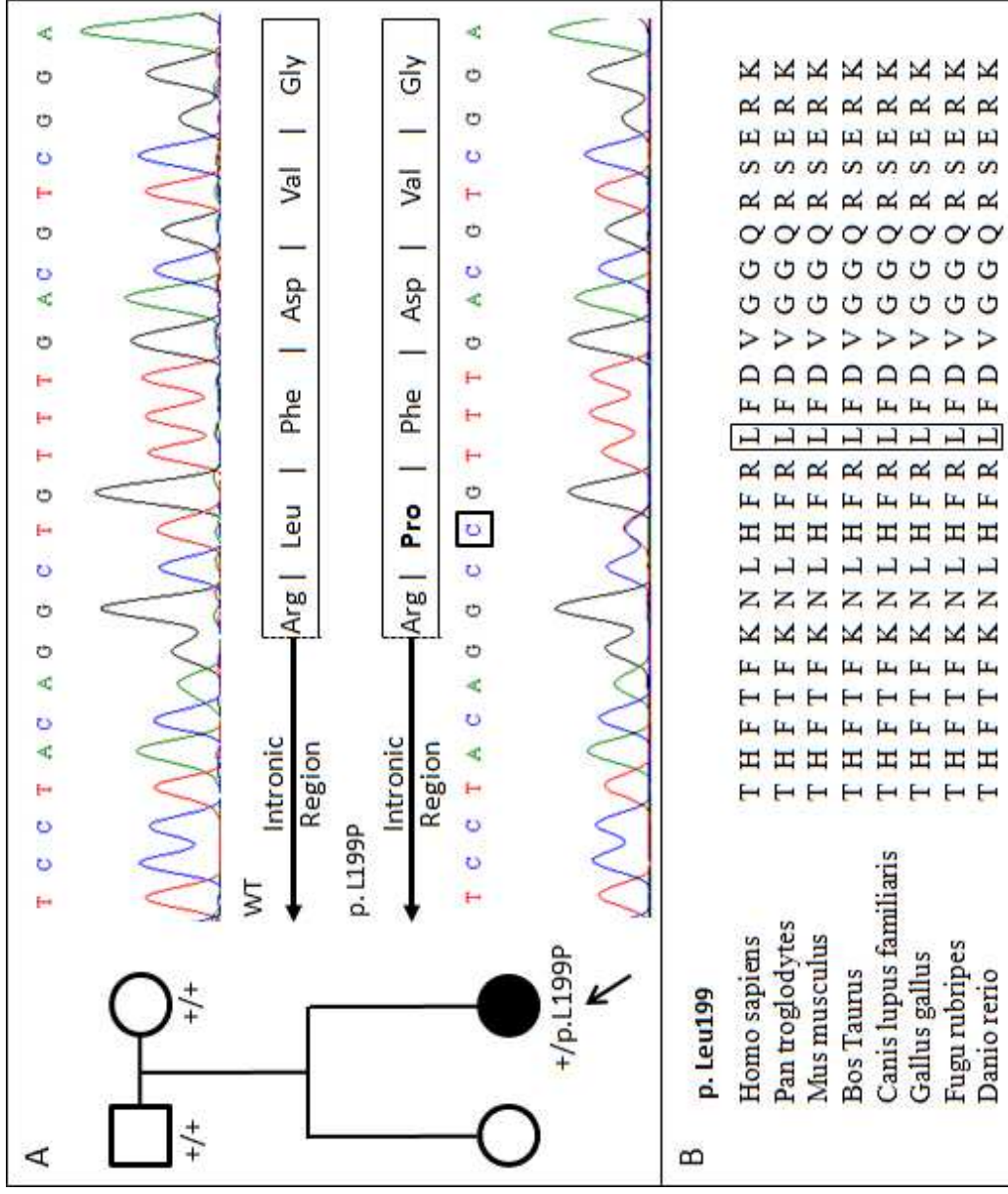


Figure 2

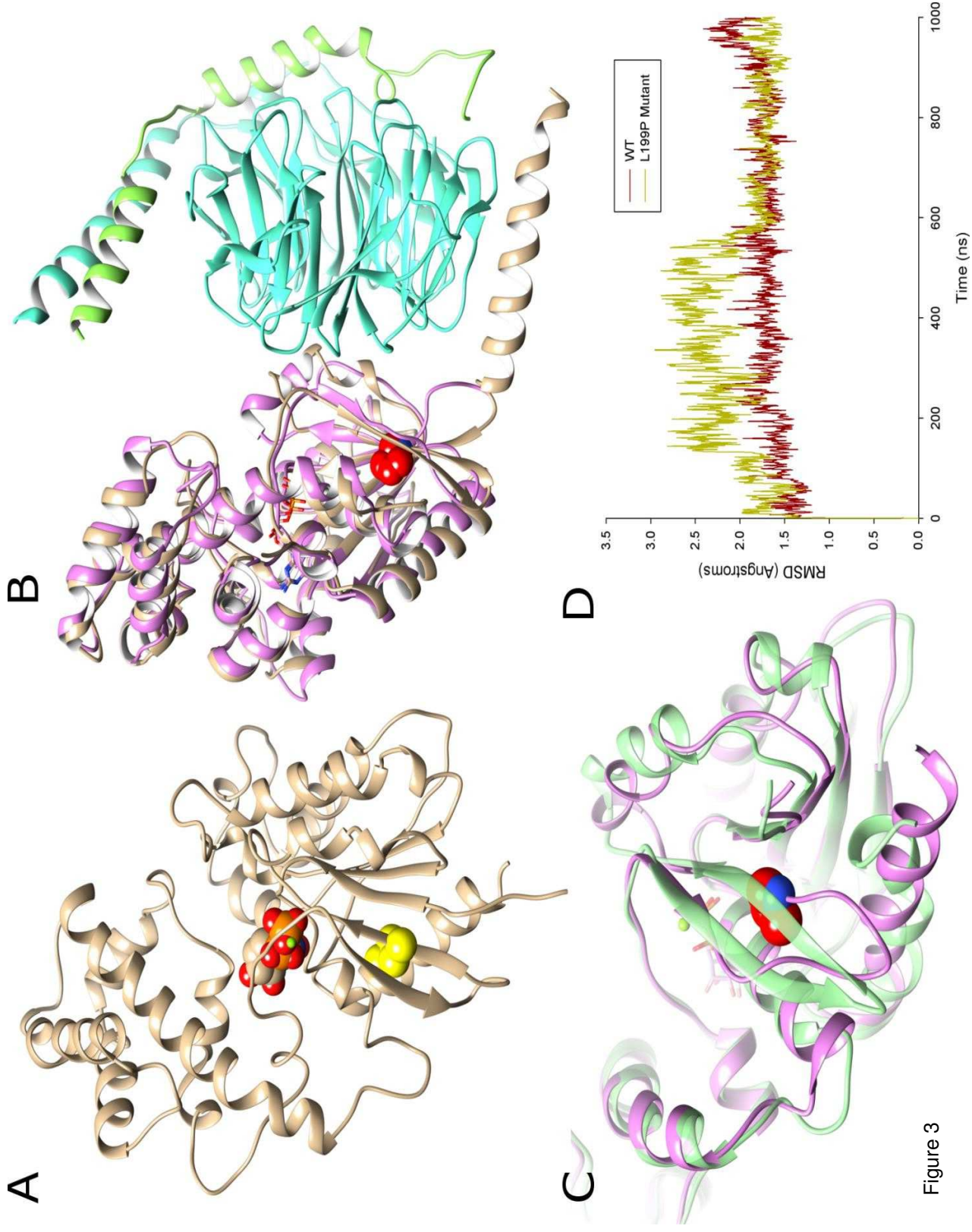


Figure 3

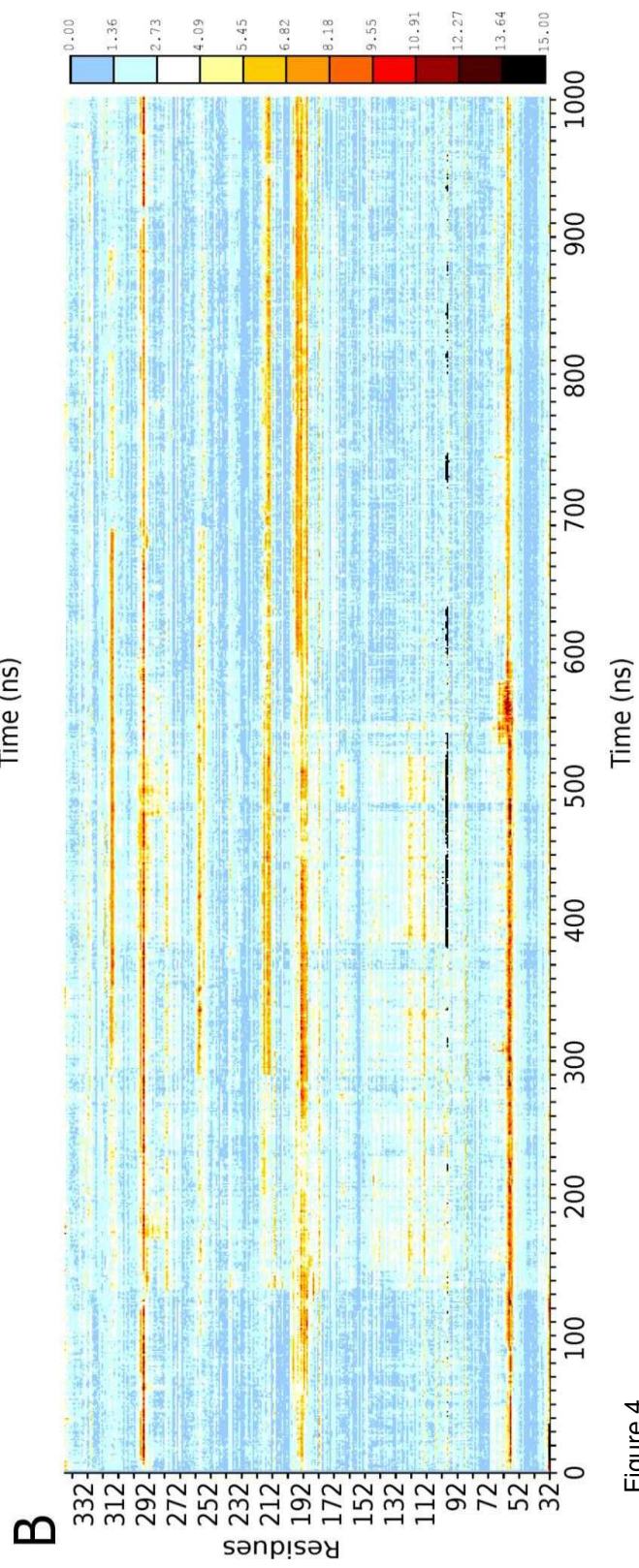
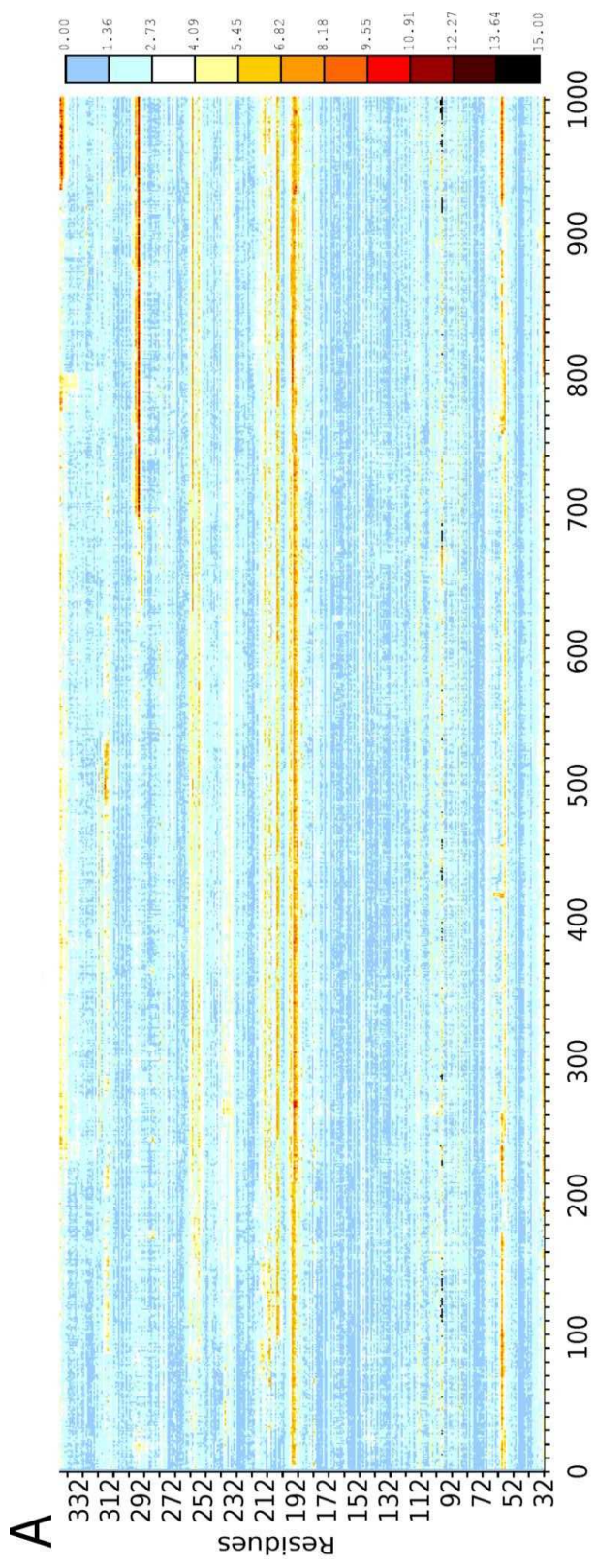


Figure 4

ANNEX II

Gomis-Pérez C et al, 2018 (en revisió)

Homomeric Kv7.2 current suppression is a common feature in KCNQ2-epileptic encephalopathy

Carolina Gomis-Perez¹, Janire Urrutia¹, Anna Marcé-Grau A², Covadonga Malo¹, Eduardo Lopez-Laso³, Ana Felipe-Rucian², Miquel Raspall-Chaure², Alfons Macaya^{2*} and Alvaro Villarroel^{1*}

¹Biofisika Institutua, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC, UPV/EHU, Barrio Sarriena s/n 48940 Leioa SPAIN ²Grup de Recerca en Neurologia Pediàtrica. Vall d'Hebron Institut de Recerca. Universitat Autònoma de Barcelona. Pg. Vall d'Hebron 119-129. 08035 Barcelona, Spain, ³Hospital Universitario Reina Sofía, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba, IMIBIC, CIBERER-ISCIII, Córdoba, Spain.

Carolina Gomis-Perez	karolgomis@gmail.com Execution, design, interpretation, data analysis
Janire Urrutia	janire.urrutia@gmail.com Execution, interpretation, data analysis
Anna Marce-Grau	annamarcegrau@gmail.com Sequencing, WES bioinformatic analysis
Covadonga Malo	covadonga.m@gmail.com Reagents, technical support
Eduardo López Laso	elolaso@gmail.com Clinical investigations
Ana Felipe-Rucian	anafelipe5@gmail.com Phenotype characterization
Miquel Raspall-Chaure	miquel.raspall@gmail.com Clinical investigations
Alfons Macaya	amacaya@vhebron.net Conception, design, interpretation, phenotype characterization
Alvaro Villarroel	alvaro.villarroel@csic.es Conception, design, interpretation, data analysis

Running title: Functional consequences of mutations underlying KCNQ2-encephalopathy

*Correspondence should be addressed to Alfons Macaya (amacaya@vhebron.net), or Alvaro Villarroel (alvaro.villarroel@csic.es)

Objectives: 276/300
Intro: 333/600
Methods: 565
Results: ~~1550~~
Discussion: 1040/1200
TOTAL: <4000

OBJECTIVE: To gain insight into the mechanisms underlying KCNQ2 encephalopathy by examining the electrophysiological properties of mutant Kv7.2 channels in different multimeric configurations.

METHODS: We analyzed the genotype-phenotype relationship in four patients with KCNQ2 encephalopathy, and performed electrophysiological analysis of M currents mediated by homomeric Kv7.2 or heteromeric Kv7.2/Kv7.3 channels.

RESULTS: Negligible or no current was recorded in cells expressing homomeric E130K, W270R or G281R *de novo* mutants, and was reduced more than 90% for the L243F maternally inherited mutant. The E130K and G281R mutants presented a marked dominant negative behavior, whereas the current density was partially reduced (L243F) or not affected (W270R) when co-expressed with wild type Kv7.2 subunits. In contrast, the extent of Kv7.3 “rescue”, which yields negligible currents on its own, followed the sequence E130K > L243F > W270R, whereas no rescue was observed with the G281R mutant. No significant effects on current density were observed when subunits were expressed in a 0.5:0.5:1.0 (Kv7.2:mutant:Kv7.3) DNA ratio to mimic the genetic balance. There was an increase in sensitivity to PIP₂ depletion for W270R/Kv7.3, but no substantial differences were observed when the mutated subunits were co-expressed with Kv7.2 or both Kv7.2 and Kv7.3.

SIGNIFICANCE: There was a marked disparity on the impact of these mutations on Kv7.2 function, which varied upon association with Kv7.2 or Kv7.3 subunits. Current density of homomeric channels was the most reliable property relating Kv7.2 function to encephalopathy, but other factors are required to explain the milder phenotype for some individuals carrying the maternally inherited L243F mutation. We hypothesize that the role of homomeric Kv7.2 channels for fine tuning neuronal connections during development is critical for the severity of the KCNQ2-encephalopathy.

(max 300 words; 276 words)

KEYWORDS: Early onset epileptic encephalopathy; Kv7 channels; M current; PIP₂; EIEE; KCNQ2; epilepsy.

INTRODUCTION (max 600 words, currently 333)

Kv7 channels are slow activating and non-inactivating voltage gated potassium channels expressed in several neuronal populations. *KCNQ2* (Kv7.2) and *KCNQ3* (Kv7.3) are expressed in central and peripheral nervous system¹ as homo- and heterotetramers, yielding the neuronal M-current which is a key controller of neuronal excitability^{2;3}. The name of this current relates to its inhibition by activation of muscarinic receptors, which proceed by depleting phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) from the plasma membrane. It is generally accepted that this phospholipid binds to intracellular regions close to the membrane, and that is essential for coupling the voltage sensor with the pore domain⁴.

Mutations in *KCNQ2*, along with the less common *KCNQ3*, were reported as the cause of autosomal dominant benign neonatal seizures (BFNS) mainly by haploinsufficiency^{5;6}. Although BFNS usually bears an excellent long-term prognosis, seizure recurrences later in life have also been described⁷. More recently, it was found that *de novo* mutations in *KCNQ2* are responsible up to 5-23% early infantile epileptic encephalopathies (EIEE)⁸⁻¹². *KCNQ2* encephalopathy often presents in the first week of life with a distinct electroclinical pattern characterized by intractable and prominent tonic seizures, with or without autonomic features and burst-suppression or multifocal epileptiform abnormalities with attenuation on EEG. Neuroimaging reveals frontal lobe hypoplasia or transient abnormalities of the basal ganglia or thalamus in some cases. The neurodevelopmental outcome is adverse in all children even if seizure control is achieved in the initial months of life¹³. It has been proposed that the clinical variability of the *KCNQ2*-related epilepsy could be related to the functional consequence of mutations on M current and could thus be predictive of the neurological prognosis^{14;15}.

Here we describe the electrophysiological consequences of four mutations found in patients with EIEE. The impact of these mutations depended upon the configuration (homomeric, heteromeric) and was diverse, having all in common an impairment of function in the Kv7.2 homomeric configuration. Based on our results and the literature, we discuss the potential role of homomeric Kv7.2 channels for the inhibition/excitation equilibrium during a critical developmental window.

PATIENTS AND METHODS (565 words)

Clinical summary

Among a cohort of 78 EIEE cases including patients from four Spanish third-level health centers, four patients diagnosed with neonatal onset epileptic encephalopathy, carrying heterozygous *KCNQ2* mutations were selected for this study.

Patients 1 to 3 are Spanish and patient 4 is Moroccan. All infants had extensive infectious, metabolic and neuroimaging investigations that excluded other causes of their encephalopathy. Informed consent for participation was obtained from the patients parents/guardians. Patients were followed at Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona (patients 1, 2, and 4) and Hospital Reina Sofia, Córdoba (patient 3). Local IRT's at both centers approved the study following Helsinki declaration.

Genetic analysis

The pedigree of each family was ascertained by parental history. DNA was extracted from peripheral blood of probands and their progenitors following standard methods. Written informed consent was obtained from the parents for participation in the study.

Patient 1 was referred for diagnostic genetic testing using a next-generation sequencing panel enriched in 84 epilepsy-related genes. Enrichment and hybridization was performed with custom Sure Select XT kit (Agilent) and MiSeq machine (Illumina) was used to sequence the final library (Centro Nacional de Genotipado, Santiago de Compostela, Spain). Based on family history, patient 2 had targeted investigation of KCNQ2 and KCNQ3 by PCR and Sanger sequencing. A comparative genomic hybridization array (aCGH) was performed because of his atypical dysmorphic features.

Samples of Patients 3 and 4 and their parents underwent whole-exome sequencing. Exome capture and enrichment was performed using NimbleGen SeqCap EZ Exome v3.0 and Illumina TruSeq kits. Libraries were sequenced at 30X coverage in a HiSeq 2000 instrument. Each trio of exomes was aligned to NCBI build 37 reference sequence. Variants were jointly called with GATK Haplotype Caller, annotated using SnpEff and VarAnnot and classified according to its predicted functional effect. The first stage of analysis consisted of inspecting any de novo variants in genes previously associated with EIEE. The putative pathogenic variants were validated using direct Sanger sequencing.

Electrophysiological measurements

The human isoform 3 Kv7.2 (Y15065) and Kv7.3 (NM004519) cDNAs were used in this study. Whole-cell patch recordings of HEK293T cells were obtained as previously described¹⁶. Our protocol to study the sensitivity to DrVSP activation is similar to that used by Hille and collaborators⁴. DrVSP was activated by a 200 ms jump to +100 mV, and the voltage was returned to the holding potential of -20 mV. The size of the outward relaxation before and after the +100 mV jump was used to estimate the effect of DrVSP activation on M-current size^{17;18}. Pipettes were filled with an internal

solution containing (mM): 125 KCl, 10 HEPES (K), 5 MgCl₂, 5 EGTA, 5 Na₂ATP, adjusted to pH 7.2 with KOH and the osmolarity adjusted to ~300 mOsm with mannitol. The amplitude of the Kv7 current was defined as the peak difference in current relaxation measured at -30 mV after 500-1,500 ms pulses to -110 mV (all channels closed) and to +30 mV (all channels opened). Data are shown as the mean \pm s.e.m. The differences between the means were evaluated using the unpaired Student's *t* test, where values of $p \leq 0.05$ were considered significant. The number of cells in each experiment is indicated in brackets in the figures. The results are from two or more independent batches of cells. In all figures *, **, and *** indicate significance at the $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively.

RESULTS (1550 words)

Clinical Features

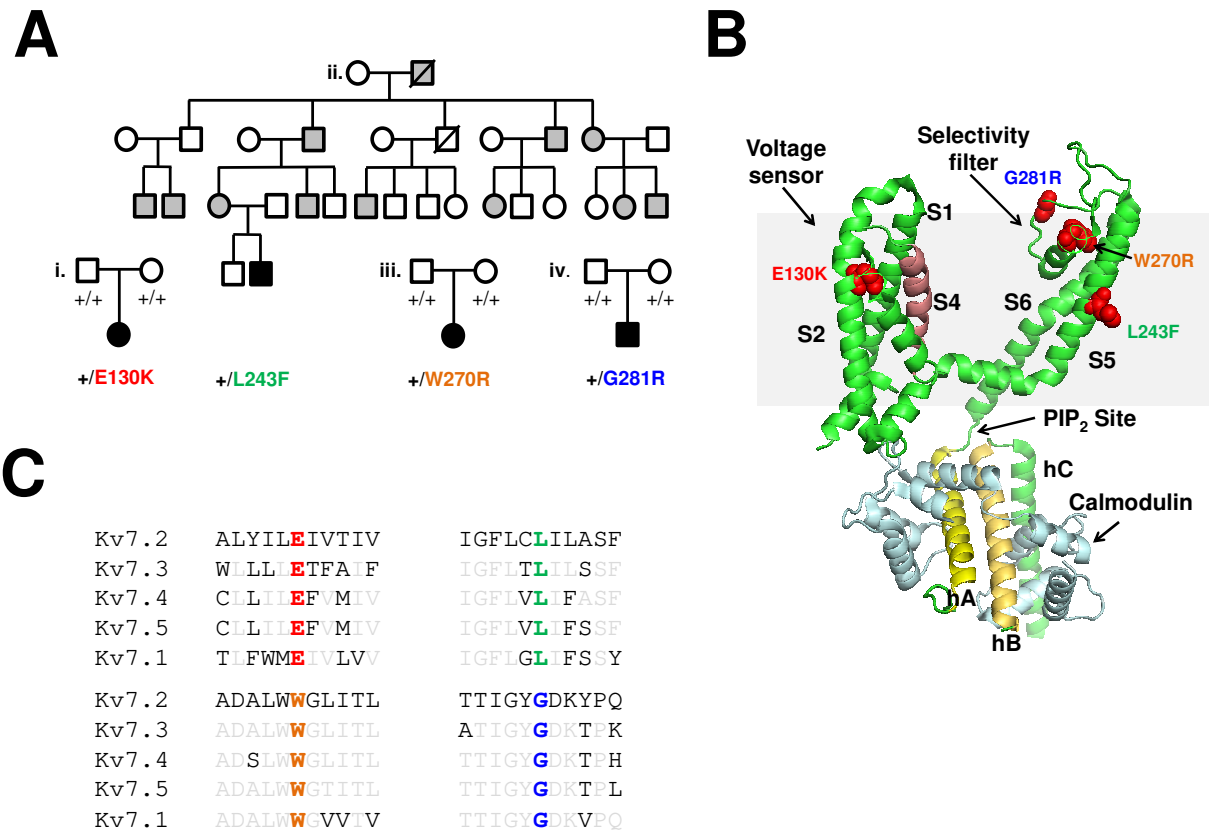


Figure 1: (A) Pedigrees of affected patients with neonatal seizures (grey boxes) and EIEE (black symbols). (B) Three-dimensional representation of the atomic coordinates of Kv7.1 (homologous to Kv7.2) indicating the localization of different mutations associated with EOEI (red filled amino acids). The grey box indicates the membrane region. (C) Multiple sequence alignment of sequences adjacent to the mutated residues illustrate the paralog conservation of Glu130, Leu243, Trp280 and Gly281 mutated in the four patients described here among Kv7 isoforms.

The four patients (Figure 1) presented a KCNQ2 encephalopathy phenotype (for a detailed account of clinical features see Table I). Figure 1B shows the localization of the different mutations on the structure of the homologous Kv7.1 subunit¹⁹, and the multiple alignment shown in Figure 1C reveals that the mutated residues are conserved across all Kv7 isoforms. Patients 1, 3 and 4 were sporadic. Patient 2 belonged into a well-characterized BFNS pedigree, with several affected individuals in his maternal branch. Except for the proband, all mutation carriers had the characteristic phenotype with neonatal-only seizures and normal developmental outcome. Seizure onset occurred in all patients within the first week of life (between day 1 and 4) and were mostly tonic with some autonomic features. Patients 1 and 4 developed apneic episodes with cyanosis. All patients developed further seizures types in their evolution,

mostly clonic and tonic-clonic. Initial EEG showed multifocal epileptiform activity with attenuations and abnormal background (burst-suppression pattern) in patients 1 and 4. Patients 2 and 3 had transient epileptiform anomalies. In three of the patients seizure frequency diminished and then remitted during first months of life, whereas in patient 4 seizures occurred daily until his death at 14 months of age, following repeated bouts of infection and status epilepticus. Sodium channel blockers, particularly oxcarbazepine, had an apparent beneficial anti-seizure effect in patient 1, who also developed recurrent urinary tract infections in association with retigabine-induced neurogenic bladder.

Neuroimaging abnormalities were present in three cases, including thin corpus callosum, delayed myelination, transient T2WI and FLAIR lentiform nuclei hyperintensities and moderate bilateral frontal atrophy (see Figure 2). Although seizures were relatively well controlled, moderate to profound intellectual disability was found in all, with some degree of motor impairment. Autistic spectrum disorder was noted in all surviving patients. Also, two of them had some dysmorphic features and three had nystagmus. Progressive microcephaly was only observed in patient 3.

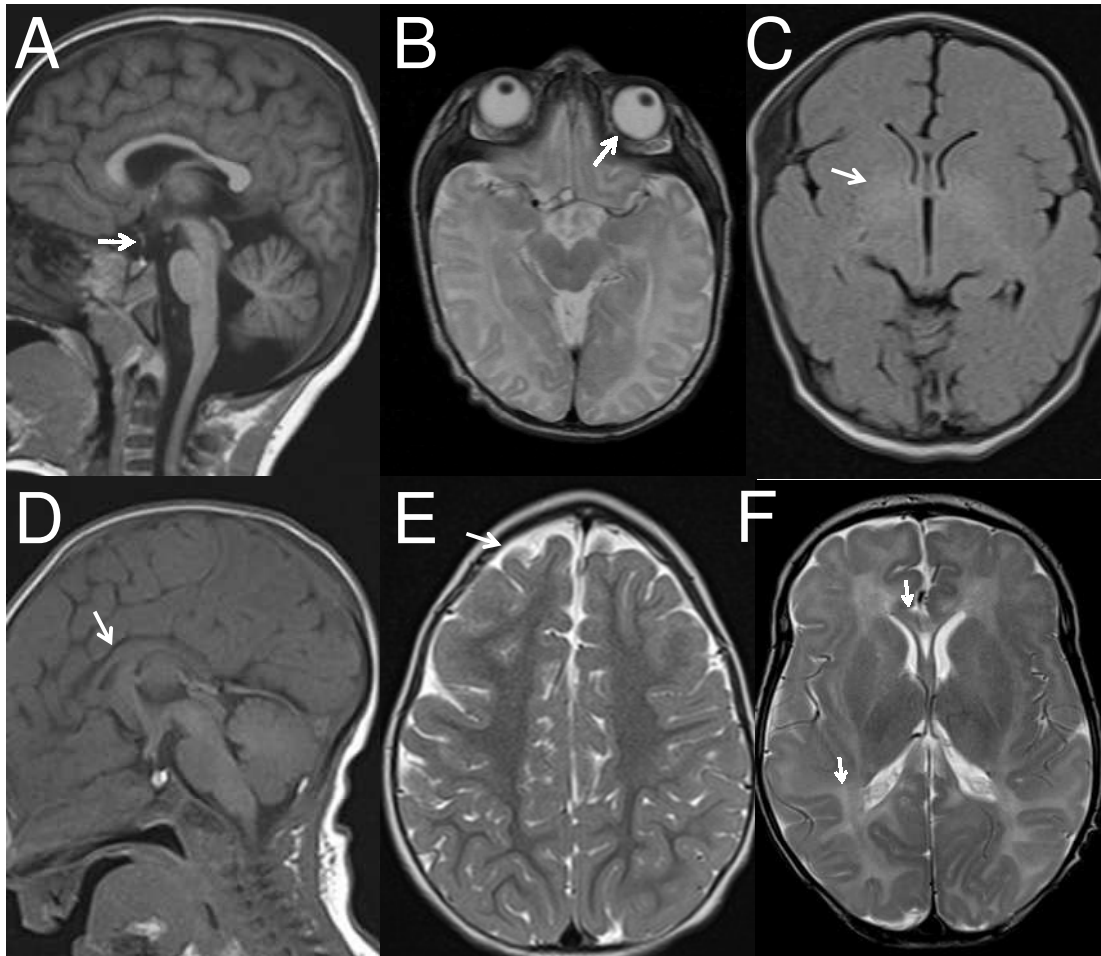


Figure 2: Brain MRI findings in KCNQ2 encephalopathy.

Optic chiasma hypoplasia (A) and strabismus (B) in patient 2. Patient 3 displayed transient neonatal basal ganglia hyperintensity (C) thin corpus callosum (D) and moderate, bilateral frontal atrophy on follow-up at age 19 months (E). In patient 4, MRI at age 4 weeks revealed bilateral T2WI hyperintensity in parietal subcortical white matter and thin corpus callosum.

Genetic testing identified three *de novo* heterozygous mutations in the sporadic cases plus one inherited heterozygous mutation in the familial case (Figure 1A). Patient 1 carries a missense mutation affecting a residue in the transmembrane 2 (NM_172108.3: c.388G>A; NP_742106.1: p.Glu130Lys; Figure 1B). A maternal inherited variant, located in the transmembrane domain segment 5, was detected in patient 2 (NM_172108.3: c.727C>T; NP_742106.1: p.Leu243Phe), whose pedigree shows a familial history of BFNS (Figure 1A). This variant was previously associated with BFNS²⁰.

The missense variant NM_172108.3: c.808A>G; NP_742106.1: p.Trp270Arg and NM_172108.3: c.841G>C; NP_742106.1: p.Gly281Arg were found in patients 3 and 4, respectively (Figure 1A). The latter two variants are located in the pore-forming

segment of the resulting KCNQ2 protein (Figure 1B). All the variants found in these four patients affect residues highly conserved through all five Kv7 family members (Figure 1C), as well as evolutionary conserved (not shown). The *in silico* predictor Mutation Taster classifies them as disease causing mutations. Mutations L243F and E130K have been described in ClinVar database associated to BFNS 1 phenotype (rs118192205) and to EIEE 7 (rs864321710) respectively. None of the variants detected are found in the Exome Aggregation Consortium general population frequencies database (<http://exac.broadinstitute.org>).

Functional characterization of Kv7.2 subunit carrying p.E130K, p.L243F, p.W270R and p.G281R mutations

To study the consequences on channel function, macroscopic currents were recorded using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. HEK293T cells were transiently transfected with cDNAs encoding for Kv7.2_{mutant} subunits alone, or in combination with wt Kv7.2 or Kv7.3.

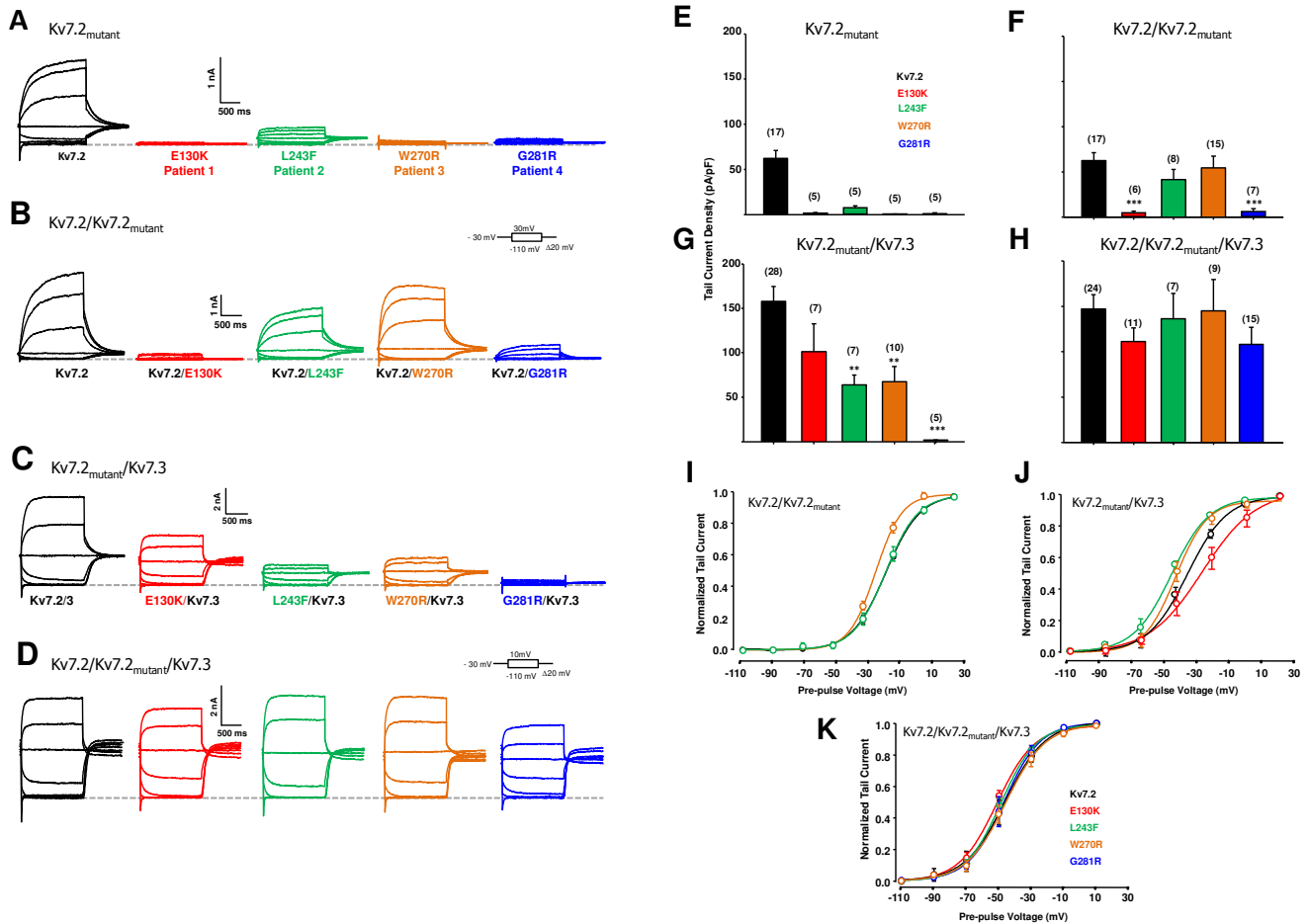


Figure 3: Functional consequences of the mutations in different configurations.

Representative current traces measured in response to the voltage protocol in cells expressing the indicated subunits in (A) homomeric configuration, (B) co-expressed with Kv7.2 wt, (C) Co-expressed with Kv7.3, (D) co-expressed with both Kv7.2 and Kv7.3 in a 0.5:0.5:1.0 Kv7.2/mutant/Kv7.3 ratio to mimic the genetic balance. (E) The difference on tail currents evoked at -110 and +20 mV were measured at -30 mV from cells expressing the subunits in as homomers, (F) co-expressed with Kv7.2 wt in a 1:1 ratio, (G) co-expressed with Kv7.3 in a 1:1 ratio and (H) co-expressed with Kv7.2 and Kv7.3 in a 0.5:0.5:1.0 ratio. (I) Current-voltage relationship co-expressed with Kv7.2 in a 1:1 ratio, (J) co-expressed with Kv7.3 in a 1:1 ratio, (K) co-expressed with Kv7.2 and Kv7.3 in a 0.5:0.5:1.0 ratio. The value of $V_{1/2}$ of each group is compiled in table 2. Number of cells are indicated in brackets. Asterisks indicate values significantly different versus respective controls ** is $p < 0.01$ and *** is $p < 0.001$.

Figure 3 shows a steady current flowing from cells expressing homomeric Kv7.2 channels held at -30 mV, reflecting the non-inactivating properties of Kv7 channels. Current relaxations were evoked at different potentials, and the amplitude was measured as the difference of the instantaneous current on returning to -30 mV (tail current) after opening all channels by a preceding voltage step to +20 mV or +10 mV, and closing all channels by jumping to -110 mV.

The average current density in cells expressing homomeric Kv7.2 wt channels was 62.3 ± 8.8 pF/pA (see Figure 3E); in contrast, the current was almost completely suppressed for the channels carrying the mutations E130K, W270R and G281R, whereas some residual current was measured in cells expressing the subunit carrying the L243F mutation (8.0 ± 1.7 pF/pA, Figure 3A and 3E). We next measured the current density when mutant channels were co-expressed with Kv7.2. This configuration revealed that E130K and G281R exerted a dominant-negative behavior, whereas current density was not affected by the presence of the L243F or W270R mutants.

The ability of the different mutants to rescue the current when co-expressed with Kv7.3 was tested. Kv7.3 yields barely detectable currents when expressed alone in HEK293 cells. Compared to the density when Kv7.2 was expressed alone, an over two-fold increase was observed when co-expressed with Kv7.3 (Figures 3C and 3G). The G281R mutant failed to rescue the current, whereas the current levels with W270R and L243F were about 40% of control. The current density observed with the E130K mutant was on average about 60% of control, but this difference did not reach significance due to the variability of data.

Functional consequences were also assessed in cells co-expressing Kv7.2 wt, Kv7.2 mutant and Kv7.3 subunits at a 0.5:0.5:1.0 ratio to mimic the genetic balance. In this configuration, the current densities were indistinguishable from those in cells expressing the wild-type heteromeric configuration (Figures 3D and 3H).

Figures 3I-K show the impact of the mutations in the current-voltage relationship for the different configurations, except for homomeric channels, because the low current densities did not allow accurate measurements. W270R caused a left shift of the relationship when combined with Kv7.2 or Kv7.3. L243F caused a similar shift when combined with Kv7.3, whereas E130K resulted in a right shift under this configuration. However, these shifts disappeared when co-expressed with both Kv7.2 and Kv7.3 (Figure 3K). A summary of the biophysical properties of the subunits combinations is presented in table 2.

Since PIP₂ is an absolute requirement for Kv7 channel function, we sought to know how these mutations affected this dependency. To answer this question we used the *Danio rerio* variant of the voltage-dependent phosphatase (DrVSP), which catalyzes the removal of a phosphate group at position 5, resulting in the rapid reduction of PIP₂. DrVSP is barely active at the voltages used to quantify Kv7 current relaxations⁴, but becomes active at highly-depolarized voltages. Thus, after a brief activation of DrVSP with a pulse to +100 mV, a subsequent voltage jump to -110 mV from a holding voltage of -20 mV resulted in smaller current relaxations. Thus, quantification of the size of these relaxations gives an assessment of the PIP₂ dependency.

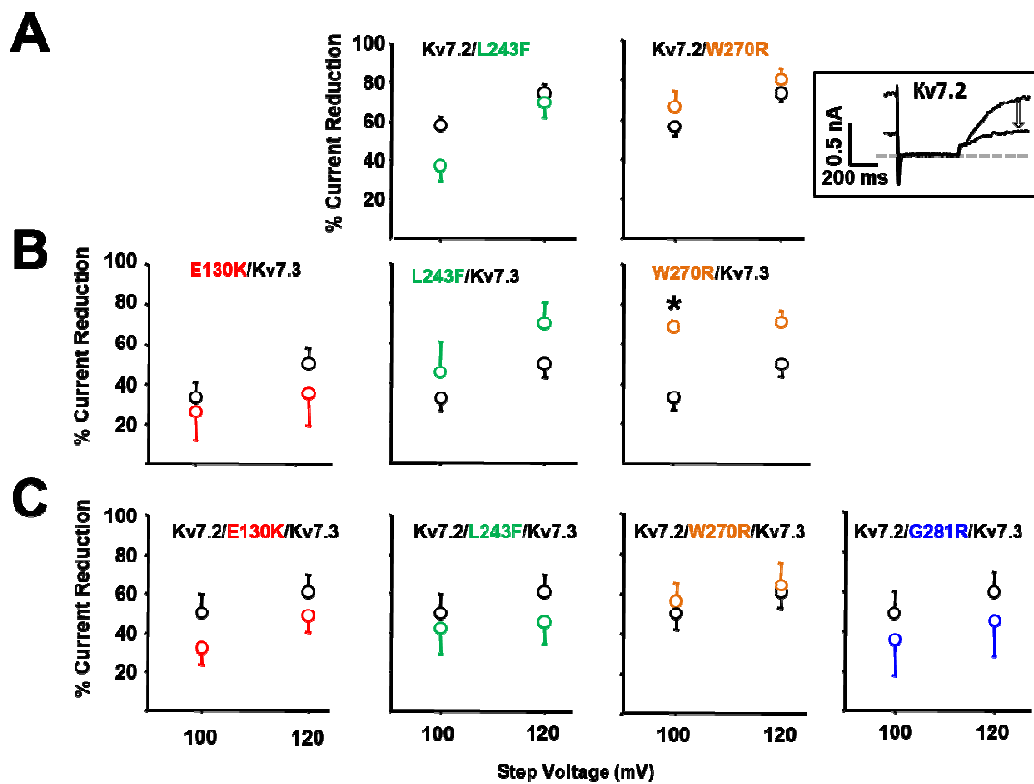


Figure 4: Effect of acute reduction of PI(4,5)P₂ levels on current levels. Inset, illustrative current relaxations before and after DrVSP activation of Kv7.2. (A-C) Averaged current reduction for the mutants under the indicated configurations. (A-C) Current reduction after activation of DrVSP by a brief pulse to +100 or +120 mV for the different mutants expressed under different configurations. Results are the average of 5-15 cells. Asterisk (*) indicate values significantly different ($p < 0.05$) versus respective controls.

A summary of the impact of the mutations in PIP₂-dependency in different configurations is shown in Figure 4. The sensitivity to PIP₂ depletion was increased when the mutant subunits were combined with W270R. Except for this, no significant changes were observed for the remaining configurations (Figure 4).

DISCUSSION (1040 words)

Given the rarity of KCNQ2-related disorders and the inter- and intrafamilial phenotypic variability, channel function-phenotype correlations are difficult to establish. Finding a common functional consequence of KCNQ2 mutations may provide clues to the underlying mechanism in EIEE 7⁹. In the present study, we report the clinical and genetic features of four KCNQ2 mutants (E130K, L243F, W270R and G281R), each located at different rigorously conserved transmembrane sites of the Kv7.2 channel, identified in infants diagnosed with EIEE 7.

The G281R variant led to the most severe phenotype, consistent with previous descriptions^{9;21}. This mutation is located at the position of the second glycine of the selectivity filter (GYG), and, as expected, exerted a dominant-negative effect²². Accordingly, no currents were observed when combined with Kv7.3, but when expressed with both Kv7.2 and Kv7.3, current levels were recovered, which, taking into account the random assembly of subunits²³, is consistent with the hypothesis that the incorporation of two mutated subunits is required to abolish current in Kv7.2/Kv7.3 heterotetramers.

Similar to the G281R mutation, the E130K mutant was dominant-negative when combined with Kv7.2, and was not significantly different to wt when expressed with Kv7.2 and Kv7.3. Surprisingly, function was partially recovered when combined with Kv7.3. The fact that the current density of heteromeric mutant E130K/Kv7.3 configuration is about 60% of control means that the dominant-negative impact of this mutation is partial. In contrast to the more severe phenotype observed for the G281R mutant, this patient had moderate motor and cognitive impairment^{7;12}.

The two remaining mutants (L243F and W270R) had some properties in common. None of them presented a marked dominant-negative impact, both rescued Kv7.3 to similar extent, led to similar current densities when combined with Kv7.3 and Kv7.2, and caused a left-shift in the current voltage relationship when expressed with Kv7.3. However, the severity of the phenotype was different.

The L243F mutation, previously described in an infant suffering relatively mild BFNS with favorable prognosis²⁰, is described here in a patient with cognitive delay and autistic spectrum disorder. The manifestation of this severe phenotype is not inherent to the functional consequences of the mutation, as attested by the mild symptoms described previously²⁰, or the family members carrying the mutation with a benign phenotype. Thus, other factors need to be

postulated to explain the severe phenotype observed in patient 2. Millichap *et al.* have called attention in similar situations (i.e. classical BFNS phenotype in family carriers, encephalopathy in descendants) to the possibility of unrecognized mosaicism^{24;25}. While the genetic data of the family members in our study revealed no evidence of such mosaicism, this cannot be ruled out since the method used for segregation of the variants was direct sequencing (PCR-Sanger).

The patient carrying the W270R mutation had severe motor and cognitive impairment with progressive microcephaly. Similar to L243F, the voltage-dependency was left shifted when combined with Kv7.3 in a 1:1 ratio, but the current-voltage dependency was not affected when expressed with Kv7.2 and Kv7.3. However, there were two differences. The current-voltage dependency was left-shifted when W270R was combined with Kv7.2, and the sensitivity to PIP₂ depletion for W270R was enhanced when combined with Kv7.3. However, these differences disappeared when a more physiological Kv7.2/mutant/Kv7.3 configuration was studied.

What is the basis for the different severity in these two mutants? A clear difference between the two was the dependency on PIP₂ when co-expressed with Kv7.3. Recently, the impact on PIP₂ sensitivity has been proposed to underlie the EIEE phenotype of the R325G Kv7.2 mutant²⁶. It seems reasonable to consider that the impact on PIP₂ sensitivity of W270R when combined with Kv7.3 may correlate with the phenotype severity, although such configuration is expected to represent only about 25% of the Kv7.2/Kv7.3 combinations²³.

A naïf assumption is that, since all the mutations studied here led to encephalopathy, a common functional property will be impaired in the whole set, and the extent of the deficiency may correlate with the severity of the phenotype. However, the functional impact of these mutations was diverse, except for the almost complete obliteration under the homomeric Kv7.2 configuration, in line with electrophysiological characterization of other EIEE causing mutations outside the voltage sensor^{15;26-28}. Could it be that impairment of homomeric Kv7.2 channels are the most relevant characteristic related to encephalopathy? If so, what properties, where and when, are dependent on homomeric Kv7.2 M-channels?

Alteration in the equilibrium between inhibitory or excitatory circuits due to gene mutations that are not compensated by homeostatic mechanisms can lead to neurological disorders²⁹. An effect on the excitation/inhibition balance during a critical period of development may help explaining the counter-intuitive observation that both gain and loss of Kv7.2 function can lead to developmental neurological impairment^{14;30}. We should consider that, in the rat brain, expression of KCNQ2 precedes that of KCNQ3³¹, and, therefore, there is a period during

development in which the homomeric Kv7.2 configuration of the M-channel is predominant. It seems reasonable to speculate that, during this period, the pruning and fine-tuning of connections and circuits will be critically sensitive to the activity of homomeric Kv7.2 M-channels. Indeed, observations in a mouse model that allows reducing M-channel activity support the Kv7.2 critical period hypothesis. Mice with reduced M-channel activity exhibited early onset of persistent epilepsy, hippocampal heterotopic neurons and marked disturbances in cognitive function during adulthood²². Allowing the M-channel to fully function temporally during development was sufficient to prevent the anatomical disorganization and more severe behavioral effects otherwise seen²². The idea that the disruption of excitation/inhibition balance is central to disease development as received strong support recently. It has been shown that pharmacological intervention to enhance inhibitory routes during early postnatal period of brain development prevents encephalopathy in a mouse model expressing a dominant-negative variant of Kv7.2 subunits²⁹.

In summary, our data show that a dominant-negative effect on channel function is not strictly required to develop the most severe phenotypes in EIEE 7, while we draw attention to the potential critical role of Kv7.2 homomeric M-channels during development. In addition, a mutation in a pedigree with benign phenotype is linked to encephalopathy in one member, suggesting that other genetic or environmental factors are key to the severity. Further studies using existing or new animal models of KCNQ2-dependent encephalopathy will be instrumental to identify new pharmacological targets and the critical period for prophylactic intervention.

Author Contributions

C.G. and J.U. contributed to all aspects of the in cellulo experiments and data analysis. C.M. assisted in the heterologous expression and other experiments. C.G., J.U., A.M. and A.V. designed and discussed experiments. All authors revised the manuscript. C.G. and A.V. wrote the manuscript with the input from all authors. A.M. and A.V. conceived the project and supervised the work.

Acknowledgments

The Department of Industry, Tourism and Trade of the Government of the Autonomous Community of the Basque Country (Elkartek 2017 bG17 kk-2017/00084 3M50.17.EK.C6) and from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (BFU2015-66910) provided financial support for this work. A.M.-G. was supported by a predoctoral grant of VHIR, Barcelona Spain. A.F.-R. was the recipient of a SENEPI scholarship. Supported by Instituto Carlos III, Madrid, Spain, grant PI15/1791 (AM)

Competing financial interests: The authors have no competing financial interests to declare.

Availability statement: Materials, data and associated protocols will be made available on request.

Reference List

1. Soldovieri MV, Miceli F, Taglialatela M. Driving with no brakes: molecular pathophysiology of Kv7 potassium channels. *Physiology (Bethesda)* 2011;26:365-76.
2. Battenfeld A, Tran BT, Gavrilis J et al. Heteromeric Kv7.2/7.3 channels differentially regulate action potential initiation and conduction in neocortical myelinated axons. *J Neurosci* 2014;34:3719-32.
3. Soh H, Pant R, LoTurco JJ et al. Conditional deletions of epilepsy-associated KCNQ2 and KCNQ3 channels from cerebral cortex cause differential effects on neuronal excitability. *J Neurosci* 2014;34:5311-21.
4. Falkenburger BH, Jensen JB, Hille B. Kinetics of PIP₂ metabolism and KCNQ2/3 channel regulation studied with a voltage-sensitive phosphatase in living cells. *J Gen Physiol* 2010;135:99-114.
5. Bellini G, Miceli F, Soldovieri MV et al. KCNQ2-Related disorders. *GeneReviews* 2010;- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK32534/>.
6. Zara F, Specchio N, Striano P et al. Genetic testing in benign familial epilepsies of the first year of life: clinical and diagnostic significance. *Epilepsia* 2013;54:425-36.
7. Steinlein OK, Conrad C, Weidner B. Benign familial neonatal convulsions: always benign? *Epilepsy Res* 2007;73:245-9.

- 204
8. Weckhuysen S, Mandelstam S, Suls A et al. KCNQ2 encephalopathy: Emerging phenotype of a neonatal epileptic encephalopathy. *Ann Neurol* 2012;71:15-25.
 9. Weckhuysen S, Ivanovic V, Hendrickx R et al. Extending the KCNQ2 encephalopathy spectrum: Clinical and neuroimaging findings in 17 patients. *Neurology* 2013.
 10. Milh M, Boutry-Kryza N, Sutera-Sardo J et al. Similar early characteristics but variable neurological outcome of patients with a de novo mutation of KCNQ2. *Orphanet J Rare Dis* 2013;8:80.
 11. Kato M, Yamagata T, Kubota M et al. Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation. *Epilepsia* 2013;54:1282-7.
 12. Hortiguuela M, Fernandez-Marmiesse A, Cantarin V et al. Clinical and genetic features of 13 Spanish patients with KCNQ2 mutations. *J Hum Genet* 2017;62:185-9.
 13. Allen NM, Mannion M, Conroy J et al. The variable phenotypes of KCNQ-related epilepsy. *Epilepsia* 2014;55:e99-105.
 14. Miceli F, Soldovieri MV, Ambrosino P et al. Genotype-phenotype correlations in neonatal epilepsies caused by mutations in the voltage sensor of K_v7.2 potassium channel subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:4386-91.
 15. Orhan G, Bock M, Schepers D et al. Dominant-negative effects of KCNQ2 mutations are associated with epileptic encephalopathy. *Ann Neurol* 2014;75:382-94.
- 221

- 22
16. Gomis-Perez C, Alaimo A, Fernandez-Orth J et al. Unconventional calmodulin anchoring site within the AB module of Kv7.2 channels. *J Cell Sci* 2015.
 17. Alberdi A, Gomis-Perez C, Bernardo-Seisdedos G et al. Uncoupling PIP₂-calmodulin regulation of Kv7.2 channels by an assembly de-stabilizing epileptogenic mutation. *J Cell Sci* 2015;128:4014-23.
 18. Villarroel A. On the role of arachidonic acid in M-current modulation by muscarine in bullfrog sympathetic neurons. *J Neurosci* 1994;14:7053-66.
 19. Sun J, MacKinnon R. Cryo-EM Structure of a KCNQ1/CaM Complex Reveals Insights into Congenital Long QT Syndrome. *Cell* 2017;169:1042-50.
 20. Singh NA, Westenskow P, Charlier C et al. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel genes in benign familial neonatal convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum. *Brain* 2003;126:2726-37.
 21. Olson HE, Kelly M, LaCoursiere CM et al. Genetics and genotype-phenotype correlations in early onset epileptic encephalopathy with burst suppression. *Ann Neurol* 2017;81:419-29.
 22. Peters HC, Hu H, Pongs O et al. Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior. *Nat Neurosci* 2005;8:51-60.

23. Stewart AP, Gomez-Posada JC, McGeorge J et al. The Kv7.2/Kv7.3 heterotetramer assembles with a random subunit arrangement. *J Biol Chem* 2012;287:11870-3.
24. Milh M, Lacoste C, Cacciagli P et al. Variable clinical expression in patients with mosaicism for KCNQ2 mutations. *Am J Med Genet A* 2015;167A:2314-8.
25. Millichap JJ, Park KL, Tsuchida T et al. KCNQ2 encephalopathy: Features, mutational hot spots, and ezogabine treatment of 11 patients. *Neurol Genet* 2016;2:e96.
26. Soldovieri MV, Ambrosino P, Mosca I et al. Early-onset epileptic encephalopathy caused by a reduced sensitivity of Kv7.2 potassium channels to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Sci Rep* 2016;6:38167.
27. Dedek K, Fusco L, Teloy N et al. Neonatal convulsions and epileptic encephalopathy in an Italian family with a missense mutation in the fifth transmembrane region of KCNQ2. *Epilepsy Res* 2003;54:21-7.
28. Abidi A, Devaux JJ, Molinari F et al. A recurrent KCNQ2 pore mutation causing early onset epileptic encephalopathy has a moderate effect on M current but alters subcellular localization of Kv7 channels. *Neurobiol Dis* 2015;80:80-92.
29. Marguet SL, Le-Schulte VT, Merseburg A et al. Treatment during a vulnerable developmental period rescues a genetic epilepsy. *Nat Med* 2015;21:1436-44.

30. Millichap JJ, Miceli F, De MM et al. Infantile spasms and encephalopathy without preceding neonatal seizures caused by KCNQ2 R198Q, a gain-of-function variant. *Epilepsia* 2017;58:e10-e15.

31. Tinel N, Lauritzen I, Chouabe C et al. The KCNQ2 potassium channel: splice variants, functional and developmental expression. Brain localization and comparison with KCNQ3. *FEBS Lett* 1998;438:171-6.

Main clinical and genetic features of four patients with <i>KCNQ2</i> encephalopathy				
	INFANT 1	INFANT 2	INFANT 3	INFANT 4
PHENOTYPE	KCNQ2-Encephalopathy Neonatal Seizures	KCNQ2-Encephalopathy Neonatal Seizures	KCNQ2-Encephalopathy Neonatal Seizures, Focal epilepsy since 3 years of age	KCNQ2-Encephalopathy Ohtahara syndrome, then MMPS
MUTATION	c.388G>A p. E130K	c.727C>T p.L243F	c.808A>G p.W270R	c. 841G>C p.G281R
INHERITANCE/FAMILY HISTORY	De novo	Maternal Inheritance	De novo	De novo
DOMAIN IN PROTEIN	Transmembrane domain (S2)	Transmembrane domain (S5)	Intramembrane domain (H5), pore forming	Intramembrane domain (H5), pore forming
SEX	F	M	F	M
AGE AT ONSET	Day 1	Day 4	Day 3	Day 2
CURRENT AGE	4 years	9 years	4 years	Died at 14 months
SEIZURE TYPE AT ONSET	Tonic, subclinical first days of life	Tonic, sometimes with cyanosis (apnea and desaturation)	Tonic with eyelid blinking	Tonic with cyanosis (apnea and desaturation)

FURTHER SEIZURE TYPES	Mainly tonic	Mainly tonic, some clonic	Tonic with clonic jerks of limbs. Since 3 years of age, focal impaired awareness. Clonic seizures.	Mainly tonic, some clonic and tonic-clonic
AEDs	LEV, pyridoxine, VPA, FB, CLB, OXC, RTG	FB, pyridoxine, VPA	FB, PHT, CZP, VPA, ZSM, LEV, VGB	FB, pyridoxine, LEV, VPA, PHT, CLB, ZSM, VGB, ACT
EEG	Burst suppression in neonatal age, mildly abnormal background	Epileptiform anomalies in left central region, normal later on	Abnormal background (high voltage), persistent sharp waves and spike-waves in both frontal regions	Multifocal, burst suppression, migrating partial seizures (ictal)
NEUROIMAGING (BRAIN MRI)	Normal	Delayed myelination, ectopic neurohypophysitis, inferior cerebellar vermian hypoplasia, chiasmatic visual pathway atrophy	Thin & short CC, WM and Lentiform Nuclei Hyperintensities, then moderate bilateral frontal atrophy	Thin CC, T2WI WM hyperintensities, frontal lobe atrophy
MICROCEPHALY	No	No	Mild progressive microcephaly	No
SEIZURE OUTCOME	No seizures since 1 month of age, currently only on OXC	No seizures since 1.5 months of age (without AEDs since 3 months of age)	No seizures from ages 1 month to 3 years. Currently on ZSM, VGB and LEV, for focal clonic seizures with impaired awareness	Daily tonic seizures in spite of multiple AEDs since birth to death

MOTOR OUTCOME	Delayed motor skills, Hypertonia and poor head control initially, attained independent walking	Initial hypertonia. Independent walking, clumsiness.	Delayed motor skills, Hypotonia	Profound hypotonic tetraparesis
COGNITIVE OUTCOME	Delayed developmental milestones, ASD	Cognitive delay, ASD	Cognitive delay, ASD	No developmental milestones achieved, poor eye contact
ADDITIONAL FEATURES	No dysmorphism, startle reaction, squint and horizontal-rotatory nystagmus, nonepileptic extensor jerks, dystonic posturing, neurogenic bladder due to RTG	Some dysmorphic features, pendular nystagmus, visual deficiency, lingual protrusion movements since birth to 5 months of age	Squint, nystagmus	Some dysmorphic features (macrosgomy and macroglosia, bone dysplasia)

M: male; **F**: Female; **EEG**: electroencephalography; **MRI**: magnetic resonance imaging; **AEDs**: antiepileptic drugs; **LEV**: levetiracetam; **PB**: Phenobarbital **PHT**: phenytoin; **MF**: multifocal; **ZSM**: zonisamide **VGB**: vigabatrin; **ACTH**: adrenocorticotropic hormone; **OXC**: oxcarbazepine; **RTG**: retigabine; **CZP**: clonazepam; **CC**: corpus callosum; **WM**: white matter; **ASD**: autistic spectrum disorder; **MMPSI**: malignant migrating partial seizures of infancy.

Table 2: Biophysical properties of mutant Kv7.2 channels

	$V_{1/2}$ (mV)	k (Slope) (mV)	Current Density (pA/pF)	n
Kv7.2	-24.4 ± 0.8	11.1 ± 0.6	62.3 ± 8.8	17
Kv7.2/E130K	--	--	5.0 ± 1.4***	6
Kv7.2/L243F	-25.1 ± 1.2	10.8 ± 1.0	41.4 ± 11.1	8
Kv7.2/W270R	-31.7 ± 0.8	8.9 ± 0.5	54.2 ± 13.0	15
Kv7.2/G281R	--	--	6.3 ± 2.8***	7
Kv7.2/Kv7.3	-43.1 ± 0.9	11.3 ± 0.7	157.9 ± 16.5	28
E130K/Kv7.3	-36.2 ± 2.0	14.9 ± 1.5	101.1 ± 31.5	7
L243F/Kv7.3	-52.1 ± 0.7	10.6 ± 0.6	63.9 ± 10.9**	7
W270R/Kv7.3	-50.4 ± 0.9	8.9 ± 0.7	67.2 ± 17.4	10
G281R/Kv7.3	--	--	4.0 ± 1.6***	5
Kv7.2/Kv7.3	-46.2 ± 2.0	12.5 ± 1.2	147.0 ± 16.0	24
Kv7.2/E130K/Kv7.3	-48.5 ± 0.6	11.0 ± 0.5	111.3 ± 15.0	11
Kv7.2/L243F/Kv7.3	-46.2 ± 1.4	12.6 ± 1.2	173.7 ± 39.8	7
Kv7.2/W270R/Kv7.3	-45.7 ± 1.0	11.9 ± 0.8	145.1 ± 34.5	9
Kv7.2/G281R/Kv7.3	-46.1 ± 1.5	12.3 ± 1.5	107.9 ± 19.2	15

*** p < 0.001 ** p<0.01

ANNEX III

NGS per al diagnòstic de l'esclerosi tuberosa

L'esclerosi tuberosa (ET), també anomenada complex d'esclerosi tuberosa (CET) és un trastorn genètic multisistèmic d'expressió variable que afecta 1 de cada 6000 individus. Pertany al grup dels trastorns genètics que produeixen anomalies del desenvolupament cutani i risc elevat d'aparició de tumors al sistema nerviós, els quals reben el nom de facomatosis. Aquests, són hereditaris amb caràcter autosòmic dominant i penetrància variable¹.

La causa de l'esclerosi tuberosa és una conseqüència de les alteracions en la via metabòlica de la diana de la rapamicina (mTOR), la qual s'encarrega de regular tant el creixement cel·lular, la proliferació i la supervivència com el citoesquelet d'actina i la motilitat cel·lular (Figura A1)².

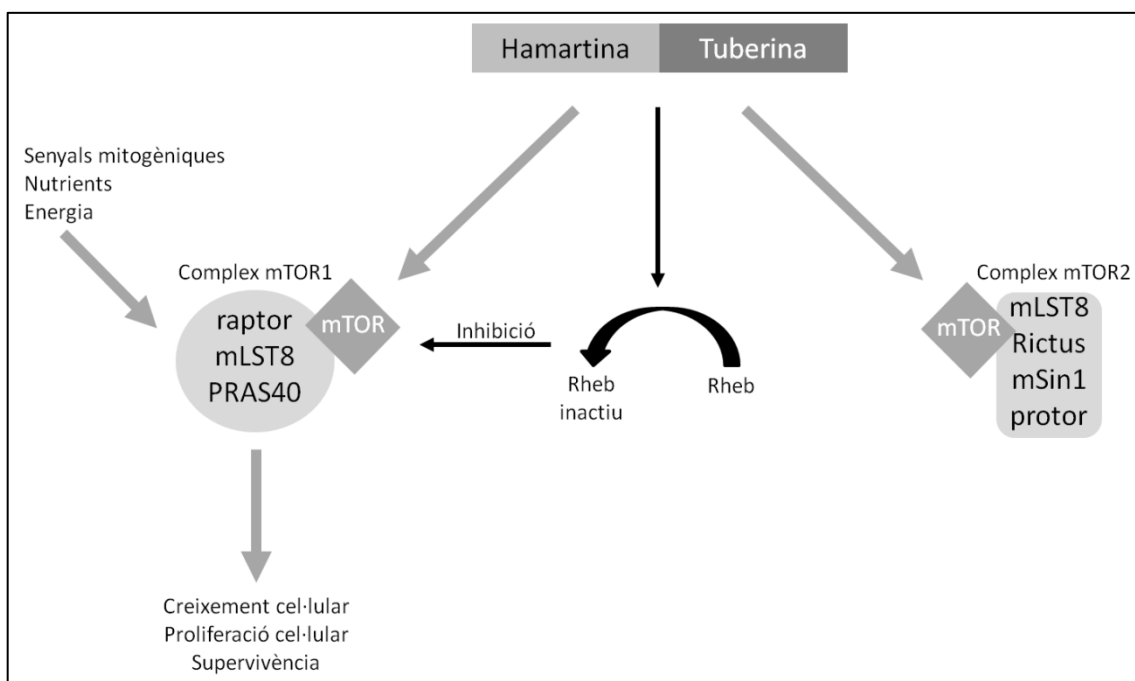


Figura A1 | Via metabòlica mTOR implicada en l'esclerosi tuberosa (Figura adaptada del "Libro blanco de la afectación neurológica en pacientes con esclerosi tuberosa"⁷)

L'esclerosi tuberosa es desenvolupa com a conseqüència d'alteracions a l'hamartina (*TSC1*) i tuberina (*TSC2*). La majoria de les variants en aquests dos gens es presenten de forma germinal, tot i que existeixen casos amb mosaïcisme somàtic que donaria com a resultat un fenotip més lleu:

- Hamartina: Situat a la posició cromosòmica 9q34 i de mida 55kb, aquest gen conté una regió codificant de 8,6kb amb 23 exons. Les mutacions a *TSC1*

expliquen entre el 10 i el 15% dels casos esporàdics de ET, en pacients amb fenotip menys sever.

- Tuberina: Codificat per 40kb del cromosoma 16p13.3, el gen TSC2 conté 41 exons sumant un total de 5,5kb codificants. Entre el 75 i el 80% dels pacients ET presenten variants en aquest gen, coincidint amb un fenotip més sever.

Entre un 10 i un 15% de pacients resten sense mutacions detectades, anomenats NMI (*no mutation identified*), per als quals no s'ha trobat un tercer gen implicat en la malaltia. Es creu que l'explicació a aquests casos resta desconeguda degut a les limitacions de les tècniques utilitzades i del coneixement actual sobre les causes fisiopatològiques de la malaltia³.

El diagnòstic clínic d'aquesta malaltia és complex degut a la variabilitat de símptomes i òrgans afectats que es poden donar. A nivell genètic, la identificació de la causa molecular és aparentment senzilla, ja que només dos gens s'han identificat com a causals. No obstant això, els mètodes tradicionals de seqüenciació en dificulten l'anàlisi, ja que es tracta de gens que sumen un total de 14,1kb a cobrir, implicant una inversió de temps i cost molt elevada. Es postula que l'aparició de les noves tècniques de seqüenciació massiva podrien aportar beneficis importants al diagnòstic genètic de l'esclerosi tuberosa⁴.

El present estudi realitzat al laboratori de Neurologia Pediàtrica de l'Institut de Recerca de la Vall d'Hebron, liderat per l'empresa Novartis, pretén estudiar la capacitat diagnòstica de les eines NGS aplicades a ES per tal de recollir dades poblacionals dels pacients afectes per esclerosi tuberosa a Espanya.

Les tècniques de NGS han anat evolucionant de forma molt accelerada durant els últims anys, cosa que ha suposat una adaptació constant dels mètodes emprats. Aquest projecte no n'és una excepció, i també ha estat realitzat amb diferents metodologies NGS, l'aplicació de les quals ha estat duta a terme amb la col·laboració del grup de Coagulopaties Congènites del Banc de Sang i de Teixits de Barcelona, liderat pel Dr. Francisco Vidal.

1. Materials i mètodes

1.1. Subjectes estudiats

Aquest estudi té com a objectiu estudiar mostres de pacients afectes d'esclerosi tuberosa de tot el territori espanyol. Per aquesta raó, a través de la *Sociedad Española de Neuropediatría* (SENEP), es va donar a conèixer el projecte als especialistes del país perquè enviessin mostres dels seus pacients, especialment d'aquells amb fenotips més rars. L'estudi es va plantejar com a un estudi cec on les mostres s'identifiquen per codis donats pels hospitals d'origen. Tots els individus entrats a l'estudi van ser informats de la seva finalitat i implicació a través d'un consentiment informat, aprovat pel Comitè Ètic de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron.

Les mostres dels pacients arribades d'arreu d'Espanya van ser processades per a extreure'n el DNA a través del mètode salí estàndard⁵. El DNA resultant es va quantificar amb Nanodrop i posteriorment les mostres van ser emmagatzemades en TE i a -20°C fins al moment de realitzar l'estudi. Al final de l'estudi s'han acabat recollint 155 mostres.

1.2. NGS a partir d'amplicons de mida gran

Les PCRs convencionals amplifiquen de forma senzilla fins a 1Kb de DNA, mida que sol agafar la mida de cada exó. En el cas de TSC1 i TSC2, amplificar amb aquest tipus de reacció és més complex, ja que contenen 23 exons (46kb) i 41 exons (60kb), respectivament, cosa que suposaria un mínim de 65 reaccions per pacients. Per reduir temps en la seqüenciació d'aquests dos gens es va apostar per implementar PCRs de llarga longitud, que poden amplificar fins a 10kb en una sola reacció.

1.2.1. Long-Range PCR

Per a poder amplificar pel mètode de long-range PCR (LR-PCR) es van dissenyar 8 parelles de *primers* que amplifiquessin fragments d'entre 5 i 10kb per a TSC1 i 6 per a TSC2, de forma que se superposessin entre ells (Taula A1) i cobrissin tot el gen.

La LR-PCR es duu a terme amb el *SequalPrep™ Long PCR Kit with dNTPs* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), el qual conté un tampó 10X que ja conté la concentració de Mg²⁺ i dNTPs, DMSO i una polimerasa especial per a PCRs de gran longitud. El kit també conté dos enhancers, A i B, que duen diferent concentració d'elements necessaris per a la reacció, i que es poden utilitzar a 0,5X o

1X, segons la reacció d'amplificació. Finalment, el DNA es prepara a 50ng/µl afegint 50ng per reacció, i de cada parella de *primers* a 10pmol/µl s'afegeixen 20pmols, per reacció.

Taula A1. Primers per a la Long-Range PCR

Fragment	Primers	Seqüència	Mida (pb)
TSC1.1	TSC1_LR1_Fw	CAAGATCTCTTCGCAGCCTCCTTTCCGG	8436
	TSC1_LR1_Rv	ATGTGCAAAGCCTAATTCTGCCTTCAGG	
TSC1.2	TSC1_LR2_Fw	CAGTCCACTAGTTTGACTTTGGCCATGG	6992
	TSC1_LR2_Rv	CTTAAGTGTCACACTAAGCTAACCTGTGG	
TSC1.3	TSC1_LR3_Fw	GTGATTTACCTGAAGCAGAAATCAATGTGG	7929
	TSC1_LR3_Rv	CCTGTAGTGGATGCACCCAAGATATTCC	
TSC1.4	TSC1_LR4_Fw	GGCATCCTAAGGCTGCAGGACTTGG	7853
	TSC1_LR4_Rv	TAGAAAGTGATTGAGAGCAGGCGTTAGG	
TSC1.5	TSC1_LR5_Fw	GGACCATGTCCAGGGAAAAGTGTCCAGG	7338
	TSC1_LR5_Rv	CATTTGAGAAGCTGCCTGCCAAACACC	
TSC1.6	TSC1_LR6_Fw	CTATCCCAAGAGGCCTTGCATTCTTCC	7499
	TSC1_LR6_Rv	AGACACTAAGGGAGCTACTATATGAACC	
TSC1.7	TSC1_LR7_Fw	GAAATGTTTCGCAGTGTGTGTTAAATTGCC	5908
	TSC1_LR7_Rv	GAACACTTCCTGTGGCCATATGGAGG	
TSC1.8	TSC1_LR8_Fw	CTGAGCATTAGTGTGTACTTGTCTCTGG	7242
	TSC1_LR8_Rv	CTATGCCACTTGGCCACTCATTGAGG	
TSC2.1	TSC2_LR1_Fw	CTATCCCGCCTCCTCCACGCTCC	7654
	TSC2_LR1_Rv	GTCCAAACCCGTCCTGCTGCTTGCAGG	
TSC2.2	TSC2_LR2_Fw	GATGCTGCAGACCTGTCTCTTGCAGG	7402
	TSC2_LR2_Rv	CAGCTGGGCCAAGAAGGAAGCTCGG	
TSC2.3	TSC2_LR3_Fw	GGCTTCCGCATGACTTTGGAGGACC	6813
	TSC2_LR3_Rv	GGAGTTCCAAGTAAGGGCAACAGAACC	
TSC2.4	TSC2_LR4_Fw	CAATTCCTGTCATGTTTATATGTCATGG	7013
	TSC2_LR4_Rv	CTTAGCAAGTCCCTGAATGCCTGTGG	
TSC2.5	TSC2_LR5_Fw	GGATCGTGTCCGAATGCAACTGACC	8806
	TSC2_LR5_Rv	CAGCTGATGTCACCATGGAGACTCAGG	
TSC2.6	TSC2_LR6_Fw	CCTGGGGTTGGGACTAAAGCATAACC	7674
	TSC2_LR6_Rv	CCTGCTTCTGTGTACCACTTCTGTGG	

En primer lloc es van posar a punt a partir de DNA control, és a dir, de mostres d'individus sense patologia coneguda cada una de les reaccions, seleccionant per a cada parella de *primers*, l'enhancer A o B i la concentració que millor amplifiqués cada fragment. Posteriorment, es van realitzar les 14 reaccions de LR-PCR per a cada un dels DNAs dels 70 pacients que van entrar en aquesta fase de l'estudi.

1.2.2. Normalització dels diferents amplicons

El resultat de les diferents LR-PCRs es va córrer en un gel d'agarosa al 0.8% en TBE 1X i, a la vegada, es va quantificar fluorimètricament amb el Qubit 2.0 Fluorometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). A partir de la combinació entre la inspecció visual de la mida de les bandes i les quantificacions de concentracions de cada reacció es van normalitzar en molaritat les 14 reaccions de cada pacient entre elles. A continuació es van ajuntar totes les reaccions de cada pacient, de manera que s'aconseguís una representació equimolar de cada fragment a la mescla final.

Posteriorment, les mostres dels diferents pacients, a través de la quantificació fluorimètrica, es van dur a una concentració de 0.2ng/μl, per tal de procedir a la preparació de la llibreria.

1.2.3. Preparació de llibreries

Un cop les mostres estan preparades la preparació de les llibreries es va realitzar amb el kit *Nextera XT Library Preparation* (Illumina, San Diego, CA, USA) segons el protocol *Nextera XT DNA Library Preparation Guide* (part #15031943).

El procés consisteix en la tagmentació (marcatge i fragmentació) inicial del DNA d'interès, en el qual un transposoma fragmenta i afegeix seqüències adaptadores als extrems de forma simultània. A continuació s'amplifica el DNA resultant a partir de les seqüències adaptadores, alhora que s'afegeixen els índexs corresponents a cada pacient i les seqüències necessàries per a posteriorment crear els clústers de seqüenciació. El resultat de l'amplificació pot donar un ventall ampli de fragments de mides diferents, dels quals es seleccionen els d'aproximadament 300pb mitjançant les boles magnètiques Agencourt AMPure Beads (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). El següent pas és normalitzar les llibreries dels diferents pacients mitjançant boles magnètiques de normalització, per tal que siguin estiguin representades de forma equimolar en el pool total. Finalment, es transfereixen 5μl de cada llibreria en un mateix tub que rebrà el nom de pool final, i que procedirà a ser seqüenciat.

1.3. Panell NGS específic per a TSC1 i TSC2

Amb la millora de les tècniques de NGS, van sorgir panells que integraven el procediment realitzat a partir dels amplicons de LR-PCR, de manera que es reduïa el temps emprat. Per aquesta raó, es va modificar el mètode de seqüenciació de TSC1 i TSC2 LR-PCR i Nextera XT, per un panell *GeneRead DNAseq Gene Panel Mix-n-Match* de Qiagen (Hilden, Alemanya) que inclou la seqüenciació pràcticament completa dels exons dels dos gens d'interès.

1.3.1. Amplificació per PCR i purificació de mostres

Per la realització el panell partim de mostres de DNA de pacients a una concentració de 2,5ng/µl, mesurades amb Qubit.

El panell consisteix en 4 reaccions de PCR per cada pacient on s'inclou el Buffer 5x específic del panell, un dels 4 pools de primers 2x, la polimerasa específica del panell i aigua lliure de DNases. En finalitzar s'uneixen les quatre reaccions de cada pacient i es corra 1µl de cada pool en un gel d'agarosa al 0.8%.

Per tal de purificar els amplicons resultants de les PCRs, s'utilitzen boles magnètiques Agencourt AMPure Beads (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

1.3.2. Preparació de llibreries

Per a preparar les llibreries s'utilitza una adaptació del protocol NEBNext Ultra DNA Library Prep d'Illumina, dissenyada pel grup de Coagulopaties del BST.

En primer lloc es produeix la fragmentació del contingut de l'amplificació fent una reacció d'una hora (30 minuts a 20°C i 30 minuts a 65°C) amb els reactius inclosos al kit *End Prep Enzyme Mix* i *End repair reaction buffer (10x)*, i a continuació, es lliguen els fragments a adaptadors NEBNext per a Illumina, amb una reacció de lligació.

El següent pas consisteix en la purificació i selecció de fragments segons la mida per adaptadors, a través de varies incubacions de 5 minuts amb boles magnètiques Agencourt AMPure Beads. A continuació es procedeix a una segona amplificació per PCR del DNA fragmentat i lligat, amb una polimerasa d'alta fidelitat per tal d'afegir les combinacions d'índexs i5 i i7 a cada mostra. Les reaccions de PCR resultants són purificades amb Agencourt AMPure Beads i finalment cada llibreria és quantificada amb el qubit de forma independent, i portades, cada una d'elles a 5nM. En aquest punt

es transferiran 2,5µl de cada llibreria en un pool final, el qual serà quantificat i ajustat a 4nM.

1.4. Seqüenciació en MiSeq i processament de les dades crues

Per a seqüenciar les llibreries, tant de LR-PCR i Nextera XT com del Generead, s'utilitza una plataforma MiSeq d'Illumina, ubicada al grup de coagulopaties congènites del Banc de Sang i de Teixits de Barcelona.

1.4.1. Càrrega de mostres

En primer lloc, el pool de llibreries resultant de cada un dels protocols es desnaturalitza: en el cas de NexteraXT per temperatura i en el cas de NEBNext amb NaOH 0.2N. A continuació es carrega en un cartutx d'Illumina MiSeq Reagent Micro Kit, v2 de 300 cicles, i s'inicia el procés de seqüenciació en una plataforma MiSeq, el qual dura aproximadament 24 hores.

1.4.2. Control de qualitat del *run* i obtenció de les dades crues

El procés de seqüenciació es duu a terme mitjançant la formació de clústers els quals es van amplificant mitjançant la creació de ponts a partir dels adaptadors situats a la *flow cell*. El nombre de clústers creat és el primer punt de control del procés, i s'obté entre 3 i 4 hores després d'iniciar la seqüenciació, i l'òptim se situa en 1200000 clústers.

Un cop finalitzar el *run* s'obtenen el resum de qualitat de seqüenciació per mostra, on dóna la informació de la qualitat del procés, així com la cobertura de cada una de les llibreries. En aquest punt es pot detectar qualsevol error en la creació de llibreries, així com de seqüenciació, i detectar si es tracta d'un problema general o puntual.

Finalment, el propi seqüenciador processa el resultat i genera un arxiu fastq, amb tota la informació necessària per a poder processar les dades i analitzar-ne el resultat.

1.4.4. Alineament de seqüències i crida de variants

A partir dels arxius fastq de cada pacient, es produeix l'alineament amb la seqüència del genoma de referència (hg19) i s'obté un arxiu BAM. I a partir d'aquest es genera un arxiu BED que conté el resum de les cobertures de TSC1 i TSC2 per a cada mostra, i ens serveix com a un altre control de qualitat. Finalment, a partir de l'alineament es

procedeix a la crida de variants i s'obté un arxiu vcf, el qual es carrega en un software d'Illumina anomenat VariantStudio, que permet l'anotació de les variants i la seva anàlisi.

El *pipeline* utilitzat en cada un dels mètodes de seqüenciació és diferent, ja que cada casa comercial utilitza uns softwares específics. En el cas de la seqüenciació per LR-PCR i NexteraXT, és Illumina qui aplica el seu *pipeline* utilitzant el software *Isaac Enrichment Analysis* disponible al *BaseSpace* de la mateixa casa comercial. En el cas del panell Generead, la casa comercial Qiagen proporciona una plataforma on a partir dels fastq, aplica el seu propi *pipeline* i genera els arxius necessaris per a fer l'anàlisi. A més a més, aquest últim, ofereix un *pipeline* adaptat per a poder detectar variants en mosaïcisme.

1.5. Filtratge de variants

Per a analitzar les dades dels arxius vcf s'utilitza, en qualsevol dels dos casos, el programa VariantStudio d'Illumina, el qual permet aplicar diferents tipus de filtres.

Els filtres que s'apliquen, tant en mutacions germinals com en mosaics, són els següents:

- Qualitat: el propi software té uns paràmetres que classifiquen cada variant segons un control de qualitat que té en compte la cobertura i el balanç al·lèlic, entre altres paràmetres. Es consideren aquelles que passen els filtres de qualitat.
- Tipus de mutació: es seleccionen aquelles variants que tenen un impacte greu o moderat predit sobre la proteïna final (mutacions *nonsense*, *frameshift*, *missense* i *splicing*). Els altres tipus també es recullen però no s'avaluen com a patogèniques, ja que la informació que es té d'elles és insuficient per predir patogenicitat.
- Freqüència poblacional: com a malaltia rara que representa l'esclerosi tuberosa, se seleccionen només aquelles variants que no estan descrites en les bases de dades poblacionals, o en cas d'estar-ho, que no ho estiguin en un valor superior al 0.01%

Un cop seleccionades es variants que passen tots els filtres, es procedeix a creuar-les amb la resta de mostres de pacients per tal d'eliminar variants altament presents en la població d'estudi. Les variants restants, són classificades de nou sota altres paràmetres:

- Predictors *in silico*: MutationTaster, Poliphen, Sift i Provean per a SNPs, i addicionalment, HumanSpliceFinder per a variants d'*splicing*. Aquelles variants predites com patogèniques són les considerades com a causants del fenotip.
- Bases de dades específiques de pacients: la base de dades LOVD té una base específica per a pacients amb variants a TSC1 i una altra per a pacients amb TSC2. Les variants trobades com a resultat de la seqüenciació es creuen amb les presents en aquesta base de dades per a saber si ha estat prèviament associada al fenotip.

Les variants resultants com a possiblement patogèniques després d'aquest procés d'anàlisi són reportades als clínics peticionaris de l'estudi perquè les validin pels serveis de diagnòstic autoritzats.

1.6. MLPA

Pes aquells pacients negatius per a variants en els dos gens es duu a terme un assaig MLPA de MRC-Holland per a TSC1 (SALSA MLPA P124 TSC1 probemix) i TSC2 (SALSA MLPA P046 TSC2 probemix) amb els reactius SALSA MLPA EK1 reagent kit (100rxn - EK1-FAM) segons les instruccions del fabricant.

Les delecions o insercions trobades també seran reportades als clínics perquè realitzin les validacions que considerin pertinents.

2. Resultats i discussió

Aquest estudi s'ha realitzat en 155 pacients del territori espanyol afectes per esclerosi tuberosa, dels quals 69 han estat seqüenciats pel mètode *Long Range PCR* i Nextera i 86 pel panell específic NGS per a *TSC1* i *TSC2*. Els pacients amb resultats negatius per a NGS, 75 en total, han estat sotmesos a un assaig MLPA per a detectar duplicacions i delecions en ambdós gens.

Taula A2 | Resum dels resultats NGS per a *TSC1* i *TSC2*

	Global	LR-PCR i Nextera	GeneRead	MLPA
Diagnòstics <i>TSC1</i>	23	10	11	2
Diagnòstics <i>TSC2</i>	69	32	28	9
Diagnòstics <i>TSC1</i> i <i>TSC2</i>	1	1	0	0
Diagnòstics totals	93	43	39	11
Negatius	62	26	47	65
Pacients totals	155	69	86	76

Els resultats generals mostren un 60% de diagnòstics (Taula A2), dels quals el 74,19% corresponen a variants a *TSC2*, el 24,73% a *TSC1*, i en un dels casos s'ha detectat una variant en cada un dels gens en un mateix individu, ambdues aparentment patogèniques. El percentatge de pacients negatius (NMI) resultants d'aquest estudi és superior al descrit a la literatura². Una explicació podria ser la detecció de variants causals, en estudis previs, que amb l'aparició de dades massives de NGS han resultat ser polimorfismes. Aquest seria el cas de diverses variants detectades en una gran part dels pacients estudiats en aquest treball, però que havien estat descrites com a variants associades al fenotip ET. En són exemples les variants codificades a dbSNP per *TSC1*: rs118203716, rs1091220, rs62621221, rs65997586; i per *TSC2*: rs45517272, rs1748, rs13332221, rs13332222, rs45517185, les quals malgrat haver estat descrites associades a la malaltia, posteriorment han estat classificades com a benignes o probablement benignes. Una segona explicació a l'alt percentatge d'NMIs podria ser el mètode d'inclusió de pacients a l'estudi. En primer lloc, fenotips molt rars de la malaltia van ser inclosos, i en molts casos la sospita clínica d'ET no era 100% segura. A més, en tractar-se d'un estudi a nivell de tot el territori espanyol, en molts casos no s'ha informat, des del centre d'origen, de l'existència d'estudis genètics previs al moment de sol·licitar l'estudi, creant un biaix entre aquells individus ja coneguts com a negatius per als dos gens.

Si s'estudien els resultats per tècniques, s'observa que el percentatge de diagnòstic és superior en el cas de *Long-Range* PCR i Nextera en comparació amb Generead. Aquesta diferència es podria explicar a la inclusió de pacients fenotípicament més rars a l'última fase de l'estudi. Els resultats mostren una major proporció de pacients amb variants a *TSC2* (Taula A3), els quals presenten de forma majoritària variants de canvi d'aminoàcid (31,1%) i *d'splicing* (24,3%). En canvi, d'entre les variants a *TSC1*, predominen aquells canvis que generen proteïnes truncades de forma precoç (55,56%) seguit de variants *missense* (22,22%). Aquests resultats es mantenen en consonància amb el descrit fins al moment².

Taula A3 | Variants detectades en la cohort de 155 pacients d'aquest estudi

P	Tècnica	Origen	Gen	cDNA	Proteïna
01	NXT	Germinal	TSC1	c.2776C>T	p.Gln926*
02	NXT	Germinal	TSC2	c.481+2T>C	NA
05	NXT	Germinal	TSC2	c.3397+5G>T	NA
06	GR + MLPA	Germinal	TSC2	Deleció total	
10	NXT	Germinal	TSC2	c.2423T>C	p.Leu808Ser
11	NXT	Germinal	TSC2	c.4494-1G>T	NA
12	NXT	Germinal	TSC2	c.3884-18_3884-6delCCGTCTGTGCCT	NA
14	NXT	Germinal	TSC2	c.2981delC	p.Leu995Serfs*21
15	NXT	Germinal	TSC2	c.2407C>T	p.Gln803*
16	NXT	Germinal	TSC2	c.4493+7C>A	NA
18	NXT	Germinal	TSC2	c.801delC	p.Leu268Trpfs*25
20	NXT	Germinal	TSC2	c.1831C>T	p.Arg611Trp
21	NXT	Germinal	TSC2	c.725delC	p.Leu243Serfs*17
22	NXT	Germinal	TSC2	c.1712T>C	p.Leu571Pro
23	NXT	Germinal	TSC2	c.2098-2A>G	NA
		Germinal	TSC2	c.5116C>T	p.Arg1706Cys
24	NXT	Germinal	TSC2	c.5228G>A	p.Arg1743Gln
25	NXT	Germinal	TSC2	c.4987A>T	p.Lys1663*
26	NXT	Germinal	TSC2	c.1832G>A	p.Arg611Gln
27	NXT + MLPA	Germinal	TSC2	Deleció de l'exó 25 al 28	
30	NXT	Germinal	TSC2	c.3734delG	p.Asp1246Thrfs*79
32	NXT	Germinal	TSC2	c.1599+4A>C	NA
33	NXT + MLPA	Germinal	TSC1	Deleció de l'exó 1	
34	NXT	Germinal	TSC1	c.555C>G	p.Tyr185*
35	NXT	Germinal	TSC2	c.4494-1G>C	NA
38	NXT	Germinal	TSC1	c.562T>G	p.Phe188Val

P (Pacient), NXT (LR-PCR + Nextera), GR (GeneRead)

Taula A3 | Continuació

P	Tècnica	Origen	Gen	cDNA	Proteïna
39	NXT	Germinal	TSC2	c.3008C>T	p.Ala1003Val
		Germinal	TSC2	c.4129C>T	p.Gln1377*
41	NXT	Germinal	TSC2	c.246G>A	p.Trp82*
42	NXT	Germinal	TSC2	c.889delT	p.Phe298Leufs*65
43	NXT	Germinal	TSC1	c.1888_1891delAAAG	p.Lys630Glnfs*22
45	NXT	Germinal	TSC1	c.1632delG	p.Pro545Leufs*11
46	NXT	Germinal	TSC2	c.2096A>C	p.Gln699Pro
47	NXT + MLPA	Germinal	TSC2	Deleció de l'exó 39 i 40	
49	NXT	Germinal	TSC1	c.737+1G>A	NA
51	NXT	Germinal	TSC1	c.989dupT	p.Ser331Glnfs*10
52	NXT	Germinal	TSC1	c.1955_1958dupTGAT	p.Gln654Aspfs*35
53	NXT	Germinal	TSC1	c.737G>A	p.Arg246Lys
		Germinal	TSC2	c.1378G>A	p.Ala460Thr
56	NXT	Germinal	TSC1	c.508+2T>C	NA
57	NXT	Germinal	TSC2	c.3582G>A	p.Trp1194*
58	NXT	Germinal	TSC2	c.1108C>T	p.Gln370*
59	NXT	Germinal	TSC1	c.2101delC	p.Gln701Serfs*23
60	NXT	Germinal	TSC2	c.2978C>T	p.Thr993Met
63	NXT	Germinal	TSC2	c.5024C>T	p.Pro1675Leu
64	NXT	Germinal	TSC2	c.4821_4823delCTA	p.Tyr1608del
65	NXT	Germinal	TSC2	c.2098-2A>G	NA
66	NXT	Germinal	TSC2	c.1717-1G>A	NA
67	NXT	Germinal	TSC2	c.600-1G>C	NA
68	NXT + MLPA	Germinal	TSC2	Deleció de l'exó 1 al 24	
71	NXT	Germinal	TSC2	c.446A>G	p.Asn149Ser
73	GR	Germinal	TSC2	c.329A>G	p.Gln110Arg
74	GR	Germinal	TSC2	c.1513C>T	p.Arg505*
75	GR + MLPA	Mosaic (8%)	TSC2	c.268C>T	p.Gln90*
76	GR	Germinal	TSC2	c.4850-3C>T	NA
77	GR	Germinal	TSC2	c.1599+1G>A	NA
81	GR + MLPA	Germinal	TSC2	Deleció de l'exó 12	
84	GR	Germinal	TSC2	c.2743-1G>A	NA
88	GR	Germinal	TSC2	c.2590C>T	p.Gln864*
90	GR	Germinal	TSC2	c.1790A>G	p.His597Arg
91	GR	Germinal	TSC2	c.5164_5165insC	p.Ser1723Leufs*6
92	GR	Germinal	TSC2	c.4494-2A>C	NA
93	GR	Germinal	TSC2	c.5251C>T	p.Arg1751Cys
95	GR	Germinal	TSC1	c.1987G>T	p.Glu663*
96	GR	Germinal	TSC1	c.1987G>T	p.Glu663*

P (Pacient), NXT (LR-PCR + Nextera), GR (GeneRead)

Taula A3 | Continuació

P	Tècnica	Origen	Gen	cDNA	Proteïna
97	GR	Germinal	TSC1	c.1904_1905delCA	p.Thr635Argfs*52
98	GR + MLPA	Germinal	TSC1	Deleció de l'exó 21 al 23	
99	GR	Germinal	TSC2	c.2451_2453delCAT	p.Ile818del
100	GR	Germinal	TSC2	c.2355+2T>A	NA
101	GR	Germinal	TSC2	c.4787G>A	p.Gly1596Asp
102	GR + MLPA	Mosaic (6%)	TSC2	c.4989+1G>A	NA
104	GR	Germinal	TSC2	c.976-15G>A	NA
106	GR	Germinal	TSC1	c.2074C>T	p.Arg692*
107	GR	Germinal	TSC1	c.338delT	p.Leu113Cysfs*5
		Germinal	TSC1	c.334C>G	p.Leu112Val
109	GR	Germinal	TSC1	c.1498C>T	p.Arg500*
		Germinal	TSC1	c.91G>C	p.Glu31Gln
111	GR	Germinal	TSC2	c.570C>G	p.Tyr190*
113	GR	Germinal	TSC2	c.1397T>C	p.Leu466Pro
117	GR	Germinal	TSC1	c.647T>C	p.Phe216Ser
119	GR + MLPA	Germinal	TSC2	Deleció de l'exó 1 al 14	
121	GR	Germinal	TSC1	c.2041+1G>C	NA
122	GR	Germinal	TSC2	c.4005+1G>T	NA
123	GR	Germinal	TSC2	c.4952A>G	p.Asn1651Ser
126	GR	Germinal	TSC2	c.5268_5269insGA	p.Ala1758Lysfs*69
127	GR	Germinal	TSC1	c.583delT	p.Tyr195Thrfs*15
128	GR	Germinal	TSC2	c.4952A>G	p.Asn1651Ser
129	GR + MLPA	Germinal	TSC2	Duplicació completa	
130	GR + MLPA	Germinal	TSC2	Deleció de l'exó 1 al 15	
131	GR	Germinal	TSC1	c.149delT	p.Leu50Argfs*12
132	GR + MLPA	Germinal	TSC2	Deleció de l'exó 1 al 13	
133	GR	Germinal	TSC2	c.3598C>T	p.Arg1200Trp
		Germinal	TSC2	c.4721T>C	p.Phe1574Ser
134	GR	Mosaic (7,5%)	TSC2	c.4130A>G	p.Gln1377Arg
138	GR	Germinal	TSC1	c.413C>T	p.Thr138Ile
142	GR + MLPA	Germinal	TSC1	Deleció completa	
145	GR	Germinal	TSC2	c.2659_2662delTGTC	p.Cys887Trpfs*6
146	GR	Germinal	TSC2	c.1778A>G	p.His593Arg
149	GR	Germinal	TSC2	c.1994C>T	p.Pro665Leu
		Mosaic (19,8%)	TSC2	c.976-15G>A	NA
155	GR + MLPA	Germinal	TSC2	c.3519C>T	Sinònima

P (Pacient), NXT (LR-PCR + Nextera), GR (GeneRead)

Els 62 pacients negatius de les tècniques NGS, juntament amb tres pacients amb resultats de significat incert, han estat sotmesos a MLPA per a detectar deleccions i insercions. D'aquests, el 14.47% han estat diagnosticats amb alteracions a *TSC1* (18,18%) o *TSC2* (81,82%), proporcions que coincideixen amb les descrites a la literatura². A *TSC1* només s'han detectat deleccions totals o parcials del gen, representant un 11.11% de les variants totals trobades en aquest gen. Les deleccions a *TSC2*, també totals o parcials, representen un 10.8% de les variants a tuberina, mentre que la duplicació total trobada en un dels pacients resulta en el 1.35% (Taula A3).

Els tres pacients sotmesos a MLPA degut al significat incert de les seves variants no han resultat en deleccions o duplicacions en cap dels dos gens, convertint la variant detectada per NGS en la principal sospita diagnòstica. En dos dels casos es tracta de variants detectades com a mosaïcisme somàtic (pacients 75 i 102), les quals difícilment es poden validar mitjançant Sanger degut a la seva baixa sensibilitat. Tot i això, la hipòtesi que aquests tipus de variants causin ET ja ha estat descrita anteriorment². Una tercera variant incerta és la mutació sinònima detectada en el pacient 155, la qual podria estar afectant els processos d'*splicing* segons els predictors *in silico* (MutationTaster i *Human Splice Finder*). El fet que mutacions que afecten processos d'*splicing* o reguladors de l'expressió gènica hagin estat descrits en els últims anys⁶, suggereixen la necessitat de reanalitzar les dades obtingudes dels diferents estudis per a detectar variants prèviament descartades.

Els resultats d'aquest estudi mostren diferències significatives en el temps invertit en la preparació de les llibreries, ja que el mètode GeneRead combina el procés de múltiples PCRs en una sola reacció (*multi-plex PCR*) amb la normalització automàtica dels amplicons. Aquest procés és manual i laboriós en el cas d'utilitzar LR-PCR i Nextera. A més, el Generead proporciona un *software* de senzilla aplicació per a detectar mosaïcismes somàtics. Per altra banda, però, al ser de disseny comercial resten diverses regions amb males cobertures que s'han de cobrir a través de reaccions de PCR i seqüenciació Sanger, addicionals a la NGS. Aquest problema en el cas de la LR-PCR i Nextera és menor, ja que les PCRs llargues es dissenyen i s'ajusten de forma independent, de la mateixa manera que la normalització posterior, unificant les cobertures de les diferents zones. Alhora, aquesta tècnica proporciona informació intrònica que fins ara es descartava, però que tal com s'ha comentat, comença a guanyar força com a hipòtesi per a explicar l'alt percentatge de NMI entre els pacients d'esclerosi tuberosa.

3. Bibliografía

1. Roldán, S. & Martínez Bermejo, A. Definición y epidemiología de la esclrosis tuberosa. in *Libro blanco de la afectación neurológica en pacientes con esclerosis tuberosa* 9–17 (2014).
2. Macaya, A. & Eirís Puñal, J. Genética y fisiopatología de la esclerosis tuberosa. in *Libro blanco de la afectación neurológica en pacientes con esclerosis tuberosa* 21–31 (2014).
3. Curatolo, P., Moavero, R., Roberto, D. & Graziola, F. Genotype/Phenotype Correlations in Tuberous Sclerosis Complex. *Seminars in Pediatric Neurology* **22**, 259–273 (2015).
4. Lam, H. C., Nijmeh, J. & Henske, E. P. New developments in the genetics and pathogenesis of tumours in tuberous sclerosis complex. *Journal of Pathology* **241**, 219–225 (2017).
5. Miller, S. A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1215 (1988).
6. Nellist, M. *et al.* Targeted Next Generation Sequencing reveals previously unidentified TSC1 and TSC2 mutations. *BMC Med. Genet.* **16**, 10 (2015).
7. Alonso Luengo, O. *et al.* *Libro blanco de la afectación neurológica en pacientes con esclerosis tuberosa.* (2014).